

잘피 추출물의 UVB로 손상을 유도한 각질형성세포에 대한 항염 효능

김보애^{#*}

목원대학교 테크노과학대학 생의약화장품학부

Anti-inflammation effect of extract from *Zostera marina* using UVB-induced damage on keratinocytes

Bo-Ae Kim^{#*}

Division of Biomedical & Cosmetics, College of Sciences & Technology,
Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : In order to confirm whether extracts of different parts of *Zostera marina* (ZM), a marine flowering plant, can be used as cosmetic ingredients, this study evaluated their cytotoxicity and cytoprotective effects against ultraviolet B (UVB). Inflammatory responses induced by UV stimuli are also associated with the aging of the skin.

Methods : We investigated the effects of ZM extracts on cells through the water soluble tetrazolium salt-1(WST-1) assay for cell viability. In order to investigate the anti-inflammatory effects, we evaluated the suppression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by ZM extracts in HaCaT cells with UVB-induced damages, and also evaluated the production of Prostaglandin E₂ (PGE₂) in RAW 264.7 cells with LPS-induced damages.

Results : High cell viabilities above 90% were observed in all types of ZM extracts, except for whole ZM extract at 0.5 mg/ml; in keratinocytes with UVB-induced damages, the cell viabilities were above 80% when treated with all types of ZM extracts. We confirmed their anti-inflammatory effects by investigating the suppression of inflammatory mediators. In keratinocytes with UVB-induced damages, COX-2 expression decreased in the experimental group treated with ZM extract. Similarly, in RAW 264.7 cells where inflammation was induced with LPS, the biosynthesis of PGE₂ was inhibited.

Conclusion : These results suggest that ethanol extracts from *Zostera marina* may have value as the potential anti-inflammatory medicinal plant. Also based on the abovementioned results, ZM extract protects skin cells from UV-induced damages, and thus can be used in topically applied products for skin protection.

Key words : *Zostera marina*, Ultraviolet radiation, Cytoprotective effect, Anti-inflammation

I. 서 론

피부는 외표를 덮는 신체 기관으로 화학적, 물리적, 생물학적 환경에 직접적으로 영향을 받으며 피부장벽 역할을 수행하며 생체의 일차적인 방어 기능을 담당하는 기관이다. 외부 환경의 자극, 특히 UV파장은 피부 속 진피층까지 침투하여 조직에 홍반, 열, 부종, 통증, 소양증, 염증 등을 야기하며 UVB는 UV 중 가장 활발한 활성을 나타내는 파장으로 진피층에 도달하여 세포손상 및 Reactive oxygen species(ROS)를 생성하고

유전독성 및 장애를 일으킨다¹⁾. UV로 인해 생성된 체내의 ROS는 미생물 및 오염물질을 제거하는데 중요한 역할을 하지만 superoxide, lipid peroxy radical, hydrogenperoxide 등이 포함 되어있는 과량의 ROS가 발생될 경우 interleukin-1 (IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등 다양한 cytokine(pro-inflammatory cytokine)의 생산과 분비를 촉진시키고²⁾, 조직 손상을 유발하여 피부세포에 과도한 염증반응을 유발한다³⁾.

염증은 조직의 손상, 내독소, 병원체 감염과 같은 자극으로

*#Corresponding author and First author : Bo Ae Kim, Division of Biomedical & Cosmetics, College of Sciences & Technology, Mokwon University.

· Tel : +82-42-829-7569 · E-mail : kba@mokwon.ac.kr

· Received : 30 June 2016 · Revised : 17 July 2016 · Accepted : 18 July 2016

부터 신체를 보호하는 과정에서 일어나는 반응이며⁴⁾, UVB가 조사될 경우 국소적으로 염증반응이 발생한다. 염증을 일으키는 또 다른 반응은 대식세포(macrophage)와 병원체의 Lipopolysaccharide(LPS)가 반응하여 일어나는데⁵⁾, TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine을 생성하고 이들은 T세포, B세포의 활성화에 관여하여 Inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 Cyclooxygenase-2 (COX-2)의 생성을 유도한다. 이들은 iNOS와 COX-2는 각각 Nitric oxide(NO)와 Prostaglandin E₂ (PGE₂)생산을 유도하고 염증반응을 일으킨다⁶⁾.

UV의 자극으로 인해 유발된 염증반응은 피부 노화에도 관련된다. 피부의 최외각에 위치한 각질형성세포는 외부의 자극을 받으면 여러 가지 cytokine을 생성하게 되며, 시냅스를 통한 전달로 주위의 각질세포에서도 cytokine을 생성한다. 이로 인한 ROS의 증가는 세포핵에 위치한 active transcription factor인 AP-1을 자극하여 진피와 표피에서의 collagen 분해 효소인 MMPs(Matrix Metallo proteinase)의 발현을 촉진하고 진피 세포인 fibroblast의 collagen 유전자 발현을 방해하여 피부 내 탄력을 저하시키고 주름이 생성되면서 피부노화를 야기한다⁷⁾. 결국 피부세포는 UV로 부터 지속적으로 장기간 노출되어 피부에서의 염증반응과 함께 노화를 가속화하기 때문에 유해 파장으로부터 세포를 보호할 필요가 있다.

본 연구에 사용된 잘피 (*Zostera Marina*)는 바다 식물 가운데 유일하게 뿌리로 영양을 흡수하고 햇빛을 받아 꽃을 피우는 현화식물이다. 잘피에 대한 연구로는 잘피속에 속하는 애기거머리말 (*Zostera japonica*)의 항산화활성, 항염증, 암세포 증식 억제 효과가 밝혀졌으며, 거머리말 (*Zostera asiatica*)은 인체 암세포에 대한 세포독성 효과 대한 것이 보고된바 있다⁸⁾. 그러나 이러한 연구들은 식품 분야에 국한하여 연구가 이루어져 왔으며 피부에서의 생리활성 검증 혹은 화장품 소재로서의 연구는 부족한 실정이다.

본 실험에서는 잘피의 피부에서의 약리활성 가능성을 다양하게 연구하고자 전체(*Zostera marina* Whole), 뿌리(*Zostera marina* Root), 잎줄기(*Zostera marina* Leaf · stem)로 부위를 나누어 실험을 진행 하였다. WST-1 assay를 통해 잘피 부위별 추출물이 세포에 미치는 영향을 평가하였으며, UVB로 손상을 유도한 human keratinocyte (HaCaT cells)에서 잘피의 세포보호효과를 확인하였다. 항염증 효과를 확인하기 위해 UVB로 손상을 유도한 HaCaT cells에서 잘피추출물의 COX-2 발현 억제효과를 평가하였고, LPS로 손상을 유도한 RAW 264.7 cell에서 PGE₂생성수준을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 잘피는 건조하여 전체, 뿌리, 잎 · 줄기 부분으로 나누어 분쇄한 다음 이를 70% 에탄올에 24시간 동안 상온에서 침지 추출하였고 추출물을 감압 여과한 다음 저온 회전 농축기로 농축하였다.

세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100

$\mu\text{g/ml}$ streptomycin을 혼합한 배지를 사용하였으며, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂세포배양기에서 배양하였다. 실험을 위해 HaCaT 세포에 UVB를 300~315nm의 파장에서 400mJ/cm²로 6시간 동안 노출시켰으며 RAW 264.7세포에는 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 함유한 배지를 처리하여 세포에 염증반응을 유도하였다.

2. 세포독성평가

세포 생존율을 측정하기 위한 실험은 water soluble tetrazolium salt-1(WST-1) assay 방법을 이용하였다. HaCaT cell은 96-well plate에 4 × 10³ cell/well 농도로 분주하여 24 시간 배양 후 잘피 시료를 각각 1,00, 0.50, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 세포 배양 후 WST-1 solution을 well 당 10 μM 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양하였고, Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. UVB 손상을 유도한 세포보호효과 평가

UVB조사로 인한 세포독성 및 산화적 세포사멸에 대한 잘피 추출물의 보호 효과를 확인하기 위해 HaCaT 세포에 손상을 유도하고 동시에 검액 및 새로운 배지를 넣고, 24시간 배양하였다. 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 처리하여 1시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 평가

세포에 적당량의 RIPA lysis buffer(RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μl + protease inhibitor 10 μl)를 첨가하여 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시키고 원심분리하였다. 상층액의 단백질 농도를 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 sample을 제조하였다. 이후 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk로 blocking을 실시하고 PBS로 세척하였다. 그리고 1차 antibody와 2차 antibody를 차례로 처리하여 상온에서 반응시켰다. PBS로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 처리 후 X-ray film에 감광시켜 단백질 함량을 분석하였다.

5. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 측정

RAW 264.7 cell을 1.8 × 10⁵ cell/s/ml로 24-well plate에 분주하고 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 세포손상을 유도함과 동시에 시료를 처리하였다. 24시간 후 12,000 rpm에서 3분동안 원심분리하여 획득한 상층액의 PGE₂ 함량을 측정하였다. 배양액을 96-well plate에 각각의 배양액을 100 μl 씩 loading하고 여기에 primary antibody solution 50 μl 와 PGE₂ conjugate 50 μl 씩 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 처리하여 반응시키고 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 추출물의 세포독성 평가 결과

잘피 부위별 추출물을 처리했을 때 HaCaT 세포에서의 생존율을 알아보기 위해 HaCaT 세포에 잘피 추출물을 처리하였고 24시간 동안 배양한 후 WST-1 assay로 측정하였다. 세포 생존율은 잘피 전체 추출물 0.50 mg/ml 농도를 제외한 모든 잘피 시료에서 90%이상의 생존율을 확인하였다(Fig. 1). 잘피 전체 추출물 1.00 mg/ml와 0.25 mg/ml 에서는 각각 113.0%와 114.7%로 대조군 보다 약 10%이상의 생존율을 보였으나 0.50 mg/ml에서는 78.0%로 대조군 보다 22% 감소한 것을 확인하였다. 잘피 뿌리 추출물 1.00, 0.50, 0.25 mg/ml의 농도에서 각각 102.3%, 100.0%, 94.4%로 농도의존적으로 생존율이 감소하는 것을 볼 수 있으며 1.00 mg/ml에서는 근소하게 생존율이 증가함을 확인하였다. 잘피 잎줄기 추출물 1.00, 0.50, 0.25 mg/ml의 농도에서 각각 113.6%, 116.4%, 108.0%로 세포 생존율이 대조군보다 증가함을 확인하였고 잘피 잎줄기가 부위별 추출물중 가장 높은 생존율을 보인 것을 확인하였다.

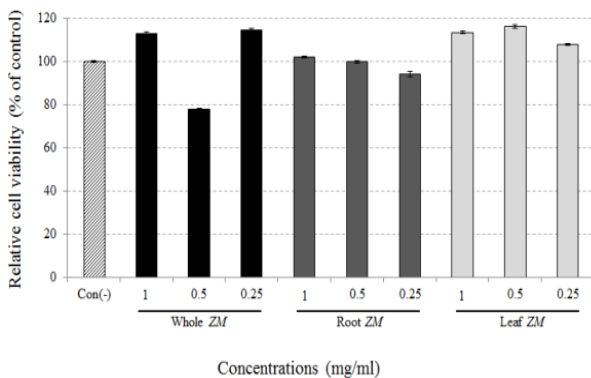


Fig. 1. Cell viability was measured by a water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay. In order to measure *Zostera marina*(ZM) toxicity, the cells were treated with the indicated concentrations of ZM.

2. UVB 손상으로 부터 세포보호효과

UVB로 유도된 각질형성세포인 HaCaT 세포의 손상 및 독성에 대한 잘피 추출물의 보호효과를 확인하기 위해 세포에 UVB로 손상을 유도함과 동시에 잘피 부위별 추출물을 농도별로 처리하였고 24시간 배양 후 세포생존율을 측정하였다. 또한 UVB를 조사한 군과 조사하지 않은 군을 대조군으로 하여 실험을 진행 하였다. 그 결과 잘피 부위별 추출물을 처리했을 때 세포 생존율은 잘피 뿌리 추출물 0.50 mg/ml농도를 제외한 모든 시료에서 80%이상인 것을 확인하였고 잘피 뿌리 추출물 0.50 mg/ml농도 또한 79.8%로 다른 잘피 부위별 시료와 유사한 높은 생존율을 나타내었으며, 60%이하의 세포생존율을 나타내는 UVB 조사 대조군 보다 약 24% 높은 세포생존율을 확인하였다 (Fig. 2).

잘피 전체 추출물 1.00, 0.50, 0.25 mg/ml농도에서 각각 81.1%, 83.6%, 83.5%를 나타내었고 잘피 뿌리 추출물에서는 각각 80.9%, 84.5%, 79.8%, 잘피 잎줄기 추출물에서

85.1%, 86.1%, 83.2%를 나타내어 부위별 시료 중 잎줄기 추출물에서 세포 생존율이 가장 높아 세포보호 효과가 가장 높게 나타났으나 부위별 세 가지 시료에서의 생존율은 큰 차이가 없는 것으로 판단된다.

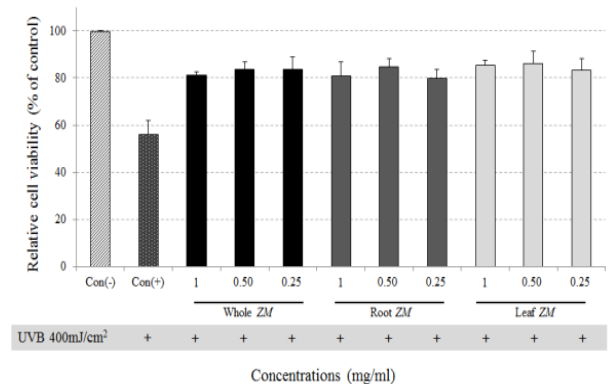


Fig. 2. The effect of ultraviolet B (UVB) radiation on the survival of HaCaT cells. HaCaT cells were treated with or without UVB at the indicated doses for 6 h.

3. COX-2 발현 억제 효과

본 연구에서는 잘피 추출물의 항염증 효과를 확인하고자 염증매개인자인 COX-2의 단백질 발현양을 Western blot을 통하여 측정하였다. 그 결과 UVB를 처리하지 않은 군에서는 COX-2가 낮게 발현되었고 이와 대조적으로 UVB를 단독으로 처리한 군에서는 COX-2 단백질 발현양이 뚜렷하게 증가하였다. 이와 비교했을 때 잘피 전체 추출물을 처리한 군에서는 시료를 처리하지 않은 UVB를 단독 처리한 세포군보다 COX-2 발현이 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).



Figure 3. Effect of extract from *Zostera marina* (ZM) on UVB-induced COX-2 protein expression in HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with ZM before being irradiated with UVB (400 mJ/cm²) for 6 h.

4. PGE₂생성 억제 효과

RAW 264.7 세포에서 잘피 전체 추출물에 대하여 염증유발 매개체인 PGE₂의 생성 억제 효능을 평가하였다. 정상군에서는 PGE₂의 생합성이 1102.2 pg/ml로 나타나는 반면 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 cell의 경우 PGE₂의 생합성이 11,105.07 pg/ml로 나타났다. 반면 잘피 추출물을 처리한 세포의 경우 PGE₂가 8,498.27 pg/ml로 잘피 시료를 처리하지 않은 양성대조군보다 23.47% 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

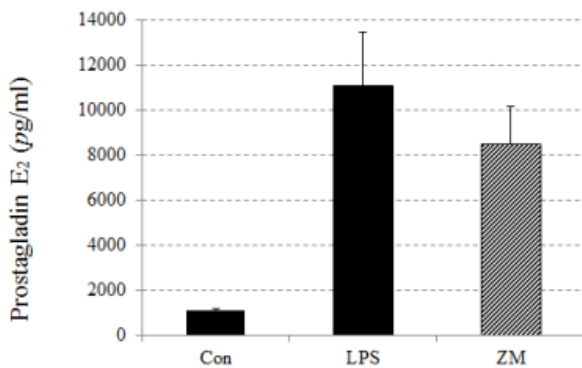


Fig. 4. Effect of extract from *Zostera marina* (ZM) on LPS-induced PGE₂ productions in Raw 264.7 cells

IV. 고찰

염증이 일어나면 염증매개 물질인 NO와 Prostaglandins (PGs) 그리고 염증성 cytokine 등이 분비된다⁹⁾. 이 중 면역 질환의 경우 가장 널리 알려진 대표 유전자 중의 하나인 COX-2는 PG와 leukotrienes의 생합성을 매개로 하는 효소로서 염증을 포함한 여러 가지 질환을 일으키는 인자이다. COX는 I형과 II형의 두 가지 이형질체가 존재하는데¹⁰⁾, I형 효소인 COX-1은 대표적인 생리작용인 위장세포 보호 및 신장의 기능 유지, 그리고 혈소판 응집과 같은 생리 기능 유지와 관련 있는 효소임에 반해¹¹⁾ II형인 COX-2는 cytokine, 자외선과 같은 외부 자극에 의해 발현이 유도되어 염증과 압 등의 각종 퇴행성 질환 억제에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{12,13)}. 최근 정상적인 생리 기능은 유지하면서 염증반응을 감소시키기 위해 COX-2만 선택적으로 억제하려는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁴⁾. 본 연구에서는 잘피 추출물의 항염증 효과를 확인하고자 염증매개인자인 COX-2의 단백질 발현양을 측정하고 UVB를 처리하지 않은 음성대조군에서는 COX-2 발현이 낮았으며, UVB를 단독으로 처리한 양성대조군에서는 COX-2 단백질 발현양이 증가하였다. 반면 잘피 전체 추출물을 처리한 군에서는 양성대조군보다 COX-2 발현이 감소되었다(Fig. 3). 이상의 결과로 볼 때 잘피 추출물은 자외선에 의해 증가된 COX-2 발현을 억제하여 일련의 염증 반응을 최소화함으로써 PGE₂생성 저해작용에 관여하고 생체 조직의 염증과 관련되는 증상을 완화하여 줄 수 있을 것으로 사료된다. COX-2 발현에 의해 생성된 PGE₂는 염증반응시 나타나는 통증, 부종, 홍반과 같은 증상의 원인일 뿐만 아니라 세포증식에 영향을 주어 각종 질병의 유발에 관여한다. 따라서 PGE₂ 생성에 있어서 잘피 추출물이 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같으며, 결과에서 알 수 있듯이 정상군인 음성대조군의 경우에는 PGE₂ 생성의 증가가 나타나지 않았지만, LPS를 단독으로 처리한 양성대조군에서는 PGE₂ 생성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 반면 LPS 처리에 의한 PGE₂의 생성 증가는 잘피 추출물에 의하여 억제됨을 확인할 수 있었으며, 즉, 잘피 추출물은 COX-2의 발현 억제와 이로 인한 PGE₂의 생성 저해로 이어지는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 잘피 추출물로 인해 LPS에 의한 염증 과정에서 중요한 매개인자인 COX 및 PGE₂의 감소가 일어나

므로 전체적인 염증의 진행이 억제되고 있다는 사실로 확인할 수 있었다. 일반적으로 Raw 264.7세포에 LPS 처리 시 주로 COX-2가 증가되는데 본 실험에서 잘피 추출물이 PGE₂ 생성을 억제한다는 것은 COX-2 감소가 PGE₂ 생성 억제에 의한 것으로도 볼 수 있다. 염증억제관련 물질들은 작용기전이 prostaglandin합성의 억제를 나타내는데 이는 COX-2의 활성 저해에 의한 것이라는 점과 잘피 추출물에 의한 항염작용기전이 유사할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 잘피 추출물의 UVB 조사에 의한 손상 및 LPS에 의한 염증반응으로부터 세포보호 효능연구와 추출물의 항염증효능에 대해 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HaCaT 세포에 잘피 부위별 추출물을 처리하여 WST-1 assay를 통해 세포의 생존율을 확인한 결과 잘피 전체 0.5 mg/ml 시료를 제외한 모든 잘피 추출물에서 90% 이상의 높은 생존율을 보였다.
2. UVB로 손상을 유도한 HaCaT 세포에서 잘피 추출물의 세포보호효과를 확인하고자 WST-1 assay를 이용하여 실험한 결과 모든 잘피 추출물에서 세포의 생존율이 80%이상으로 잘피의 UVB에 대한 세포보호효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.
3. UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 잘피 추출물을 처리한 세포의 경우 COX-2 발현이 감소된 것을 확인하였고 이는 잘피 추출물이 염증매개인자인 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. 또한 COX-2의 유도로 생성되는 PGE₂의 생합성 저해정도를 확인하기 위해 LPS로 손상을 유도한 RAW 264.7 세포에 잘피 추출물을 처리한 후 염증 매개체인 PGE₂의 함량을 측정하고 잘피 추출물에 의해 감소되는 것을 확인하였다.

따라서 잘피 추출물은 자외선으로 인한 손상으로부터 피부 세포를 보호하는 기능과 동시에 염증매개인자를 감소하는 효과를 나타내므로 피부보호를 위한 외용제의 활용 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국산업단지공단 생산기술사업화 지원사업의 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee HJ, Kim JC, Moon CJ, Jung U, Jo SK, Jang JS, Kim SH, Evaluation of the Photoprotective Effect of

- Dongchongxiacao (*Paecilomyces japonica*) Extract against Ultraviolet Radiation-induced Skin Wrinkling and Cancer, *Journal of radiation protection*, 2012 ; 37 : 50-55.
2. Ansel J, Luger TA, Lowry D. The expression and modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes. *J. Immunol.* 1988 ; 140 : 2274-2278.
 3. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 2005 ; 571 : 107-120.
 4. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Anti-inflammatory Activity of a High-molecular-weight Cranberry Fraction on Macrophages Stimulated by Lipopolysaccharides from Periodontopathogens. *Journal of dental research*. 2006 ; 85 : 235-239.
 5. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992 ; 267 : 25934-25938.
 6. Tsan M. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2006 ; 16 : 32-37.
 7. Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, Nash JF. In vitro assessment of the broad-spectrum ultra violet protection of sunscreen products. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000 ; 43 : 1024-1035.
 8. Kim JH, Cho YH, Park SM, Lee KE, Lee JJ, Lee BC, Pyo HB, Song KS, Park HD, Yun YP. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res*. 2004 ; 27 : 177-183.
 9. Romier-Crouzet B, Van De Walle J, During A, Joly A, Rousseau C, Henry O, Larondelle Y & Schneider Y-J. Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2009 ; 47 : 1221-1230.
 10. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998 ; 38: 97-120.
 11. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity : A full in vitro analysis. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999 ; 96 : 7563-7568.
 12. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994 ; 91 : 12013-12017.
 13. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994 ; 91 : 3228-3232.
 14. Golden BD, Abramson SB. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 1999 ; 25 : 359-378.