

B16 Melanoma 세포에서 Protein Kinase 억제제들이 Cyclic AMP 경로를 통한 멜라닌 생성에 미치는 영향

차상복* · 조남영* · 윤미연* · 임혜원* · 김경원* · 박영미* · 이지윤 · 이진희 · 김창중 · 심상수#

중앙대학교 약학대학, *의약식품대학원

(Received November 28, 2002; Revised December 17, 2002)

Effects of Protein Kinase Inhibitors on Melanin Production in B16 Melanoma Cells Stimulated via Cyclic AMP-dependent Pathway

Sang Bok Cha, Nam Young Cho, Mi Yun Yoon, Hye Won Lim, Kyoung Won Kim, Young Mi Park, Ji Yun Lee, Jin Hee Lee, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim#

College of Pharmacy, Graduate School of Food and Drug Administration*, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Abstract — To investigate the effect of protein kinase on melanin production via cAMP-dependent pathway, we measured the melanin amount and tyrosinase activity in B16 melanoma cells stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone (MSH), forskolin and 8-Br-cAMP. MSH, forskolin and 8-Br-cAMP significantly increased both melanin production and tyrosinase activity in B16 cells. Melanin production and tyrosinase activity by MSH are significantly inhibited by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitor (KT5720) and protein kinase C down-regulation treated with PMA. Bisindolmaleimide (1 μ M), protein kinase C inhibitor, significantly inhibited melanin production and tyrosinase activity stimulated by MSH, forskolin and 8-Br-cAMP with the following order of potency: MSH>forskolin>8-Br-cAMP. Tyrosine kinase inhibitor, genistein and DHC, significantly inhibited both, but the inhibitory effect was more potent in 8-Br-cAMP-stimulated B16 cells than MSH-stimulated cells. NF κ B inhibitor (parthenolide) significantly inhibited melanin production and tyrosinase activity. Neither melanin production nor tyrosinase activity induced by MSH, forskolin and 8-Br-cAMP were affected by KN-62 (calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor), PD098059 (mitogen-activated protein kinase inhibitor, MAPKK) and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor). These results suggest that both protein kinase C and tyrosine kinase are involved in melanin production by cyclic AMP-dependent pathway and NF κ B pathway may play an important role in cyclic AMP-dependent melanin production in B16 melanoma cells.

Keywords □ Melanin, tyrosinase, protein kinase inhibitors

표피에 존재하는 melanin은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 melanocyte에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다.¹⁾ Tyrosinase 효소는 tyrosine을 DOPA quinone으로 전환시키는 효소로서 melanin 생성시 rate-limiting step에 관여하며 melanin 생성을 조절하는 중요한 단계로 알려져 있다.¹⁾ Tyrosinase는 tyrosine에 hydroxylation을 일으켜 L-DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase와 L-DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 생성하는 DOPA oxidase의 복합체로 구성되어 있다.

Melanin 생성을 촉진하는 인자로서는 vitamin D 대사물질,²⁾ retinoid,^{3,4)} melanocyte stimulating hormone,^{5,6)} forskolin, cholera

toxin, phosphodiesterase 억제제인 isobutylmethylxanthine⁷⁾들이 있다. 이들 대부분은 세포내 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cyclic AMP 농도를 증가시키는 물질로서 melanin 생성에 있어 cyclic AMP pathway가 중요한 작용을 하고 있는 것을 알 수 있다. Cyclic AMP를 증가시키는 인자들에 의한 melanin 생성의 촉진은 아마도 tyrosinase 효소 발현을 증가시키거나 이미 존재하는 효소의 post-translational modification을 통해 활성을 증가시키는 것으로 사료된다.⁸⁾

Cyclic AMP 신호 전달경로를 통한 melanin 생성 이외에 세포 내에 존재하는 여러 가지 protein kinase(protein kinase C, Ca/calmodulin-dependent protein kinase, tyrosine kinase, phosphatidylinositol-3-kinase)들은 melanin 생성 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. Cloudman mouse melanoma model system인 S91 세포에서 protein kinase C 활성화제인 phorbol dibutyrate를 48시간 처치시 protein kinase C의 활성이 95% 정도 소실되는 down-

#본 저널에 관한 문의는 저자에게로
(전화: 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) simss@cau.ac.kr

regulation이 일어난다. 이러한 세포에서 α -melanocyte stimulating hormone (MSH)의 melanin 생성은 완전히 차단되었으며 tyrosinase의 발현 양과 m-RNA의 양도 억제되는 것을 관찰하였다.⁸⁾ 이러한 결과는 MSH 작용에 있어서 protein kinase C가 관여하고 있음을 보여준다. Mitogen-activated protein kinase pathway는 B16 melanoma 세포에서 cyclic AMP 신호전달계에 의한 melanin 생성 과정에서 활성화된다는 보고⁹⁾와 phosphatidylinositol-3-kinase 억제제를 처치시 cyclic AMP에 의한 tyrosinase의 발현을 촉진한다는 보고가 있으며,¹⁰⁾ calmodulin 길항제인 W-7은 자외선 조사에 의한 melanin 생성을 억제한다는 보고¹¹⁾로 미루어 볼 때 세포내에 존재하는 여러 가지 protein kinase는 MSH의 신호전달계인 cyclic AMP 신호전달 경로 조절에 밀접하게 관여할 가능성을 제시하여 준다.

MSH가 melanin의 생성을 촉진하는 과정은 여러 단계로 나눌 수 있다. MSH가 세포막에 존재하는 수용기와 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화시키며, 활성화된 adenylyl cyclase는 다시 세포내 cyclic AMP 농도를 증가시켜 cyclic AMP-dependent protein kinase를 통해 tyrosinase 효소 발현을 증가시키게 된다. 이러한 MSH의 신호전달 경로에 있어서 여러 가지 protein kinase들이 어느 단계에 관여하는 지를 알기 위하여, 수용기를 통하지 않고 직접 세포내 adenylyl cyclase를 활성화시키는 forskolin과 세포막을 통과하여 세포내로 들어가는 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법

시약

α -melanocyte stimulating hormone, forskolin, 8-Br-cyclic AMP, tyrosinase, L-DOPA, melanin, bisindolmalimide, genistein, dihydroxycinnamic acid(DHC), KN-62, PD098059, worthmannin들은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다. B16 melanoma 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

세포 배양

B16 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50 μ g/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Melanin 정량과 tyrosinase 효소 활성을 측정할때는 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였다. 24 well plate에 5×10^4 cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 여러 가지 protein kinase 억제제를 10분간 전처리 하였다. Melanin 생성을 촉진하기 위하여 α -melanocyte stimulating hormone, forskolin, 8-Br-cyclic AMP를 처치하고 48 시간 지난 뒤에 tyrosinase 효소 활성과 melanin을 정량하였다.

Tyrosinase 활성 측정

약물 처치 후 배양이 끝나면 1%(w/v) Triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)를 100 μ l를 가하고 5분간 shaking 한 후에 세포와 용액을 모두 eppendorf tube로 이전시키고 원심분리하여 상층액은 tyrosinase 효소 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 melanin 정량에 사용하였다. 96 well plate에 약물 처치 후 얻은 상층액 40 μ l를 분주하고 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 2 μ g/ml L-DOPA 200 μ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹²⁾ 순수하게 정제된 tyrosinase를 효소 활성을 표준 검량선으로 이용하여 산출하였으며, bovine albumin을 표준 용액으로 하여 상층액내의 단백질 양을 정량하였으며, tyrosinase 효소 활성은 unit/mg protein으로 표기하였다.

Melanin 정량

Tyrosinase 활성을 측정하는 과정에서 얻은 pellet을 1 N NaOH 100 μ l와 증류수 200 μ l를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 melanin을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200 μ l를 옮긴후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 melanin 양을 산출하였다. Melanin 생성량은 각 well에서 측정된 단백질 농도를 기준으로 μ g/mg protein으로 표기하였으며 각각의 약물 효과는 대조군과 비교하여 % inhibition으로 나타내었다.

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

Cyclic AMP 신호전달계를 통한 B16 melanoma 세포의 반응

B16 melanoma 세포를 48시간 배양한 대조군에서 생성 되는 melanin 양은 26.2 ± 1.9 μ g/mg protein이었으며, tyrosinase 활성은 0.51 ± 0.09 unit/mg protein이었다. 1 μ M MSH를 처치한 군에서는 melanin은 33.6 ± 2.3 μ g/mg protein으로 tyrosinase는 1.47 ± 0.26 unit/mg protein으로 증가하였다. Adenylyl cyclase 활성화제인 forskolin(1 mM)과 세포막을 통과하는 8-Br-cyclic AMP(1 mM)도 대조군에 비하여 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 모두 유의하게 증가시켰다(Fig. 1). MSH가 cyclic AMP 신호전달 경로를 통해 작용하는 지를 확인하기 위하여 cyclic AMP-dependent protein kinase 억제제인 KT5720이 MSH에 의한 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 1 μ M

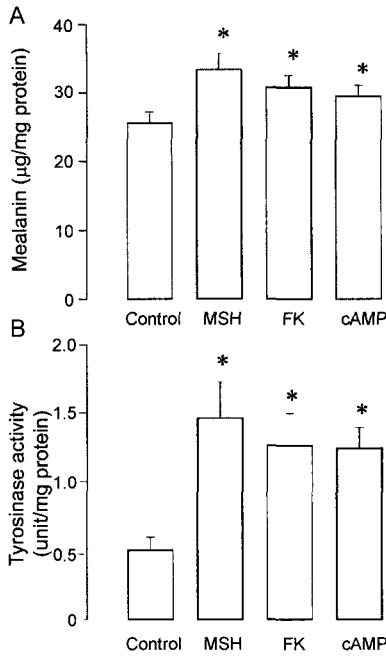


Fig. 1 – Melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 µM), forskolin (FK, 1 µM) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from control (p<0.05).

KT5720은 MSH에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 유하게 억제하였다(Fig. 2). 이러한 결과로 미루어 볼 때 MSH는 cyclic AMP 신호전달계를 통하여 작용하는 것으로 사료된다.

Protein kinase C 활성을 제거한 B16 melanoma 세포에서 MSH의 반응

Protein kinase C 활성화제인 PMA를 4시간 이상 처치시 세포 내 protein kinase C의 활성은 down regulation 과정을 통해 활성을 잃게된다. 1 µM PMA를 48시간 처치한 세포에서 protein kinase C의 활성은 95% 정도 소실된다는 보고가 있다.⁸⁾ PMA를 처치한 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성은 MSH를 단독으로 처치한 군에 비하여 유의하게 억제되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 MSH에 의한 melanin 생성에 있어서 protein kinase C가 관여하고 있음을 알 수 있다.

Protein kinase 억제제들의 영향

MSH에 의한 melanin 생성 조절에 있어서 여러 가지 protein kinase들이 밀접하게 연관되어 있다는 것이 많은 연구를 통해 보고되었다. 이 연구에서는 MSH의 신호전달 경로에 있어서 여러 가지 protein kinase 들이 어느 단계에 영향을 미치는 지를 구명하고자 하였다. Protein kinase C 활성화제를 장기 처치시 MSH의 반응이 억제되는 것으로 보아 protein kinase C가 관여

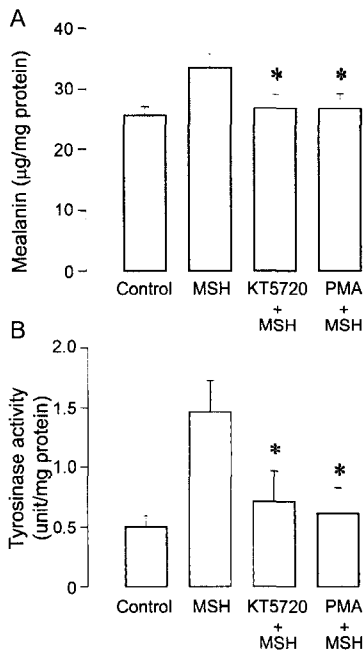


Fig. 2 – Effects of cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitor (KT5720 1 µM) and protein kinase C activator (PMA, 1 µM) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 µM). Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone (p<0.05).

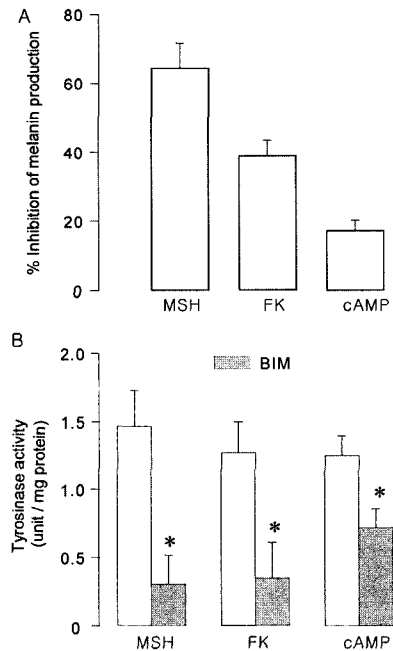


Fig. 3 – Effect of protein kinase C inhibitor (bisindolmaleimide; BIM, 1 µM) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 µM), forskolin (FK, 1 µM) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH, FK or cAMP alone (p<0.05).

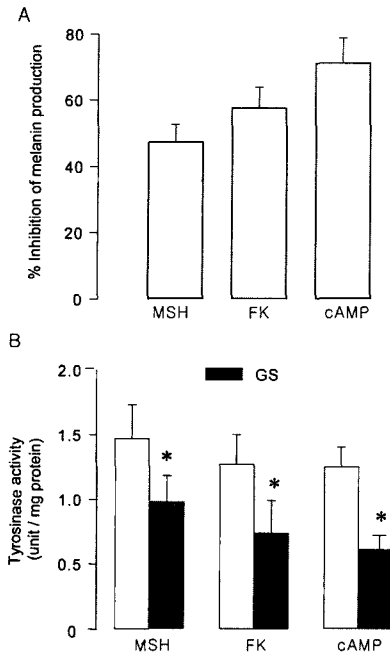


Fig. 4 – Effect of tyrosine kinase inhibitor (genistein; GS, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH, FK or cAMP alone ($p < 0.05$)

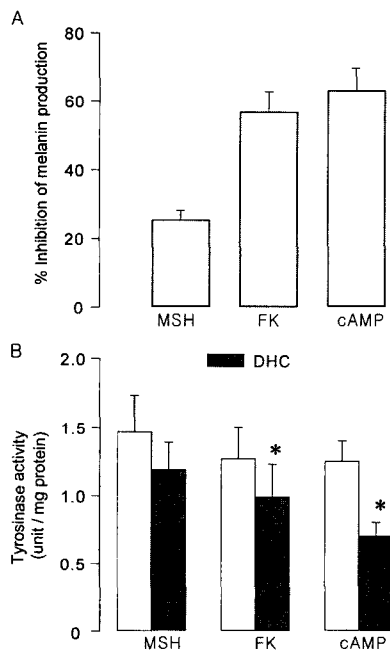


Fig. 5 – Effect of tyrosine kinase inhibitor (2,5-dihydroxycinnamic acid; DHC, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH, FK or cAMP alone ($p < 0.05$).

하고 있음을 알 수 있다. 따라서 protein kinase C 억제제인 bisindolmaleimide가 MSH, forskolin과 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였다. Protein kinase C 억제제는 MSH, forskolin 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 모두 유의하게 억제하였다. 그러나 이러한 억제 효과는 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성보다는 수용기를 통해 작용하는 MSH의 작용을 더 강력하게 억제하는 것을 볼 수 있다(Fig. 3).

Tyrosine kinase 억제제인 genistein과 DHC도 MSH, forskolin 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 모두 유의하게 억제하였다. 그러나 protein kinase C 억제제와는 달리 수용기를 통해 작용하는 MSH의 작용보다는 cyclic AMP를 통해 작용하는 단계에서 더 강력하게 억제하는 것을 볼 수 있다(Fig. 4, 5). 사람의 melanoma 세포에서 genistein은 세포의 분화를 억제하며 melanin 생성을 촉진한다는 보고가 있다.¹³⁾ 그러나 cyclic AMP 신호전달계를 통한 melanin 생성에 대한 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없는 실정이다.

Protein kinase C와 tyrosine kinase 이외에 melanin 생성과 연관성이 있는 여러 가지 protein kinase들, calmodulin-dependent protein kinase II 억제제인 KN-62, phosphatidylinositol-3-kinase 억제제인 wortmannin, mitogen-activated protein kinase 억제제

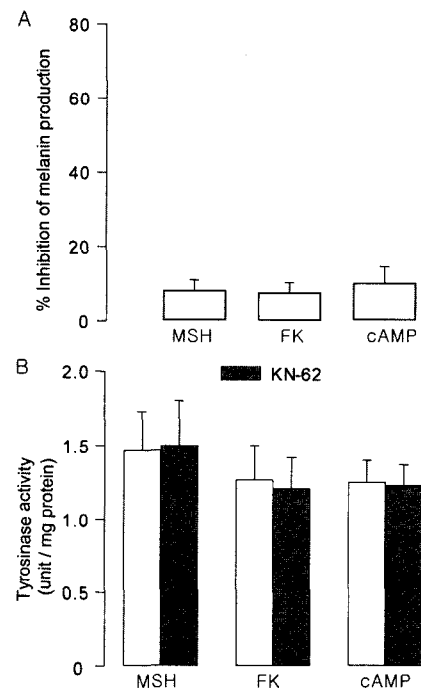


Fig. 6 – Effect of calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor (KN-62, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

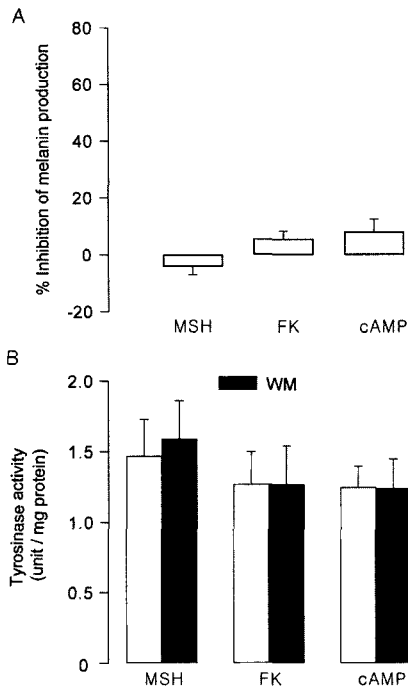


Fig. 7 – Effect of worthmannin (WM, phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

인 PD098059는 MSH, forskolin 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성화에 별다른 영향을 주지 않았다 (Fig. 6, 7, 8). Mitogen-activated protein kinase pathway는 B16 melanoma 세포에서 cyclic AMP 신호전달계에 의한 melanin 생성과정에서 활성화된다는 보고⁹⁾가 있지만, mitogen-activated protein kinase pathway 차단은 cyclic AMP 신호전달 경로에 의한 melanin 생성에는 별다른 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. Phosphatidylinositol-3-kinase 억제제를 처치시 cyclic AMP에 의한 tyrosinase의 발현을 촉진한다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 이 실험에서도 MSH에 의한 melanin 생성이 worthmannin에 의해 약간 증가하는 경향을 보였으며 tyrosinase 활성화도 대조군 보다 약간 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다. 앞으로 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다. Calmodulin-dependent protein kinase II 억제제인 KN-62도 cyclic AMP 신호전달 경로에 의한 melanin 생성에 별다른 영향을 주지 않았다. 그러나 calmodulin 길항제인 W-7은 자외선 조사에 의한 melanin 생성을 억제한다는 보고¹¹⁾가 있는 것으로 미루어 볼 때 calmodulin-dependent pathway의 관련 가능성을 배제 할 수는 없다.

NF κ B 억제제인 parthenolide¹⁴⁾는 MSH, forskolin 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 모두 유

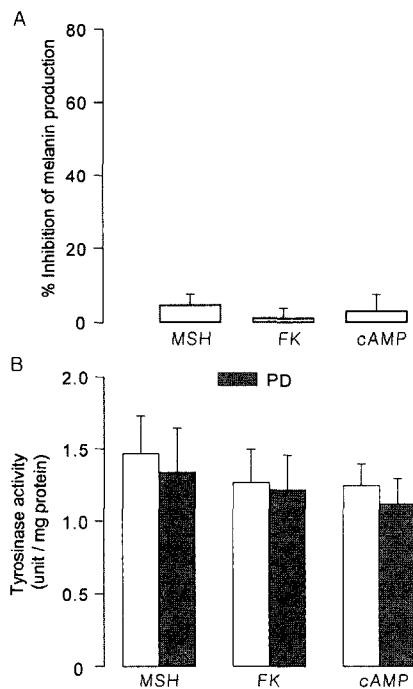


Fig. 8 – Effect of PD098059 (PD, mitogen-activated protein kinase inhibitor, MAPKK, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

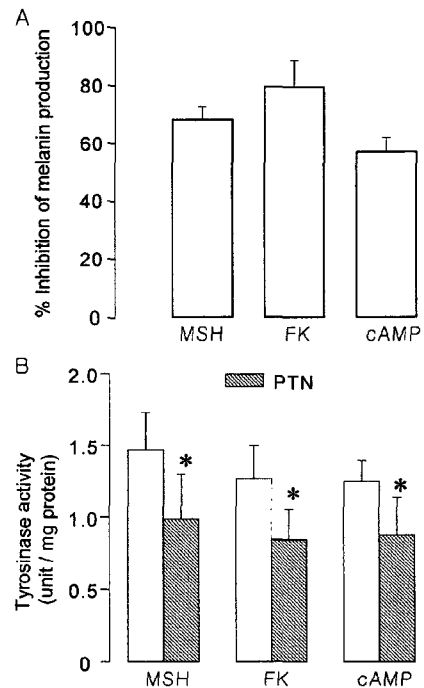


Fig. 9 – Effect of parthenolide (PTN, NF κ B inhibitor, 1 μ M) on melanin production (A) and tyrosinase activity (B) in B16 cells stimulated by MSH (1 μ M), forskolin (FK, 1 μ M) and 8-Br-cAMP (1 mM). Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

의하게 억제하였다(Fig. 9). NF κ B는 유전자 발현에 관여하는 마지막 단계로서 protein kinase C나 tyrosine kinase가 작용하는 공통 경로가 된다.¹⁵⁾ 그러므로 NF κ B는 cyclic AMP 신호전달 경로에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 cyclic AMP 신호전달경로 자극제인 MSH, forskolin 및 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성 증가에 있어서 protein kinase C와 tyrosine kinase가 관여하며 이들 protein kinase는 NF κ B 경로를 통해 작용하는 것으로 사료된다.

결 론

Cyclic AMP-dependent pathway를 통하여 작용하는 alpha-melanocyte stimulating hormone(MSH), forskolin 및 8-Br-cyclic AMP는 B16 melanoma 세포에서 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 증가시켰다. Protein kinase C 억제제인 bisindolmaleimide와 tyrosine kinase 억제제인 genistein과 DHC, NF κ B 억제제인 parthenolide는 MSH, forskolin 및 8-Br-cAMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하였다. Protein kinase C 억제제는 MSH의 작용을 더 많이 억제하였으며, tyrosine kinase 억제제는 8-Br-cyclic AMP의 작용을 많이 억제하였지만 NF κ B 억제제인 parthenolide는 MSH, forskolin 및 8-Br-cyclic AMP의 작용을 비슷한 정도 억제하였다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 cyclic AMP 신호전달경로 자극제인 MSH, forskolin 및 8-Br-cyclic AMP에 의한 melanin 생성과 tyrosinase 활성 증가에 있어서 protein kinase C와 tyrosine kinase가 관여하며 이들 protein kinase는 NF κ B 경로를 통해 작용하는 것으로 사료된다.

문 헌

- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902 (1991).
- Tomita, Y., Torinuki, W. and Tagami, H. : Stimulation of human melanocytes by vitamin D3 possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 882 (1988).
- Lotan, R. and Lotan, D. : Enhancement of melanotic expression in cultured mouse melanoma cells by retinoids. *J. Cell Physiol.* **106**, 179 (1981).
- Romero, C., Aberdam, E., Larnier, C. and Ortonne, J. P. : Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *J. Cell Sci.* **107**, 1095 (1994).
- Fuller, B. B. and Meyskens, F. L. : Jr. Endocrine responsiveness in human melanocytes and melanoma cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 799 (1981).
- Fuller, B. B. : Lunsford JB, Iman DS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures. *J. Biol. Chem.* **25**, 4024 (1987).
- Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J. E. and Thody, A. J. : Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 205 (1994).
- Park, H. Y., Russakovsky, V., Ao, Y., Fernandez, E. and Gilchrist, B. A. : Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp. Cell Res.* **25**, 70 (1996).
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **13**, 24315 (1995).
- Busca, R., Bertolotto, C., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **13**, 31824 (1996).
- Dowdy, J. C., Anthony, F. A. and Costlow, M. E. : Topical W-7 inhibits ultraviolet radiation-induced melanogenesis in Skh:HR2 pigmented hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **11**, 143 (1995).
- Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. and Kobata, A. : Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch. Biochem. Biophys.* **15**, 63 (1984).
- Rauth, S., Kichina, J. and Green, A. : Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53. *Br. J. Cancer.* **75**, 1559 (1997).
- Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Droge, W. and Schmitz, M. L. : The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J. Immunol.* **15**, 5617 (1999).
- Bian, Z. M., Elner, V. M., Yoshida, A., Kunkel, S. L. and Elner, S. G. : Signaling pathways for glycated human serum albumin-induced IL-8 and MCP-1 secretion in human RPE cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 1660 (2001).