

우슬 다당 추출물의 항염 효과에 관한 연구

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

(주)참존 기술원 응용연구소
(2007년 12월 18일 접수, 2008년 3월 4일 채택)

Study on the Anti-inflammatory Effect of Polysaccharide Extract from *Acyranthes bidentata*

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 December 18, 2007; Accepted March 4, 2008)

요 약: 우슬(*Acyranthes bidentata*)은 항관절염(anti-arrthritic), 최음(aphrodisiac), 항바이러스(anti-viral), 항경련(anti-spasmodic), 항고혈압(anti-hypertensive), 항응고(anti-coagulant) 그리고 항암(anti-tumor) 효과에 사용되어 왔다. 본 연구는 우슬 추출물로부터 분리한 다당 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항염 효과와 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 우슬 다당 추출물을 대상으로 실험한 결과 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2 그리고 total NO 생성 억제) 효과를 나타내었다.

Abstract: *Acyranthes bidentata* has been used as anti-arrthritic, aphrodisiac, anti-viral, anti-spasmodic, anti-hypertensive, anti-coagulant and anti-tumor agent. In this study, we evaluated anti-inflammatory effect of polysaccharide extract from *Acyranthes bidentata*. *Acyranthes bidentata* polysaccharide decreased IL-1 α , IL-6, COX-2, and total NO synthesis. Our results point to the potential use of *Acyranthes bidentata* polysaccharide as a cosmeceutical agent for inflammatory cutaneous symptoms.

Keywords: *Acyranthes bidentata*, anti-inflammation, IL-1 α , IL-6, COX-2

1. 서 론

우슬(*Achyranthes bidentata*)은 비름과의 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai) 또는 우슬(*Achyranthes bidentata*)의 뿌리를 말한다. 일본에서는 우슬(*Achyranthes bidentata*)과 털쇠무릎(*Achyranthes fauriei*)을 사용하고, 중국은 우슬(*Achyranthes bidentata*)만을 사용하고 있다. 우슬은 어혈을 제거해줌으로써 생리불순, 산후복통에 사용하며 골수를 보충하고 음기를 잘 통하게 하여 관절염과 음허화동으로 인한 입안과 혀의 발진을 치료하는데 사용하였다고 알려져 있다. 약리작용으로 항

관절염(anti-arrthritic), 최음(aphrodisiac), 피임(anti-fertility), 항바이러스(anti-viral), 지사(laxative), 분만 유도(ecbolic), 항경련(anti-spasmodic), 항고혈압(anti-hypertensive), 항응고(anti-coagulant), 이뇨(diuretic), 자궁흥분작용, 항암(anti-tumor), 콜레스테롤 강하작용, 혈당강하작용, 간기능 개선 작용, 진통, 진경효과, 항알러지(anti-allergy) 효과 등이 보고되었다[1-4]. 또한 기침, 신수종(renal dropsy), 치루(fistula), 피부발진(skin rash), 비염(nasal infection), 천식(asthma), 만성 말라리아(chronic malaria), 발열, 무월경(amennorrhoea), 복통(abdominal cramp) 및 사교상(snake bite) 등에도 널리 사용되기도 한다[5]. 성분으로는 rutin, saponin, achyranthine, caffeic acid, inokosterone, ecdysterone, rubrosterone, physcion, oleanolic acid, manatanic acid, li-

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

noleic acid, ecdysone, triterpenoid saponin, metamorphosis hormone, β -sitos-terol, β -sitossterol glycoside, stigmasterol, stigmasterol glycoside 및 rubrosterone 등이 함유된 것으로 보고되어 있다[6,7]. 최근의 많은 연구를 통해 *in vitro* 실험에서 우슬의 면역조절작용[8], 급성 및 아급성 염증에 대한 항염증효과[9,10], 성분 연구(oleanolic acid bisdesmoside)[11], human cancer colon cell에서의 항암효과[12], cytochrome P450 약물 대사효소에 대한 억제작용[13], cathepsin B에 대한 저해효과[14], 골아세포 증식과 분화에 미치는 효과[15], 카드뮴 흡입독성완화에 미치는 영향[16] 등의 보고가 되어 있다.

본 연구에서는 우슬의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화, 미백 및 항염 효과와 관련된 실험을 실시하여, 화장품 원료로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 우슬은 2005년 6월 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약으로는 trypsin-EDTA solution, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), dimethyl sulfoxide (DMSO), H_2O_2 , nutrient mixture (Ham's F-12), 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-2 ELISA Kit, Total NO (Nitric Oxide) ELISA kit, manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) ELISA (Korea) kit는 Assay Designs (USA)사의 제품을, 용매는 덕산화학(Korea)과 Fisher (USA)사의 제품을 사용하였다. Human normal fibroblast는 국내 MTT사에서 분양받아 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 aspirator (EYELA, Japan), evaporator (EYELA, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하였다.

2.2. 다당 추출 및 분리

등근 바닥 플라스크에 우슬 400 g과 증류수 1 L를 넣고 heating mantle를 이용하여 6 h 동안 가열하여 추출하였다(3회 반복). 추출물은 실온에서 식힌 후, 여과지(No. 2, Whatman, UK)와 aspirator를 이용하여 진공 여

과하였다. 여과한 추출액은 evaporator를 사용하여 농축하였다. 농축액 500 mL을 비이커에 넣고, 에탄올 1,500 mL을 첨가하여 약 75 %의 에탄올 용액으로 만든다. 이 용액을 냉장고에 4 °C 저온으로 24 h 동안 보관하면서 다당 침전물이 생기는지 관찰한다. 침전된 다당 분획은 에탄올로 세척하여 분리한 후, 동결 건조기를 사용하여 분말로 만들어 보관 및 실험에 사용하였다.

2.3. 항산화 효과

2.3.1. Mn-SOD 생성 억제 효과 실험

DMEM 과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblast를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H_2O_2 를 N. control을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환해주며 sample을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 Mn-SOD를 ELISA kit로 492 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

2.4. 항염 효과

2.4.1. IL-1 α 생성 억제 효과 실험

DMEM 과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblast를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H_2O_2 를 N. control을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환해주며 sample을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 IL-1 α 를 ELISA kit로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

2.4.2. IL-6 생성 억제 효과 실험

DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblast를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H_2O_2 를 N. control을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환해주며 sample을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 중으로 유리된 IL-6를 ELISA kit로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정

량하였다.

2.4.3. COX-2 생성 억제 효과 실험

DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblast를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H_2O_2 를 N. control을 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환해주며 sample을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 증으로 유리된 COX-2를 ELISA kit로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

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

DMEM과 Ham's F-12 media를 3 : 1의 비율로 조성하고 FBS를 10 % 농도의 배양액에서 human normal fibroblast를 배양하였다. Fibroblast를 12-well plate에 분주한 후 24 h 동안 배양한다. 그 후 2×10^{-4} M의 H_2O_2 를 N. control를 제외한 모든 well에 처리한다. 8 h 후 배양액을 교환해주며 sample을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 이 중 배양 상등액을 취하여 배양액 증으로 유리된 total NO를 ELISA kit로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과

3.1.1. Mn-SOD 생성 억제 효과

라디칼 생성에 의해 생체 내에서 항산화 효소인 Mn-SOD의 활성이 증가되는데, 라디칼을 적절히 제거할 수 있는 항산화물질이 존재하면 그 활성은 정상 수준으로 회복[17]되므로 산화적 스트레스에 대해 우슬 다당이 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다. 우슬 다당 추출물이 농도 의존적으로 Mn-SOD 생성을 억제하는 것을 그래프에서 확인할 수 있다. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 8 %, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 30 %의 효과를 나타내어 농도 의존적으로 Mn-SOD 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 1).

3.2. 항염 효과

3.2.1. IL-1 α 생성 억제 효과

IL-1은 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증 매개

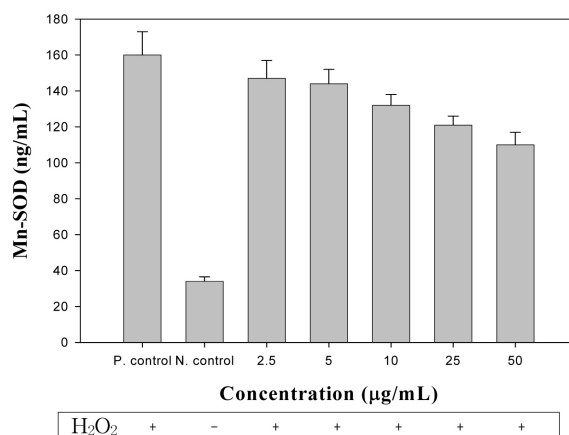


Figure 1. Effect of polysaccharide from *Acyranthes bidentata* on H_2O_2 induced Mn-SOD in human fibroblast cell. N. control : negative control (H_2O_2 , -), P. control : positive control (H_2O_2 , +).

성 cytokine이다. IL-1은 두 개의 유전자 산물인 IL-1 α 와 IL-1 β 가 있다. IL-1 α 는 전염증성조절인자(pro-inflammatory mediator)로 작용하는 세포간 신호물질로, 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-1 α 의 생성을 유도시킨 후 우슬 다당 추출물이 IL-1 α 의 생성을 억제하는지를 측정하였다. 우슬 다당 추출물이 IL-1 α 생성 억제 효과를 강하게 나타내는 것을 그래프에서 확인할 수 있다. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 20 %의 효과를 나타내었고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 40 %의 IL-1 α 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 2).

3.2.2. IL-6 생성 억제 효과

IL-6는 감염과 조직 손상에 따른 생체의 주요한 반응 매개물질로서, 23 ~ 30 kD의 다양한 크기를 갖는 인산화 당단백 폴리 펩타이드이다. IL-6 유전자 발현은 TNF- α , IL-1, IFN과 같은 다양한 염증반응성 매개물질에 의해 자극된다. 일반적으로 IL-6는 섬유아세포, 단핵세포, 대식세포, 내피세포, 각질세포, 자궁 내막 간질세포에서 생성되어 급성 염증 반응을 촉진하거나 억제시키는 것으로 알려져 있다[19,20]. 우슬 다당 추출물이 IL-6 생성 억제 효과를 나타내는 것을 그래프에서 확인할 수 있다. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 10 %의 효과를 나타내었고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 30 %의 IL-6 생성 억제 효과를

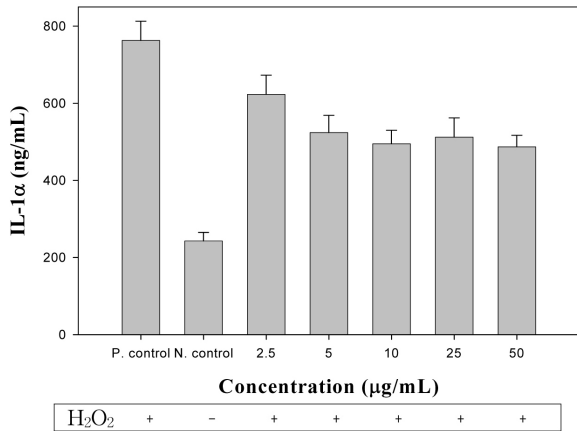


Figure 2. Effect of polysaccharide from *Acyranthes bidentata* on H₂O₂ induced IL-1 α in human fibroblast cell. N. control : negative control (H₂O₂, -), P. control : positive control (H₂O₂, +).

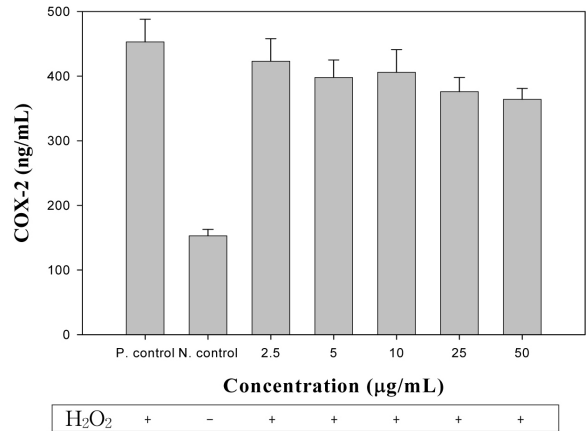


Figure 4. Effect of polysaccharide from *Acyranthes bidentata* on H₂O₂ induced COX-2 in human fibroblast cell. N. control : negative control (H₂O₂, -), P. control : positive control (H₂O₂, +).

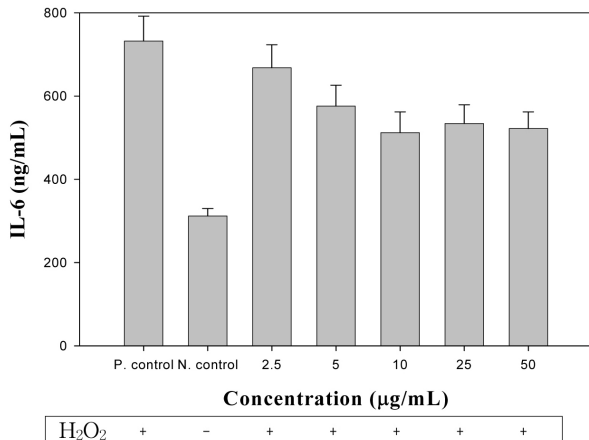


Figure 3. Effect of polysaccharide from *Acyranthes bidentata* on H₂O₂ induced IL-6 in human fibroblast cell. N. control : negative control (H₂O₂, -), P. control : positive control (H₂O₂, +).

나타내었다(Figure 3).

3.2.3. COX-2 생성 억제 효과

Prooxidant나 proinflammatory stimuli에 의해 NF-κB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin 합성을 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다[21,22]. 우슬 다당 추출물이 COX-2 생성 억제 효과를 나타내는 것을 그래프에서 확인할 수 있다. 2.5 μg/mL에서 6%의 효과를 나타내었고, 50 μg/mL에서 20%의 COX-2 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 4).

3.2.4. Total NO (Nitric Oxide) 생성 억제 효과

Nitric oxide (NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대항하는 면역 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[23,24]. iNOS는 원충, 세균이나 암세포를 사멸시키기 위한 숙주의 방어기전으로 다량의 NO를 만들어내지만 정상 농도의 수천 배에 달하는 NO는 오히려 자가면역질환이나 만성염증의 원인이 되기도 한다[25]. 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜[26], prostaglandin 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키고[27], 패혈증 환자에게서 septic shock를 일으키는 것으로 보고되었다[28]. 또한 NO는 superoxide anion (O₂⁻)와 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다[29]. 우슬 다당 추출물이 total NO 생성 억제 효과를 나타내는 것을 그래프에서 확인할 수 있다. 2.5 μg/mL에서 16%, 50 μg/mL에서 30% 정도의 total NO 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 5).

4. 결 론

본 연구는 우슬 다당 추출물의 화장품 원료로서의 특성을 알아보기 위하여 항산화(Mn-SOD 생성 억제) 및

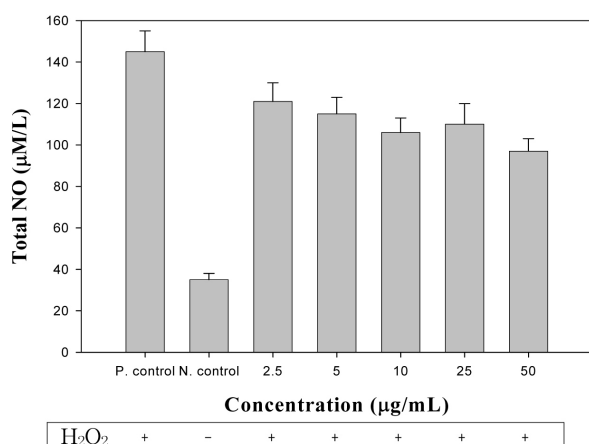


Figure 5. Effect of polysaccharide from *Achyranthes bidentata* on H₂O₂ induced Total NO in human fibroblast cell. N. control : negative control (H₂O₂, -), P. control : positive control (H₂O₂, +).

항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제) 효과에 대한 연구를 진행하였다.

항산화 효과를 측정하기 위한 Mn-SOD 생성 억제 실험에서 2.5 μ g/mL에서 8 %, 50 μ g/mL에서 30 %의 효과를 나타내었다. 항염 효과를 측정하기 위한 실험으로 IL-1 α , IL-6, COX-2 그리고 total NO 생성 억제 실험에서 실시하였다. IL-1 α 생성 억제 실험결과 2.5 μ g/mL에서 20 %, 50 μ g/mL에서 40 %의 효과를 나타내었고, IL-6 생성 억제 실험결과 2.5 μ g/mL에서 10 %, 50 μ g/mL에서 30 %의 효과를 나타내었다. COX-2 생성 억제 실험결과 2.5 μ g/mL에서 6 %, 50 μ g/mL에서 20 %의 효과를 나타내었고, total NO 생성 억제 실험결과 2.5 μ g/mL에서 16 %, 50 μ g/mL에서 30 %의 효과를 나타내어 우슬 다당 추출물은 Mn-SOD, IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제 효과에 대해 농도 의존적인 모습을 보여주었다.

위의 실험 결과들을 종합해 보면, 우슬 다당 추출물은 항산화(Mn-SOD 생성 억제) 및 항염(IL-1 α , IL-6, COX-2, total NO 생성 억제) 효과를 가진 화장품 원료로서의 개발 가치가 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

감 사

이 연구는 재단법인 바이오신약장기사업단(KBRDG)의 바이오신약장기사업과제로 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. C. S. Yook, Pharmacology, 24, Hakchangsa, Seoul (1993).
2. P. S. Ratra and K. C. Misra, Seasonal variation in chemical composition of *Achyranthes aspera* and *A. bidentata*, *Indian Forester*, **96**, 372 (1970).
3. S. T. Lee and Y. A. Chae, Cultivation of the medicinal plant, 159, Hyangmonsas, Seoul (1996).
4. I. H. Park, S. R. Lee, S. D. Lee, and W. S. Song, Cultivation of the medicinal plant, 281, Sunjin Munhwasa, Seoul (1993).
5. Z. E. Selvanayagam, S. G. Gnanavendan, K. Balakrishnan, and R. B. Rao, Antinake venom botanicals from Ethnomedicine, *J. Herbs Spices Med. Plants*, **2**, 45 (1994).
6. G. Bishit, H. Snadhu, and S. Verma, Constituents of *Achyranthes bidentata*, *Fitoterapia*, **64**, 85 (1993).
7. Y. S. Chang, C. Y. Chen, and L. K. Ko, Studies on the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* Blume, *J. Chin. Med.*, **8**, 177 (1997).
8. P. Kim, K. I. Hyeon, J. Y. Chung, S. S. Yoon, H. C. Kang, S. H. Park, K. I. Ko, and K. H. Kim, A low irritant liquid cleanser composition developed by multi-screening methods, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**(1), 51 (2005).
9. K. Rajnarayana, R. M. Sripal, and M. R. Chaluvadi, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, *Indian J. Pharmacol.*, **33**, 2 (2001).
10. R. K. Singh and B. L. Pandey, Further study of anti-inflammatory effects of *Abies pindrow*, *Phytotherapy Research*, **11**, 535 (1997).
11. D. R. Hahn and M. W. Lee, Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (I) - oleanolic acid bisdesmoside from the root, *J. Pharm. Soc. Korea*, **35**(6), 457 (1991).
12. A. C. Mitaine-Offer, A. Marouf, C. Pazza, T. C. Khanh, B. Chauffert, and M. A. Lacaille-Dubois, I. Bidentatoside, A new triterpene saponin from *Achyranthes bidentata*, *J. Nat. Prod.*, **64**(2), 243 (2001).
13. K. A. Kim, J. S. Lee, H. J. Park, J. W. Kim, C. J.

- Kim, I. S. Shim, S. M. Han, and S. Lim, The inhibitory effect of *Achyranthes bidentata radix* extracts on cytochrome P450 catalyzed reactions in human liver microsomes, *J. Korean Oriental Med.*, **24**(2), 40 (2003).
14. K. S. Lee, J. I. Lee, J. K. Lee, J. Lee, G. D. Kim, and M. J. Oh, Inhibition effect of *Achyranthes japonica* N. root extract on cathepsin B, *Korean J. Food Preserv.*, **12**(3), 275 (2005).
 15. E. A. Seo and H. C. Moon, Effects of radix *Achyranthis bidentatae* extract on proliferation and differentiation in human osteoblast-like cells, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **18**(6), 1821 (2004).
 16. H. G. Kang, J. W. Hong, H. J. Han, Y. Y. Hwang, J. Y. Jeong, and K. N. Lee, Effects of methanol extract of radix *Achyranthis bidentatae* on cadmium inhalation, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **18**(6), 1784 (2004).
 17. 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).
 18. 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).
 19. 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)
 20. T. Kishimoto, The biology of interleukin 6, *Blood*, **74**, 1 (1989).
 21. 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).
 22. Y. J. Surh, K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, and S. S. Lee, Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals : down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation, *Mutat. Res.*, **480**, 243 (2001).
 23. L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byms, and G. Chaudhuri, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(24), 9265 (1987).
 24. J. A. Angus and T. M. Cocks, Endothelium-derived relaxing factor, *Pharmacol. Ther.*, **41**, 303 (1989).
 25. 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).
 26. 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. USA*, **90**, 7240 (1993).
 27. 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).
 28. 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).
 29. 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).