

## 종대황 추출물의 COX-2 활성 억제 효과

하혜경 · 이제현 · 김정숙\*  
한국 한의학 연구원 신약개발팀

### Extracts of *Rheum undulatum* L. Inhibits COX-2 Activities in Lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 Cells

Hye-Kyung HA, Je-Hyun LEE and Chungsook KIM\*

Drug Research and Development Team, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11, Chungdam-dong, Chungarm building, Kangnam-ku, Seoul, 135-100, Korea.

(Received February 21, 2000; accepted March 15, 2000)

**Abstract**—*Rheum undulatum* L. has been used as Rhei Radix in Korean Pharmacopea although their pharmacological effects were not studied much. In this study, we tested anti-inflammatory effect as a representative activity of *Rheum undulatum* L. extracts using cyclooxygenase (COX)-2 inhibition. Murine macrophage, Raw 264.7 cells were incubated with lipopolysaccharide (1 µg/ml) to induce COX-2. The prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) levels as an indicator of COX-2 activity were determined in the culture medium using ELISA. Inhibition of acetylsalicylic acid (ASA) as a standard, aloe-emodin, emodin, chrysophanol, rhein, 80% ethanol extract of *Rheum undulatum* L. (Ex) and ether fraction (Fr) after acid hydrolysis of *Rheum undulatum* L. were tested in induced COX-2 described above. IC<sub>50</sub> values were 0.082 µg/ml for ASA, 181 µg/ml for aloe-emodin, 3.65 µg/ml for emodin, 144 µg/ml for chrysophanol, 39.8 µg/ml for rhein, 141 µg of herb/ml for Ex, and 95.7 µg of herb/ml for Fr. We found that Ex and Fr of *Rheum undulatum* L. were more effective than other anthraquinones, since their IC<sub>50</sub> are lower than others.

**Keywords** □ *Rheum undulatum* L., anti-inflammation, cyclooxygenase-2, prostaglandin E<sub>2</sub>, anthraquinone

대황(Rhei radix et rhizoma)의 기원식물은 한국, 일본, 중국 등에서 공통적으로 掌葉대황(*Rheum palmatum* L.<sub>TNNE</sub>), 唐古特大황(*Rheum tanguticum* M<sub>AXIM</sub> et. B<sub>ALF</sub>), 藥用대황(*Rheum officinale* B<sub>AILL</sub>.)을 사용하고 있으며, 일본에서는 이들의 중간잡종도 사용하고, 한국에서는 종대황(*Rheum undulatum* L.<sub>INNÉ</sub>)도 사용한다(한 등, 1996). 대황은 여뀌과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본인 장군풀의 뿌리줄기로 瀉下약으로 사용되는 대표적인 생약이다. 대황의 주성분은 sennoside류 및 anthraquinone계의 emodin, alo-emodin, rhein, chrysophanol 등이 알려져 있으며, sennoside는 경구투여시 장내 세균에 의해 분해되어 rhein anthrone이 되어 sennoside와 함께 사하작용을 나타내며, 그 밖에 항응혈작용, 해열, 소염, 진통, 항균작용 등도 보고되어 있다(Han 등, 1989; Lemli, 1988). 특히 대황의 대표작용의 하나인 청열작용은 일종의 염증작용을 억제하는 것으로 추정된다.

염증의 억제는 크게 phospholipase 저해제, lipoxygenase 저해제 및 cyclooxygenase(COX)의 저해제의 작용으로 나

눌 수 있다. 이 eicosanoids의 생합성과정 중 염증 반응은 cyclooxygenase(COX)에 의해 진행되며 대부분의 조직에서 정상적인 상태에서 발견되는 COX-1과 일부 신생조직과 특이 생리적 환경에 의해 염증의 부위에서 활성이 증가되는 COX-2가 있다(Golden과 Abramson, 1999). COX-2에 의해 생성되는 PGE<sub>2</sub>의 합성은 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)에 의해 억제되어 해열, 진통, 항염작용 등에 응용되며, 항염증제로 류마티즘성 관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염(osteoarthritis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis) 같은 근육골격질환에 사용된다. 반면에 NSAIDs는 장기간 복용하거나 위장이 약한 사람이 복용할 때, COX-1의 활성 억제로 추정되는 prostaglandins의 생합성 억제로 위궤양 또는 장궤양을 유발하는 경향도 있으며, 과다출혈로 인한 이차적인 빈혈을 일으킬 수도 있고, thromboxanes의 억제제로 인한 혈소판 기능장애가 유발되기도 하는 등의 부작용이 있어(Isselbacher 등, 1994) 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 염증의 매개물질인 eicosanoids의 생합성에 관계된 COX-2의 활성을 억제하면 염증반응을 감

\*To whom correspondence should be addressed.

소시킬 수 있다는 것에 착안하여 Engelhardt(1996)의 PGE<sub>2</sub>를 정량하여 COX의 활성도를 측정하는 방법으로 우리나라에서 흔히 사용하는 종대황의 여러 가지 추출물의 COX-2 활성 억제 효과를 검색하였다(Kelly 등, 1989; Patel 등, 1999).

## 실험방법

### 시약 및 재료

Aspirin(acetylsalicylic acid; ASA), aloe-emodin(1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-anthraquinone), chrysophanol(1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone), emodin(1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone), rhein(1,8-dihydroxyanthraquinone-3-carboxylic acid), arachidonic acid, lipopolysaccharide(LPS), dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A)의 제품이었다고 다른 모든 시약들은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

세포주는 murine macrophage cell line인 Raw 264.7(한국세포주은행)을, penicillin, streptomycin, FBS(fetal bovine serum), RPMI 1640 배지(이상 Gibco BRL, U.S.A.), 24-well plate, culture flask(이상 Falcon Co., B & D, U.S.A.), PGE<sub>2</sub> EIA시약(Amersham Life Science, U.K.)들을 사용하였다.

### 생약추출물의 제조

종대황(*Rheum undulatum* L<sub>TINNE</sub>)은 경상북도 영양에서 1997년 11월에 채취한 종대황의 뿌리줄기를 감청후 사용하였으며, 표본으로 일부를 韓國韓醫學研究院에 보관하였다(標本番號 : 98-3-0002). 종대황의 추출물(Ex)은 Lee 와 Kim(2000)의 방법에 따라 종대황 200 g에 80% 에탄올용액 2000 ml를 가하여 24시간 추출한 후 여액을 취하고, 잔사를 동일하게 반복 처리한 후, 여액을 건조하였다. 또한 이 Ex를 0.1 N HCl로 가수분해한 후, 에테르로 추출 건조하여 ether 분획(Fr)을 제조하여 사용하였으며 anthraquinone류의 함량을 HPLC법으로 정량하였다.

### Raw 264.7 세포에서 COX-2 유발 및 약물처리

Raw 264.7 세포배양은 penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml), FBS(5.5%)을 함유하는 RPMI 1640 배지를 사용하였다. COX-2 유발은 배양된 Raw 264.7 세포를 24-well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 LPS(1 µg/ml)를 가한 후 18시간동안 배양하였다. 실험군들은 LPS만 가한 대조군(100% 활성 유발), LPS와 ASA등 여러 가지 약물을 여러 농도로 가한 약물처리군, LPS와 약물을 가하지 않은 군(0% 활성 유발)으로 나누었다. 그 후 각 배지에 arachidonic acid 최종농도가 30 µM가 되도록 가하고

37°C에서 15분간 배양한 후, 상등액을 취하여 PGE<sub>2</sub> 측정까지 -70°C에 보관하였다(Cho 등, 1998).

### PGE<sub>2</sub>의 정량

LPS로 유발된 COX-2에 기인한 PGE<sub>2</sub>의 농도 변화를 assay kit(Amersham, U.K.)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 정량하였다. Goat anti-mouse Ig가 부착되어 있는 96-well plate에 320~2.5 pg/well 농도의 PGE<sub>2</sub> 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE<sub>2</sub>-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE<sub>2</sub>를 각각 50 µl씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline(PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE<sub>2</sub> 혹은 PGE<sub>2</sub>-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)용액 150 µl를 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µl를 가하여 반응을 중단 시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법은 시료의 PGE<sub>2</sub>와 첨가한 PGE<sub>2</sub>-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE<sub>2</sub>의 함량을 계산하였다(Granstrom과 Kindahl, 1978; Granstrom과 Samuelsson, 1978).

## 실험결과

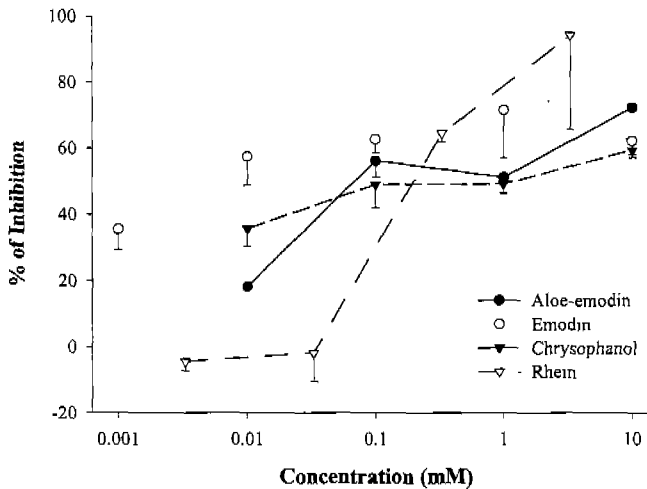
### Raw 264.7 세포에서 anthraquinone류에 의한 PGE<sub>2</sub>의 변화

COX-2의 활성을 나타내는 지표인 PGE<sub>2</sub>의 농도는 Raw 264.7 세포에 LPS 1 µg/ml로 18시간 배양할 때, Table I에서 나타난 바와 같이 LPS를 처리하지 않은 군에 비하여 약 16배 이상 증가되었다. LPS로 인한 COX-2의 활성 증가는 여러 농도의 aspirin, aloe-emodin, emodin, rhein, chrysophanol의 첨가로 용량 의존적으로 감소하였다(Fig. 1). 대조물질로 사용된 ASA의 IC<sub>50</sub>이  $8.16 \times 10^{-2}$  µg/ml( $4.53 \times 10^{-7}$  M)으로 사용된 약물중 가장 낮은 값을 나타냈다. 대황의 주성분인 anthraquinone 류 중에서 관절염의 치료제로도 사용되는 rhein의 IC<sub>50</sub>은  $3.98 \times 10^1$  µg/ml( $1.40 \times 10^{-4}$  M)이었고, aloe-emodin은  $1.81 \times 10^2$  µg/ml( $6.69 \times 10^{-4}$  M), chrysophanol은  $1.44 \times 10^2$  µg/ml( $5.66 \times 10^{-4}$  M)이었다.

**Table I.** PGE<sub>2</sub> concentration by treatment of LPS on Raw 264.7 cells

		Concentration of PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	% of COX-2 activity
Control	(n=4)	461.01 ± 22.04	0
LPS treatment	(n=4)	7517.20 ± 513.13	100

Lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/ml) was treated for 18 hours.

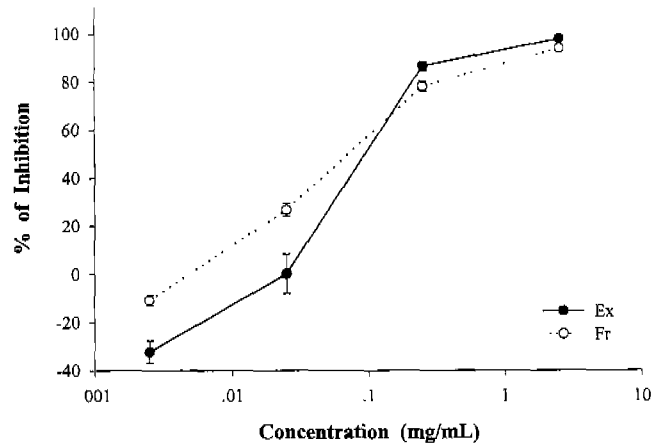


**Fig. 1.** Inhibition (%) of COX-2 activity in various concentrations of anthraquinones. Control was 0% of COX-2 activity in the presence of LPS and 100% of COX-2 activity was defined as LPS treatment only. Symbols are aloe-emodin (●), emodin (○), rhein (▼) and chrysophanol (▽).

Emodin의 IC<sub>50</sub>은 3.64 μg/ml(1.35×10<sup>-5</sup> M)이었고, 사용된 anthraquinone 류 중에서는 COX-2의 활성 억제 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다(Table II).

**Raw 264.7 세포에서 생약추출물에 의한 PGE<sub>2</sub>의 변화**

종대황의 추출물도 Raw 264.7 세포에 LPS 1 μg/ml로 전처리한 COX-2의 활성 증가를 용량 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2.). Ex의 IC<sub>50</sub>는 건조 종대황의 양으로 계산하였을 경우 140.83 μg/ml이었다(Table III). 이 Ex의 IC<sub>50</sub>에 함유된 anthraquinone 류의 함량은 aloe-emodin 8.69×10<sup>-2</sup> μg/ml, emodin 1.85×10<sup>-1</sup> μg/ml, rhein 8.52×10<sup>-3</sup> μg/ml, 및 chrysophanol 6.07×10<sup>-1</sup> μg/ml 이었다. Fr의 IC<sub>50</sub>는 건조 종대황의 양 95.70 μg/ml에 해당하였다. 이 Fr의 IC<sub>50</sub>에 함유된 anthraquinone 류의 함량은 aloe-emodin 1.75×10<sup>-1</sup> μg/ml, emodin 3.38×10<sup>-1</sup> μg/ml, rhein 1.56×10<sup>-2</sup> μg/ml 및



**Fig. 2.** Effects of *Rheum undulatum L.* extracts, Ex and Fr. Symbols are Ex (●) and Fr (○).

chrysophanol 1.02 μg/ml이었다. Ex와 Fr의 IC<sub>50</sub>는 이 추출물에 함유된 해당 anthraquinone 류의 각각의 IC<sub>50</sub> 값의 합보다도 낮았다(Table III).

**고 찰**

대황의 주성분은 dianthrone glycoside인 sennoside류와 anthraquinone류 인 것으로 보고되었으며 anthraquinone류의 하나인 rhein은 항류마티즘 제제로 알려져 있다(Han 등, 1989). 우리나라에서 대황으로 사용되는 종대황은 특히 민간에서 외용약의 형태로 소염제로 사용되고 있다. 본 연구는 종대황이 비록 우리나라에서는 대황과 동일하게 사용되고 있으나 대황과 비교하여 성분 및 효능에 차이가 있어 종대황의 항염증 작용에 대한 간접적인 검증방법으로 COX-2의 활성억제효과를 측정하였다.

관절염의 치료제로는 주로 항염증제와 진통제가 사용되는데 염증반응은 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)에 의해 세포막의 arachidonic acid가 방출되고, 이것이 다시 cyclooxygenase (COX)와 lipoxygenase(LO)에 의해 각각 eicosanoide류인

**Table II.** 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) values of COX-2 activity on RAW 264.7 cells

	Aspirin	Aloe-emodin	Emodin	Chrysophanol	Rhein
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	8.16 × 10 <sup>-2</sup>	1.81 × 10 <sup>2</sup>	3.65	1.44 × 10 <sup>2</sup>	3.98 × 10

IC<sub>50</sub>; 50% inhibition on control value.

**Table III.** Concentrations of anthraquinones at IC<sub>50</sub> of *Rheum undulatum L.* extracts.

	<i>R. undulatum L.</i> (μg/ml)	Aloe-emodin (μg/ml)	Emodin (μg/ml)	Chrysophanol (μg/ml)	Rhein (μg/ml)
Ex	1.41 × 10 <sup>2</sup>	8.69 × 10 <sup>-2</sup>	1.85 × 10 <sup>-1</sup>	6.07 × 10 <sup>-1</sup>	8.52 × 10 <sup>-3</sup>
Fr	9.57 × 10	1.75 × 10 <sup>-1</sup>	3.38 × 10 <sup>-1</sup>	1.02	1.56 × 10 <sup>-2</sup>

IC<sub>50</sub>; 50% inhibition on control value.

prostaglandins, thromboxanes 및 leukotrienes로 되어 이들이 염증반응을 매개한다(Ramwell, 1977; Flower과 Blackwell, 1976). 대표적인 항염증제인 NSAIDs는 COX-2의 억제제이나 장기 복용할 때 나타나는 부작용이 심하므로(Vane JR., 1994) 전통적으로 항염증제로 사용된 종대황이 선택적으로 COX-2 활성을 억제한다면 COX-1의 활성 억제로 인한 부작용 없이 항염증효과를 얻을 수 있는 가능성이 있다. 그러므로 본 연구에서는 COX-2의 선택적인 유발 모델인 LPS 처리 macrophage를 사용하여(Engelhardt, 1996; Cho 등, 1998) 종대황의 추출물과 anthraquinone계 약물인 rhein, aloe-emodin, emodin, chrysophanol의 COX-2 활성 억제 효과를 비교 연구하였으며, 사용한 약물의 대조 약물로는 대표적인 COX 억제제인 ASA를 사용하여 각 약물의 COX-2 억제효과와 비교하였다.

본 연구팀에서 이미 보고한 바와 같이, 종대황의 80% 에탄올 추출물인 Ex의 anthraquinone 류의 함량은 건조 종대황에 대해 chrysophanol 4301.59 µg/g, emodin 1312.74 µg/g, aloe-emodin 616.02 µg/g, rhein 60.43 µg/g의 순으로 나타났고, 산기수분해 에테르 분획인 Fr의 함량은 역시 건조 종대황에 대해 chrysophanol 10621.31 µg/g, emodin 3529.82 µg/g, aloe-emodin 1829.92 µg/g, rhein 162.55 µg/g 으로 80% 에탄올 추출물 Ex보다는 산기수분해한 에테르 분획인 Fr의 경우에 anthraquinone 류의 함량이 더 높았다(Lee와 Kim, 2000). 결과적으로 종대황에 존재하는 anthraquinone 류들은 대부분이 결합형으로 종대황의 1.61%에 해당했으며, 유리형은 종대황의 0.63% 이상인 것으로 측정되었다.

대조 약물로 사용된 ASA의 COX-2 활성에 대한 IC<sub>50</sub>는 인간 관절의 연골세포에서 29.3 µM(Blanco FJ 등, 1999)와 인간 혈액세포에서 0.39 mM(Fernandez de Arriba A 등, 1999)으로 Table II의 0.0816 µg/ml(4.53×10<sup>-7</sup> M)보다 낮았다. 이는 세포 종류의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. 또한 대황의 성분 중에 anthraquinone계 약물인 rhein은 관절염의 치료제로 본 연구에서(Table II) rhein은 IC<sub>50</sub>가 39.8 µg/ml로 emodin 3.64 µg/ml보다 높았고, LPS로 유발된 COX-2의 활성에 대한 억제 효과가 낮았다(Table II). Ex의 IC<sub>50</sub> 농도에 함유된 rhein의 양은 8.52×10<sup>-3</sup> µg/ml로 rhein 단독일 때의 IC<sub>50</sub> 농도보다 매우 낮은 함량을 나타내었다. 그러므로 종대황의 COX-2 활성 저해 효과는 rhein에 의한 것만은 아님을 알 수 있었다. 이는 rhein이 COX의 활성을 변화시키지 않으면서 osteoarthritis의 동물모형에서 NSAIDs와 유사한 효과로 연골의 손상을 감소시킨다는 보고(Spencer와 Wilde, 1997)와도 연관이 있다고 추정된다. 일반적으로 골관절염(osteoarthritis)의 부위에서는 염증과 관련된 cytokine인 IL-1과 TNF-α가 증가되는데 rhein의 골관절염의 치료효과가 IL-1β와 TNF-α의 합성을 효과적으

로 억제하지만 다른 단백질의 합성, 즉 prostaglandin의 합성 단계에 작용하는 PLA<sub>2</sub>, COX, 5-LO에 대한 억제 효과는 없다는 보고도 있다(Martel-Pelletier 등, 1998). 종대황에 함유된 anthraquinone 류 중에서 COX-2 억제 효과가 가장 높은 emodin의 경우에도 Ex나 Fr의 COX-2에 대한 IC<sub>50</sub> 농도보다 단독 처리한 emodin의 IC<sub>50</sub> 농도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 종대황 추출물의 COX-2 억제효과는 종대황에 함유된 rhein뿐만 아니라, aloe-emodin, emodin 및 chry-sophanol을 포함한 anthraquinone 류에 의한 종합적인 결과로 추정된다. 반면에 대황의 주성분중의 하나인 sennosides의 대사물질인 rhein anthrone은 mouse colon에서 PGE-유사물질의 생합성을 촉진한다는 보고도 있으며(Yagi 등, 1988), rhein이 human osteoarthritic chondrocyte에서 COX-2의 활성을 증가시킨다는 보고도 있다(Pelletier 등, 1998). 따라서 종대황은 COX-2 활성 억제 작용이 있으나 종대황의 주성분인 anthraquinone 류들의 종합적인 억제 효과인지 어떤 특성 성분들의 상호작용에 의한 상승작용인지 설명하기가 어렵다. 또한 이 anthraquinone류들이 COX-2의 활성억제를 나타내는 직접적인 물질이 아닐 가능성도 존재하므로 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1999년도 한국한의학연구원 연구비의 부분적인 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Blanco, F.J., Guitian, R., Moreno, J., de Toro, F.J. and Galdo, F. (1999). Effects of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* **26**, 1366-1373.
- Cho, J.Y., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Jung, J.H., Lee, J. and Park, M.H. (1998). Inhibitory effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-α production in murine macrophage-like cell. *Planta Med.* **64**, 594-597.
- Engelhardt, G. (1996). Pharmacology of mcloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *British J. Rheumatology.* **35**(s1), 4-12.
- Fernandez de Arriba, A., Cavalcanti, F., Miralles, A., Bayon, Y., Alonso, A., Merlos, M., Garcia-Rafanell, J. and Forn, J. (1999). Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its deacetylated metabolite, 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid. *Mol. Pharmacol.* **55**, 753-760.
- Flower, R.J. and Blackwell, G.J. (1976). The importance of phospholipase-A2 in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 285

- Golden, B.D. and Abramson, S.B. (1999). Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. **25**, 359-378.
- Granstrom, E. and Kindahl, H. (1978). Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* **5**, 119-210.
- Granstrom, E. and Samuelsson, B. (1978). Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* **5**, 1-13.
- Han, D.S., *et al* (1989). *Pharmacognosy*, pp.142-146, Dongmyung-sa, Seoul, Korea.
- Han, D.S., *et al* (1996). *Comparative Studies of Herbal Medicine in Korea, China, and Japan*. pp 64-65, Youngrim-sa, Seoul, Korea.
- Isselbacher, K.J., *et al* (1994). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (13th ed.) **2**, 1543-1711.
- Kelly, R.W., Graham, B.J.M. and O'Sullivan, M.J. (1989). Measurement of PGE<sub>2</sub> as methyloxime by radioimmunoassay using a novel iodinated label *Prostaglandins, leukotrienes Essent. Fatry Acids.* **37**, 187-191.
- Lee, J.-H. and Kim, C. (2000). Studies on drug interaction of Rhubarb and Glauber's salt. *Am. J. Chinese Med.* (submitted for publication).
- Lemli, J. (1988). Metabolism of sennosides- An overview. *Pharmacology.* **36**(Suppl. 1), 126-128.
- Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Jolicoeur, F.-C., Cloutier, J.M. and Pelletier, J.P. (1998). Invitro effects of diacerhein and rhein on IL-1 and TNF- $\alpha$  systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J. Rheumatol.* **25**, 753-762.
- Morris, H.G., Sherman, N.A. and Shepperdson, F.T. (1981). Variables associated with radioimmunoassay of prostaglandins in plasma. *Prostaglandins.* **21**, 771-788.
- Patel, R. *et al.* (1999). Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J. Immunol.* **162**, 4191-4197.
- Pelletier, J.P., *et al* (1998). Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1 beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J. Rheumatol.* **25**, 2417-2424.
- Ramwell, P.W., Leovey, E.M. and Sintetos, A.L. (1977). Regulation of the arachidonic acid cascade. *Biol. Reprod.* **16**, 70.
- Spencer, C.M. and Wilde, M.I. (1997). Diacerein. *Drugs.* **53**, 98-108.
- Vane, J.R. (1994). Towards a better aspirin. *Nature.* **367**, 215-6.
- Yagi, T., Miyawaki, Y., Nishikawa, T., Yamauchi, K. and Kuwano, S. (1988). Involvement of prostaglandin E-like material in the purgative action of rhein anthrone the intralumonal active metabolite of sennoside A and B in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 27-30.