

율피의 생리활성 및 미백효과를 이용한 화장품신소재에 관한 연구

정수현[#], 조우아, 손준호, 박찬익, 이인철,
안봉진, 손애량¹, 김세기², 김영선², 정연숙³, 강보연, 최은영, 이진태*

대구한의대학교 화장품 약리학과, 1: 거창도립대학 뷰티디자인과, 2: (주)이지함코스메틱,
3: Department of Genetic Resources Technology, Kyushu University

A Study on the Application of New Cosmetic Materials of Whitening Effect and the Physiological Activities of Chestnut Inner Shell

Su-Hyun Jung[#], Woo-A Jo, Jun-Ho Son, Chan Ik Park, In-Chul Lee,
Bong-Jeun An, Ae-Ryang Son¹, Sae-Ki Kim², Young-Sun Kim², Yeon-Suk Jung³,
Bo-Yeon Kang, Eun-Young Choi, Jin-Tae Lee*

Dept. of Cosmeceutical Science Daegu Haany University,
1: Dept. of Beauty & Make up Geochang provincial college, 2: LJH Cosmetic, Co., Ltd,
3: Department of Genetic Resources Technology, Kyushu University Japan

ABSTRACT

Objectives : This is the study of the application as the ingredients of cosmetics through the examination of the function for physiological activity of Chestnut inner shell.

Methods : Chestnut inner shell, which had been extracted, concentrated, and freeze drying with water and ethanol, have been used for the experiment. The effects on electronic donating ability, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition, whitening effect, nitric oxide inhibition have been investigated in the physiological activity measurement of function experiment.

Results : We used BHA and kagic acid for the comparative. As a result of testing electron donating ability, at over 100ppm of water extract and ethanol extract, BHA showed relatively high donating ability by more than 90%. And as a result of measuring SOD like activity, 1000ppm of water extract showed an effect of 30% and ethanol extract showed an effect of 40%, BHA showed an effect of 30%. In the xanthine oxidase inhibition test, 1000ppm of water extract showed an effect of 70% and ethanol extract showed an effect of 63%, BHA showed an effect of 100%. In the tyrosinase inhibition test, 1000ppm of water extract showed an effect of 55% and ethanol extract showed an effect of 87%, Kagic acid showed an effect of 98%. In the anti-inflammatory test, the water extract and ethanol extract inhibited the generation of nitric oxide.

Conclusions : The results indicated that extract of Chestnut inner shell can be used as a natural ingredients with biological function in cosmetics ingredients.

Key words : Chestnut inner shell, DPPH, SOD, Xanthin oxidase, Tyrosinase, Nitric oxide

*교신저자 : 이진태, 경북 경산시 유곡동 대구한의대학교 화장품약리학과
Phone : 82-53-819-1430 Fax : 82-53-819-1430 E-mail :jtlee@dhu.ac.kr

[#]제1저자 : 정수현, 경북 경산시 유곡동 대구한의대학교 화장품약리학과
Phone : 82-53-819-1435 E-mail : murea@paran.com

· 접수 : 2005년 4월 15일 · 수정 : 2005년 6월 14일 · 채택 : 2005년 6월 20일

서론

올피는 너도 밤나무과(*Buna*)의 다년생 초목인 밤나무(*Castanea crenata Sieb*)의 과실인 밤의 속껍질로 피부를 청결하고 아름답게 하며 노화를 방지하는 것으로 알려졌다¹⁾. 올피의 주요작용은 피부에 수분을 공급하거나 피부로부터 수분이 과도하게 증발되는 것을 막아주는 보습효과²⁾와 특히, 유해 환경으로부터 신체 내부에 생성된 반응성이 높은 활성산소나 자유라디칼 과산화물에 의해 생체성분이 산화되거나 변성되어 피부노화의 주원인으로 작용하는 것을 저해하거나 자유라디칼 소거작용을 한다^{3,7)}. 현재 다른 여러 식물이나 천연물에서 분리한 tyrosinase 저해제로는 hydroquinones, catechols, 월귤나무로부터 분리한 hydroquinone glycoside인 kojic acid와 arbutin 등이 알려져 있다^{4,5)}. 올피추출물은 DOPA 자동산화에 대한 저해작용, 피부의 과다한 멜라닌 색소 형성에 의한 피부의 색소 침착을 억제해주는 미백효과를 나타낸다^{1,3)}. 또한 올피는 옛날부터 미용재료로서 인정받아왔을 뿐 아니라, 민간에서도 많이 사용하고 있다. 올피는 ‘분말화하여 꿀에 개어 얼굴에 바르면 피가 고와진다.’라는 기록이 동의보감에 있으며, ‘꿀에 개어 노인의 얼굴에 바르면 주름살이 펴진다.’는 기록도 있다⁶⁾.

이러한 올피는 예전부터 여성들의 피부관리시 다용되고 있으나, 그 사용에 비하여 과학적인 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용된 올피는 국내 제주도산으로 동우당 제약의 Omniherb에서 구입하여 사용하였다. 시료의 추출은 열수 추출물의 경우 올피를 10배 양의 증류수를 가하여 85℃에서 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 시료의 에탄올 추출은 80%에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 전자공여능 측정

전자공여능 (EDA; electron donating abilities)은 Blois⁸⁾의 방법을 따라 측정하였다. 각 시료용액 2mL에 0.2mM의 1, 1-diphenyl- 2-picryl-hydrazyl (DPPH) 1mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

3. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.2mL에 Tris-HCl 완충용액 (50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

4. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 Corte¹⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1mL와 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6mL에 xanthine (2mM)을 녹인 기질액 0.2mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2U/mL) 0.1mL를 가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 1N

HCl 1mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하였다. xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

5. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5mL에 10mM L-DOPA을 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110U/mL) 0.2mL 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정하였다. tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

6. Nitric oxide 저해활성 측정

Raw 264.7 cell line으로부터 생성된 nitric oxide의 양은 Green¹²⁾의 방법을 통하여 다음과 같이 실험하였다. 세포 배양액 중에 존재하는 NO²를 gress 시약 100μl을 혼합하여 반응하여 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO²의 양은 NaNO₂의 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

$$\text{생장저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

1. 전자공여능 확인

울피 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 영향을 측정된 결과는 Fig. 1 과 같이 나타내었다. 열수 추출물과 에탄올추출물, BHA모두 100ppm에서부터 90% 이상의 효과를 나타내었다. 이것은 Jung 등¹³⁾의 연구결과에서 1000ppm일때 박하(*Mentha arvensis*) 87.7%, 비파엽(*Eriobotrya japonica*) 84.9%, 초과(*Amomum costatum*) 82.9% 보다 높은 효과를 나타내었다. 또한, 오행초, 장명채, 마치채 라고 불리기도 하는 쇠비름추출물의 DPPH 소거능은 100μg/ml 농도에서 71.45%의 소거활성을 가진다고 보고하였으며¹⁴⁾, 강 등¹⁵⁾의 솔잎과 쑥의 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 전자공여능이 80.9, 82.6%의 효과를 보였으며, 김 등¹⁶⁾은 한약재추출물의 전자공여능을 관찰한 결과 목단, 황금, 산수유, 작약에서 각각 86.6, 85.7, 81.0, 80.4%의 전자공여능 효과가 있다고 보고하였다. 이와 비교해 볼 때 울피의 전자공여능이 매우 높음을 알 수 있다.

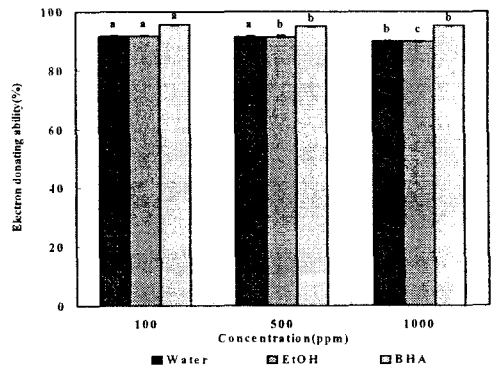


Fig. 1. Electron donating ability of Chestnut inner shell extracts.

water: water extract, EtOH: ethanol extract, BHA: butylated hydroxy anisole. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2. Superoxide dismutase (SOD)

유사활성

SOD 유사활성 측정을 위해 산화효소인 pyrogallol과 율피추출물을 반응시켰다. 생체내에서 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 SOD의 유사능은 Fig. 2 에서와 같이 1000ppm 일때 율피열수추출물이 30% 에탄올추출물이 40%이상 BHA는 1000ppm 일때 54%의 효과를 나타내었다. 이는 An 등¹⁷⁾의 산사자나무 열매의 에탄올 및 열수 추출물의 19.6%와 24.5%의 유사활성과 비교할 때 비교적 높게 나타났으며 또한, Hong 등¹⁸⁾의 실험결과에서 과실, 과채류의 착즙의 SOD 유사활성에서 사과착즙액의 경우 14.6%, 딸기 착즙액의 경우 30.2%, 케일 농축액의 경우 26.7%, 키위착즙액, 무 착즙액의 경우 각각 27.6, 24.1% 정도의 활성이 나타났다. 이와 비교해 볼 때 율피의 SOD 유사활성이 높음을 알 수 있다. Nice 등¹⁹⁾은 SOD 정제시 열안정이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하였는데 이를 SOD와 결합된 phenol류 물질인 것으로 보고한 바 있다. 따라서 이는 율피의 SOD 유사활성이 산화방지는 물론 노화 억제와도 밀접한 관계가 있을 것으로 보여진다.

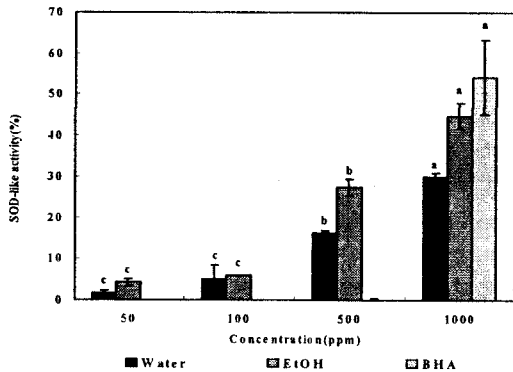


Fig. 2. SOD-like activity of Chestnut inner shell extracts.

water: water extract, EtOH: ethanol extract, BHA: butylated hydroxy anisole. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

3. Xanthine oxidase 저해활성

요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 활성 저해능을 측정한 결과 Fig. 3 에서와 같이 1000ppm 일때 율피열수추출물은 70%이상 에탄올추출물의 경우 63% BHA는 100%의 효과가 나타났다. 이는 An 등²⁰⁾의 연구결과에서 1000ppm일때 산사자 추출물 10% 와 비교할 때 매우 높음을 알 수 있다. Moon 등²¹⁾은 감잎 열탕 추출물의 xanthine oxidase 저해력은 1 ml당 0.1 mg 첨가시 82.9%의 저해효과를 나타냈으며, 2.0 mg 첨가시에는 92.4%의 저해효과를 나타내어 농도가 증가할수록 저해 효과도 서서히 증가한다고 보고하였다. 또한 xanthine oxidase 저해 작용을 나타내는 주요 인자는 polyphenol 화합물인 catechine이라고 보고하였다. 그리고 Yeo 등²²⁾도 녹차, 우롱차 및 홍차 추출물의 xanthine oxidase 저해력은 녹차의 경우 89.2%~93.2%, 우롱차는 88.8% 그리고 홍차는 78.7%였고 저해 성분으로는 polyphenol 화합물인 조catechin flavon이 저해력이 가장 높았으며, 농도가 증가할수록 저해력도 증가한다고 보고하였다.

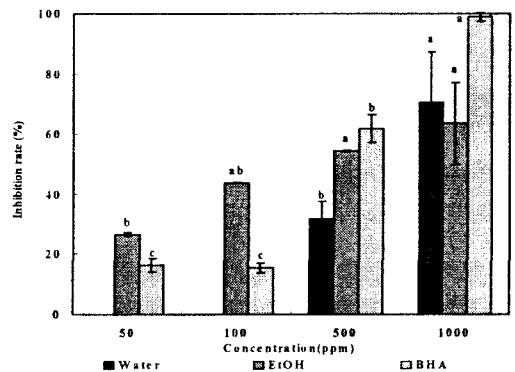


Fig. 3. Inhibition effect of Chestnut inner shell extracts on xanthine oxidase.

water: water extract, EtOH: ethanol extract, BHA: butylated hydroxy anisole. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanin:oxygen oxidoreductase,

EC 1.14.18.1)는 melanin 합성에 관여하는 효소로 체내의 L-tyrosine에서 DOPA를 생성하고 다시 L-dopaquinone으로 전이시키는 연속된 효소적 산화를 일으킨다. 피부 내에서 melanin 생성에 key enzyme으로 알려져 있는 tyrosinase에 대한 활성을 억제하는 물질을 탐색할 목적으로 각 추출물의 농도별 tyrosinase 효소활성의 저해효과를 측정하였고 그 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 울피열수추출물은 1000ppm일때 55%, 에탄올추출물의 경우 87%, 대조군인 kojic acid의 경우 98%의 저해활성을 나타내었다. Lee 등²³⁾의 약용식물류의 tyrosinase의 저해능 탐색에서 오매(烏梅)와 계피(桂皮)는 81% 저해율로 울피 에탄올 추출물과 비슷한 수준의 저해율이 나왔고 그 외의 약용식물에서는 5~63%의 저해능이 있다고 보고하였다. 이는 Jung 등²⁴⁾의 콩나물, 케일, 취나물의 10% 이하의 낮은 저해능과 비교할 때 울피 추출물의 저해활성이 매우 높음을 알 수 있다. 또한 Yang 등²⁵⁾이 보고한 울피추출물의 tyrosinase저해능은 160 μ g/ml농도에서 87.63%의 저해활성을 나타내었다.

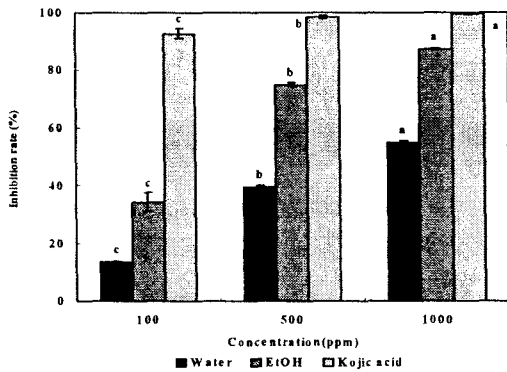


Fig. 4. Inhibition effect of Chestnut inner shell extracts on tyrosinase.

water: water extract, EtOH: ethanol extract, BHA: butylated hydroxy anisole. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으

며 여러 조직과 세포로부터 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 합성된다^{26,27)}. 특히 대식세포는 생체내에서 감염, 염증 등의 자극에 의해서 L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 nitric oxide를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 한다. 그러나 nitric oxide가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 hypotension, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다²⁸⁻³¹⁾. 따라서 이런 증상에 대한 치료제를 개발할 목적으로 최근에는 천연물로부터 nitric oxide생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 이에 천연물인 개나리를 이용하여 nitric oxide저해를 나타내는 것을 확인하여 항염효과를 살펴보았다.

Mouse macrophage인 Raw 264.7에 LPS(lipopolysaccharide)와 울피 추출물을 각각 처리하여 12시간마다 nitric oxide양을 측정 한 결과, 울피의 에탄올 및 열수 추출물 모두 Fig. 5, 6에서 보는 것과 같이 0.05%일때 반응시간 12시간 이후부터 nitric oxide생성을 억제하는 것을 볼 수 있는데 0.5%농도에서는 반응값이 약간 높게 나왔는데 이는 반응물의 색에 의한 것으로 판단된다. 울피 추출물은 과다한 nitric oxide생성에 대한 각종 염증반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.

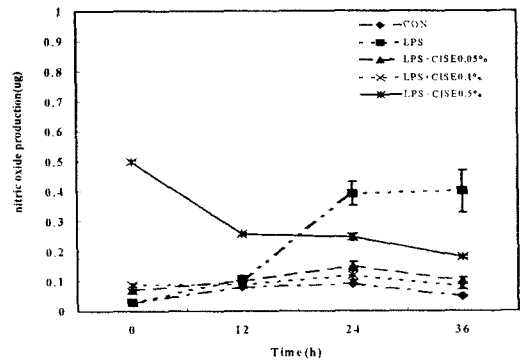


Fig. 5. Inhibition rate of nitric oxide production by CISE in Raw 264.7 cells.

LPS : lipopolysaccharide, CISE : Chestnut inner shell ethanol extract. values are of 3 replicates.

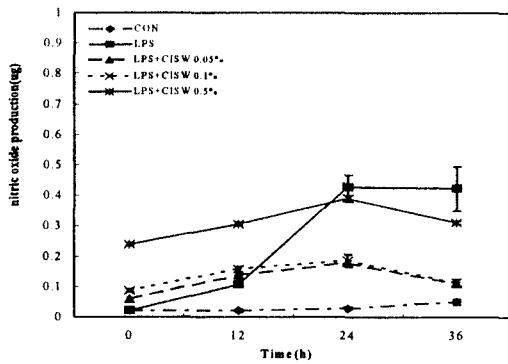


Fig. 6. Inhibition rate of nitric oxide production by CISW in Raw 264.7 cells.

LPS : lipopolysaccharide, CISW : Chestnut inner shell water extract. values are of 3 replicates.

결론

한방에서 예로부터 사용되어 왔던 울피를 이용해 생리활성 측정용 통한 화장품 소재로서의 응용에 대한 연구로 울피를 물과 에탄올로 추출, 농축 및 동결건조하여 실험에 사용하였다. 생리활성 측정 실험에서 전자공여능, SOD 유사활성, 미백효과, xanthine oxidase 저해활성, 항염능력을 조사하였고, 생리활성 측정 실험에서 울피 추출물의 전자공여능은 합성항산화제인 BHA와 비슷한 100ppm에서부터 각각 90% 이상으로 매우 높게 나타났고, SOD 유사활성은 1000ppm에서 각각 30%, 40%의 효과를 나타내었고, xanthine oxidase 저해활성의 결과는 1000ppm에서 각각 70%와 63%의 효과를 나타내 BHA 보다는 다소 낮게 나타났다. 미백과 관련된 tyrosinase 저해활성은 1000ppm에서 열수추출물은 55% 에탄올추출물은 87%효과를 나타내었다. 항염 실험 nitric oxide 억제에서는 열수 및 에탄올 추출물 모두 0.05% 일때 12시간 이후부터 nitric oxide를 억제해 항염능력이 높음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원(과제번호: R12-2003-002-05002-0(2004))에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yang MJ, Lim SJ, Ahn HS, Kim MA, Ahn RM. Inhibitory Effects of Chestnut Bark Extracts on Tyrosinase Activity and Melanin Biosynthesis. *Kor. j. Env. Hlth. Soc.* 1999;25(1):37-43
2. Yoon WJ. The study on the humidity-preserving effect with several natural packs. Dong Duck Women's University. 1997.
3. Suk CH. Pharmaceutical characteristics and dermatophysiological effects of cosmeceuticals containing chestnut bark extracts. Chung ang University. 1997
4. Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 1993;100:150-155.
5. Maeda K, Fukuda M. Invitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991;42: 361-368.
6. 동의보감 편수 간행위원회. 동의보감 탕액편 東部, 동의보감. 1993:1383.
7. Oh SH, Kim YW, Kim MA. The Antioxidant Activities of Acetone Extracts of Chestnut Inner Shell, Pine Needle and Hop. *Korean J. Food Culture.* 2004;19(4):339-406.
8. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26: 1198-120.
9. Marklund S. and Markiund G. involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxidation dismutase. *Eur. J. Bioche.* 1974;47(3):469-74..
10. Stirpe F. and Corte ED. The Regulation of Rat Liver Xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1969;244:3855-3861.
11. Yagi A, kanbara T. and Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* 1986;3981:517-9.
12. Green KC, Wagner DA, Glogowaki J, Skipper PL, Wishnok JS. Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrate, nitrite, and[15N]nitrate in

- biological fluids. Anal. Biochem. 1982;126:1849-1857.
13. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. Screening for Antioxidant activity of Plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2004;47:135-140.
 14. Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, Seo YW. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by portulaca olecea. Koreana J. Biotechnol Bioeng. 2003;18:165-169.
 15. Kang, YH, Park YK, Oh AR, Moon KD. Studies on physiological functionality of pine needle and mugwort extract. Korean J. Food Sci. Technol. 1995;27:978-984.
 16. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC. and Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some korean medical plants. Korean J. Food Sci. Technol. 1995;27:80-85.
 17. An BJ, Lee JT. Studies on Biological Activity from Extract of Crataegi Fructus. Kor. J. Herbology 2002;17(2):29-38.
 18. Hong HD, Kang NK, Kim SS. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetable. Korean J. Food Sci. Technol. 1996;30(6):1484-7.
 19. Nice DJ, Robinson DS. and Jolden MA. Characterisation of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. Food Chem. 1995; 52:393-397.
 20. An, J, Lee JT. Studies on Biological Activity from Extract of Crataegi Fructus. Kor. J. Herbology 2002;17(2):29-38.
 21. Moon SH. and Lee MK. Inhibitory effects of xanthine oxidase by boiled water extract and tannin from persimmon leaves. Korean J. Food and Nutr. 1998;11:354-357.
 22. Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, park YH. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tae, oolong tea and black tea. J. Korean Soc. Food Nutr. 1995;24(1):154-159.
 23. Lee SH, Park JS, Kim JJ. and Chung SR. The screening of the inhibitory compounds on tyrosine activity from the natural product. Yakhak Hoeji. 1997;41(4):456-461.
 24. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. Korean J. Food Sci. Technol. 1995;27(6):891-896
 25. Yang MJ, Lim SJ, Ahn HS, Kim MA. and Ahn RM. Inhibitory Effect of Chestnut Bark Extracts on Tyrosinase Activity and Melanin Biosynthesis. Kor. J. Env. Hlth. Soc. 1999; 25(1):37-43.
 26. Stamler JS, Singel DJ. and Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science. 1992;258:1898-1902.
 27. Galla HJ. Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993;32:378-380.
 28. Knowles RG. and Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. TIBS 1992;17:399-402.
 29. Nathan C. Nitric oxide ad a secretory product of mammalian cell. FASEB. J. 1992;6:3051-3064.
 30. Stuehr D, Cho HJ, Kwon NS, Weise M. and Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Sci. USA. 1991;88: 7773-7777.
 31. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF. and Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J. Exp. Med. 1993;179:749.