

사람 단핵구에서 결핵균에 의해 유도되는 CCL3 및 CCL4 발현에 대한 Phospholipase-Protein Kinase C-MEK-ERK 경로의 역할 분석

¹충남대학교 의과대학 미생물학교실, ²건양대학교 의과대학 미생물학교실

양철수¹ · 송창화¹ · 정섫별¹ · 이길수¹ · 김수영¹ · 이지숙² · 신아름¹
오재희¹ · 권유미¹ · 김화중¹ · 박정규¹ · 백태현² · 조은경¹

The Phospholipase-Protein Kinase C-MEK-ERK Pathway is Essential in Mycobacteria-induced CCL3 and CCL4 Expression in Human Monocytes

Chul-Su Yang¹, Chang-Hwa Song¹, Saet-Byel Jung¹, Kil-Soo Lee¹, Su-Young Kim¹, Ji-Sook Lee², A-Rum Shin¹, Jae-Hee Oh¹, Yu-Mi Kwon¹, Hwa-Jung Kim¹, Jeong-Kyu Park¹, Tae-Hyun Paik² and Eun-Kyeong Jo¹

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, ² Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Nonsan, Korea

ABSTRACT

Background: Little information is available on the identification and characterization of the upstream regulators of the signal transduction cascades for *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*)-induced ERK 1/2 activation and chemokine expression. We investigated the signaling mechanisms involved in expression of CCL3/MIP-1 and CCL4/MIP-1 in human primary monocytes infected with *M. tb*. **Methods:** MAP kinase phosphorylation was determined using western blot analysis with specific primary antibodies (ERK 1/2, and phospho-ERK1/2), and the upstream signaling pathways were further investigated using specific inhibitors. **Results:** An avirulent strain, *M. tb* H37Ra, induced greater and more sustained ERK 1/2 phosphorylation, and higher CCL3 and CCL4 production, than did *M. tb* H37Rv. Specific inhibitors for mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK; U0126 and PD98059) significantly inhibited the expression of CCL3 and CCL4 in human monocytes. Mycobacteria-mediated expression of CCL3 and CCL4 was not inhibited by the Ras inhibitor manumycin A or the Raf-1 inhibitor GW 5074. On the other hand, phospholipase C (PLC) inhibitor (U73122) and protein kinase C (PKC)-specific inhibitors (Gö6976 and Ro31-8220) significantly reduced *M. tb*-induced activation of ERK 1/2 and chemokine synthesis. **Conclusion:** These results are the first to demonstrate that the PLC-PKC-MEK-ERK, not the Ras-Raf-MEK-ERK, pathway is the major signaling pathway inducing *M. tb*-mediated CCL3 and CCL4 expression in human primary monocytes. (**Immune Network 2005;5(4):237-246**)

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, monocyte, CCL3, CCL4, MAPK

서 론

Mycobacterium tuberculosis (*M. tb*)에 의해 유발되는 결핵은 전세계적으로 해마다 8백만 명 이상의 발병 및 3백만 명 이상의 사망자를 발생시키는 심각한 보건 문제로 남아있다. 그러나 결핵 감염 후 대부분은 건강인 보균자로 남아있으며 약 5 내지 10%만이 발병하는 것으로

책임저자 : 조은경, 충남대학교 의과대학 미생물학교실
301-747, 대전광역시 중구 문화1동 6번지
Tel: 042-580-8243, Fax: 042-585-3686
E-mail: hayoungj@cnu.ac.kr

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(Grant R042 004 0001 00220 2004).

알려져 있다. 따라서 현성결핵으로의 발병과 진행을 제어하기 위하여는 숙주의 면역반응이 효과적으로 유도되어야 한다(1).

결핵의 육아종 병변은 이와 같은 숙주 보호면역 반응이 효과적으로 유도되었을 때 특징적으로 나타나는 조직병리학적 소견이 된다. 결핵과 사람면역결핍 바이러스가 동시에 감염되었을 때 육아종 형성이 미약하거나 관찰되지 않는 경우가 많으며 이 경우 결핵의 재활성 및 악화 위험이 높아진다고 한다(2). 육아종 형성에는 다양한 케모카인들의 활성이 필요하며(3) 케모카인은 주로 작은 분자량을 갖는 단백질들로 백혈구의 이동, 활성 및 탈과립과 밀접한 연관이 있다(4-6). 케모카인은 구조적 특성에 따라 크게 두 가지 아형(CXC 및 CC)으로 구분된다(5). 그 중 MIP-1 단백질은 8 내지 10 kDa의 분자량을 갖는 단백질들로 CC subfamily에 속하며 서로 비슷한 구조와 역할을 수행한다. MIP-1 family를 구성하는 단백질 중 CCL3/MIP-1 α 및 CCL4/MIP-1 β 는 활성화된 대식세포에서 생산되어 분비됨으로써 다른 전염증성 세포를 유인한다. 또한 대식세포 그 자체를 염증 부위로 끌어모으는 데도 매우 중요한 역할을 한다(7). MIP-1 단백질은 보조 T세포의 분화를 조절하며 CCL3 및 그 수용체인 CCR5는 Th1으로 분화할 때 필수적인 역할을 한다. 실험적으로 CCR5가 결핍된 마우스는 Th2 사이토카인 프로필을 나타내었던 반면(8), Th2 세포는 주로 CCR2 및 CCR4를 발현하였다(9). 따라서 MIP-1 케모카인은 Th1 세포반응 유도에 핵심 역할을 하며 숙주 방어면역 반응과 관련된 염증 반응의 조절에도 필수적인 매개자가 된다(7).

다양한 자극에 의한 세포 내 신호전달에 관련되는 mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 p42 및 p44 extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), p46 및 p54 c-Jun-NH2-terminal kinases 혹은 stress activated protein kinase (JNK/SAPK) 및 p38 MAPK 등 세 가지 효소로 구성되어 있으며 마이코박테리아 및 균체 성분들은 세포 내 MAPK 활성 조절에 매우 밀접한 연관이 있다(10-12).

이전 연구에 의하면 MAPK 활성은 결핵균에 의해 유도되는 TNF- α , IL-1 β 및 monocyte chemoattractant protein-1 등의 생성에 필수적인 것으로 보고되었다(10,11,13). 또한 사람 단핵구 유래 대식세포에서 MAPK 활성에 의해 마이코박테리아의 세포 내 생존이 감소되어 MAPK 경로가 항결핵 방어에 중요함을 알 수 있다(13,14). 현재까지의 연구 결과들을 종합해 볼 때 사람 및 마우스 모델에서 MAPK 경로의 활성과 조절은 마이코박테리아의 병원성과 깊은 관련이 있다고 생각한다(13). Roach와 Schorey(11)는 병원성 *M. avium* 724 균주는 ERK 1/2 및 p38 MAPK를 조기에 활성화시켰지만 이러한 활성화는

곧 소실되었던 반면, *M. phlei* 및 *M. smegmatis*와 같이 비병원성 마이코박테리아로 감염시켰을 때 대식세포 내 ERK 1/2 및 p38 MAPK 활성은 감염 후 24시간까지 지속되었다고 한다(11). 따라서 마이코박테리아 균주들의 병원성과 ERK 1/2 및 p38 MAPK의 지속적인 발현 간에는 역상관계가 관찰된다(13). 일반적으로 마이코박테리아가 MAPK를 활성화시키는 과정에서 병원성이 높은 균주는 MAPK 활성을 억제함으로써 결과적으로 병원성 마이코박테리아가 비병원성 균주에 비해 염증 매개인자들의 발현을 억제 조절하는 데 기여하게 되는 것으로 생각된다(13). 그러나 이같은 MAPK 활성을 조절하는 상위 신호전달 경로의 활성 또는 억제에 대한 연구 보고는 아직 매우 미흡하며 최근 Yadav 등의 연구 결과에 의하면(14) calcium/calmodulin/calmodulin kinase 및 cAMP/protein kinase A 경로 등이 대식세포에 대한 마이코박테리아 감염 후 ERK 1/2 활성 유도의 중요한 상위 조절 인자로 작용한다고 한다.

따라서 본 연구에서는 병원성(*M. tbc* H37Rv) 및 비병원성(*M. tbc* H37Ra) 결핵균에 의해 유도되는 ERK 활성이 케모카인 발현에 미치는 영향과 이를 조절하는 상위 신호전달 경로에 대해 조사하였다. 우선 세포 내 ERK 활성 조절과 관련되어 가장 많이 연구가 이루어진 신호전달 경로인 Ras-Raf-1-mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK)-ERK 경로(15)의 활성과 연관성이 있는지 살펴보았다. 고전적인 Ras 매개 경로는 Raf-1과의 결합 및 다양한 인산화 효소에 의한 Raf-1의 인산화(Ser338)와 밀접한 연관이 있다(16). 이는 결과적으로 ERK 1/2의 활성을 유도하며(15), 궁극적으로 각종 전사 인자 및 단백질 인산화 효소 등 타겟 분자들을 활성화하도록 돕는다(17)고 한다.

또한 MEK 활성 경로의 단백질 중 protein kinase-C (PKC) 경로의 특이 억제제를 이용하여 PKC 경로의 기여도를 조사하였다. PKC도 다양한 자극에 의해 ERK 및 NF- κ B를 활성화하는 효소로서 보고되었다(18). PKC 효소군은 처음에 phospholipid 의존성 serine/threonine kinase로 동정되었으며(19), 현재까지 11개의 PKC family member들이 다양한 세포 기능의 수행 및 조절과 관련되어 그 기능에 대한 보고들이 축적되고 있다(18). 그러나 현재까지 결핵균의 ERK 활성에 대한 상위 조절과정에 있어서 PKC의 역할에 대한 연구는 보고되지 않았다.

본 연구에서는 사람 단핵구에서 결핵균에 의해 유도되는 케모카인 중 CCL3 및 CCL4의 발현에 대한 ERK 1/2의 기능 분석 및 그 상위 조절 인자들을 탐구하고자 하였으며 그 결과, Ras-Raf-1-MEK 경로보다는 Src-PLC-PKC-MEK 경로가 ERK 1/2 활성의 상위 조절과정에 필수적인 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

재료 및 방법

결핵균의 준비 및 감염. 감염실험에 이용할 균일한 결핵균 혼탁액은 송 등(28)의 방법에 따라 준비하였다. 약술하면, *M. tbc* H37Rv (ATCC 27294) 및 *M. tbc* H37Ra (ATCC 25177)는 Sauton's media에서 37°C, 6주간 배양 후 상온에서 5,000 rpm, 30분간 원심분리하여 각각의 균체를 수집하였다. 수집한 균체는 10% OADC가 첨가된 7H9 액체배지로 부유시킨 후 글리세롤을 최종 30% (v/v) 되도록 가하여 1.5 ml eppendorf tube에 각각 1.0 ml씩 분주한 다음 -70°C에서 보관하였다. 실험에 사용할 때는 보관된 각 균액 0.5 ml를 7H10 (Difco Laboratories, Detroit, MI) 고체배지에 접종하여 10 내지 14일 동안 37°C에서 배양하여 정지기에 도달한 균체를 상온에서 5,000 rpm, 30분간 원심분리하고 PBS로 약 10⁷/ml의 농도로 조정하여 현탁시켰다. 균체의 덩어리들을 vortex mixer로 5분간 혼합처리한 후 상온에서 10분간 방치시킨 후 bead 및 clump를 제외한 상층액만 조심스럽게 모아 25-gauge 주사기로 10회 이상 통과시켜 남아 있는 균의 clump를 제거하였다.

상기에서 기술된 방법으로 준비된 결핵균을 단핵구에 대해 MOI (multiplication of infection)가 1 : 1이 되도록 균수를 조정하여 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 적정 시간 동안 배양 후 상층액 혹은 세포를 수집하여 실험에 사용하였다.

말초혈액으로부터 사람 monocytes의 준비. 건강한 공혈자로부터 정맥혈을 제공받아 Histopaque (Sigma)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액단핵세포를 수집하였다. 수집한 말초혈액단핵세포는 RPMI 1640 배지로 2 × 10⁶/ml의 농도로 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 24 well culture plate에 부착시켰다. 부착되지 않은 상층액은 제거하고 plate에 부착되어있는 세포의 분리는 4°C에 20분간 배양하여 세포가 움츠러들도록 한 후 가볍게 배양접시를 두드린 다음 cell scraper를 이용하여 조심스럽게 세포를 떼어내었다. 이 때 monocytes만 취하여 세포수의 산정 후 ELISA assay 등 다른 실험에 사용하였으며 분리된 monocytes의 순도는 항 CD14 항체를 이용한 유세포 측정에 의해 95% 이상임을 확인하였다. 결핵균 항원에 의한 사이토카인 반응이 lipopolysaccharide (LPS) 오염에 의한 것이 아님을 확인하기 위해 모든 실험 조건에서 LPS를 억제하는 polymyxin B (10.0 µg/ml)이 함유된 배지를 사용하였다.

억제제 및 항체의 전처리. MEK 활성의 특이 억제제인 PD98059와 U0126, Src kinase 억제제인 PP2, PLC 억제제인 U73122, PKC 특이 억제제인 G66976 및 Ro31-8220, Ras 억제제인 manumycin A 및 Raf-1 억제제인 GW 5074 은 모두 Calbiochem (San Diego, CA, USA)사에서 구입하

여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)는 억제제의 용해제 대조군으로 0.1% (vol/vol)의 농도로 배양에 첨가하였다. 사람 단핵구는 PBS로 세척한 다음 결핵균 감염 30 내지 45분 전, 억제제가 포함된 완전 RPMI 1640 배지로 교환하였다. 단핵구의 생존율이 억제제의 첨가에 의해 영향을 받지 않는지 여부는 Trypan blue 염색에 의해 확인하였다(결과는 그림으로 제시하지 않음). MAPK 경로 활성 분석을 위한 항 ERK 1/2- 및 항 phospho-ERK 1/2 항체는 모두 New England Biolabs (Schwalbach, Germany)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

Western analysis를 이용한 ERK 1/2 인산화 정도 분석. ERK 1/2 인산화 정도 분석은 이전 논문에 보고된 바와 같이(20) Western analysis 방법을 이용하여 분석하였다. 약술하면, 각 조건에서 배양된 세포(well 당 4 × 10⁵)를 수집하여, protease inhibitor가 포함되어 있는 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue)에 가한 후 초음파기(Branson, Danbury, USA)를 이용하여 40초간 sonication을 실시하였다. 이후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백 추출액을 수집하고 단백질 양을 정량한 후 SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel상에서 전기영동하였다. 전기영동 직후 nitrocellulose membrane으로 blotting한 후 5% skim milk가 들어있는 Tris-buffered saline Tween (TBST)로 1시간 동안 상온에서 blocking하였다. 1차 항체 반응을 위해 항 ERK 1/2- 및 항 phospho-ERK 1/2 항체(New England Biolabs, Schwalbach, Germany)를 구입하여 사용하였다. 1차 항체 반응은 각각의 항체를 4°C에서 18시간 동안 반응시켰으며 2차 항체 반응은 peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG 항체(Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)를 37°C에서 1시간 반응하였다. 단백질 발현 밴드의 검출은 detection reagent인 ECL (Amersham-Pharmacia)용액으로 상온에서 1분간 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켜 원하는 band를 확인하였다.

MEK kinase assay를 이용한 MEK activity 분석. *M. tbc* H37Rv 혹은 *M. tbc* H37Ra로 감염된 단핵구를 PBS로 세척 후 냉 lysis buffer를 이용하여 얼음 위에 30분간 배양하였다. 이후 원심분리하여 상층액을 수집한 후 anti-hMEK-1 antibody (SantaCruz Biotechnology)를 이용하여 2시간 동안 rocking platform 상에서 반응시켰다. Amersham Bioscience사의 protein A sepharose 부유액을 20 µl 첨가하여 3시간동안 더 반응시켰다. 이 면역침전물을 lysis buffer로 2회 더 세척 후 kinase assay buffer (20 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, 20 mM p-nitrophenylphosphate, 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM sodium orthovanadate, 및 2 mM DTT)로 2회 더 세척하였다. 면역복합체를 20 µl의 kinase buffer로 부유한 후 20 µM의 ATP, 5 µCi [-³²P]ATP (BLU 002Z, DuPont/NEN, Boston MA) 및 10 µg의 myelin basic

protein (MBP, Sigma)을 첨가하여 kinase 활성 반응을 25°C에서 30분간 수행한 후 반응을 중단하였다. 이 반응물을 SDS-PAGE 상에 전기영동하여 ³²P-labeled MBP의 발현 양상을 검출하였다.

ELISA를 이용한 CCL3 및 CCL4의 측정. 각 결핵균으로 감염시킨 후 18시간 동안 배양된 세포배양 상층액을 원심분리하여 얻은 후 BD Pharmingen사의 CCL3 및 CCL4 ELISA kit (BD Pharmingen, San Diego, USA)를 이용하여 상층액 속의 케모카인을 측정하였다.

통계학적 처리. 실험결과는 평균 표준 오차로 나타냈으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 11.5, Chicago, IL)으로 student's T-test에 의해 검증하였으며 P 값이 0.05 이하를 보이는 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

결핵균 감염에 의한 사람 단핵구의 케모카인 분비능 측정. 먼저 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염 후 말초

혈액 단핵구의 시간 경과에 따른 CCL3 및 CCL4의 생성능을 비교 분석하고자 하였다. 건강인 대조군의 말초혈액 단핵구를 분리한 후 결핵균을 각각 MOI 1 : 1의 비율로 처리한 다음 각각 3, 6, 18, 48 및 96시간 동안 자극하고 배양 상층액을 수집하여 케모카인 생성능을 ELISA 방법에 의해 측정하였다(Fig. 1A).

건강인의 말초혈액 단핵구에 대한 결핵균 감염 후 3시간부터 CCL3 생성이 매우 유의하게 증가되었으며 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염 간에도 매우 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(P<0.01). 이와 같은 CCL3 생성의 유의차는 48시간 배양까지 지속적으로 관찰되었으며 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL3의 생성은 균 처리 후 18시간에 정점을 나타내었다(*M. tbc* H37Rv 감염 시 76.2±8.7 ng/ml 및 *M. tbc* H37Ra 감염 시 94.9±5.9 ng/ml, Fig. 1A). 이후 48 및 96시간에는 각 결핵균 감염에 의한 CCL3 생성이 서서히 감소하는 양상을 나타냈다. CCL4의 생성도 매우 유사한 양상을 나타내었으며 6시간과 18시간에서 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염 간에 뚜렷한 유의차를 관찰할 수 있었다. 또한 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL4의

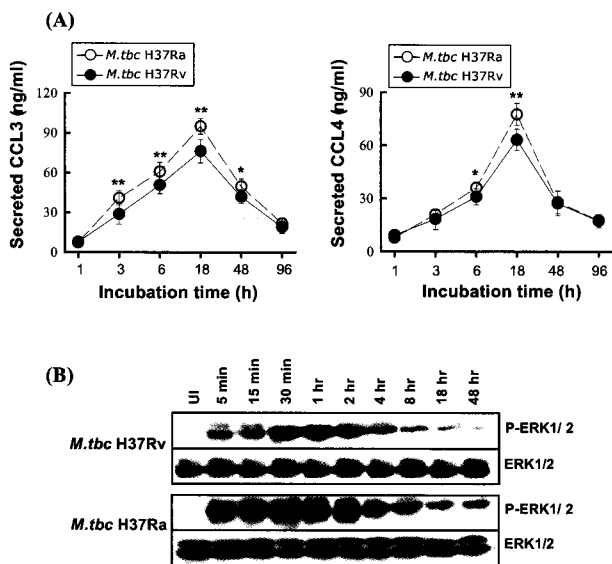


Figure 1. *M. tbc*-induced CCL3 and CCL4 secretion and ERK 1/2 phosphorylation from human monocytes. (A) Human monocytes were infected with *M. tbc* H37Rv or *M. tbc* H37Ra (MOI = 1) for 0, 1, 3, 6, 18, 48, and 96 h. CCL3 and CCL4 production was measured by ELISA. The cells infected with *M. tbc* H37Rv and *M. tbc* H37Ra were compared statistically. *P<0.05; **P<0.01. The error bars indicate SD. (B) Human monocytes were infected by *M. tbc* H37Rv and *M. tbc* H37Ra for the times indicated. The cells were lysed, and aliquots of the total cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted as described. The blots were incubated overnight with specific anti-phospho-ERK 1/2 (p-ERK), or specific control Ab for the unphosphorylated form, followed by appropriate peroxidase-coupled secondary reagents, and were visualized using ECL. Similar data were obtained in six independent experiments. UI: uninfected.

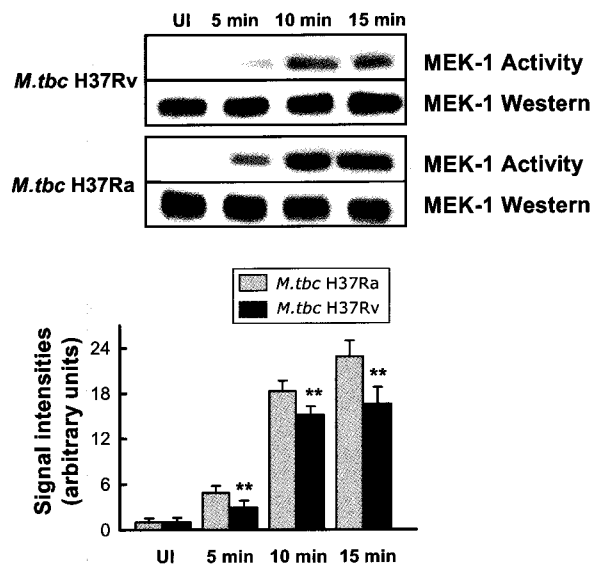


Figure 2. *M. tbc*-induced MEK activation in human monocytes. Human monocytes were infected with *M. tbc* H37Rv or *M. tbc* H37Ra (MOI=1) for 5, 10, and 15 min. Whole cell protein was obtained, and MEK1 was immunoprecipitated from 200 µg of the lysates. Kinase activity assays were performed using MBP (10 µg) as a substrate. The resulting phosphorylated proteins (MBP) were run out on 12% SDS-PAGE gels. The gels were dried and autoradiography was performed. Western analysis of the immunoprecipitated proteins was shown to demonstrate equal loading of the kinase in the activity assay. Densitometric data from three separate experiments, expressed as fold increase. The cells infected with *M. tbc* H37Rv and *M. tbc* H37Ra were compared statistically. **P<0.01.

생성 역시 균 처리 후 18시간에 정점을 나타내었다(*M. tbc* H37Rv 감염 시 63.1 ± 6.0 ng/ml 및 *M. tbc* H37Ra 감염 시 77.4 ± 6.2 ng/ml, Fig. 1A). 따라서 향후 실험에서 케모카인의 생성은 결핵균 감염 후 18시간의 상층액을 수집하여 상호 비교 분석하였다.

결핵균 감염에 의한 사람 단핵구의 ERK 1/2 활성화 측정. 사람 단핵구를 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra으로 MOI 1 : 1의 비율로 감염한 후 5분부터 48시간까지 다양한 시간대로 자극하였다. 각 시간대에서 세포를 lysis buffer로 용해하여 수집하고 MAPK 활성도를 ERK 1/2 인산화 form에 대한 특이 항체를 이용하여 Western analysis에 의해 비교 분석하였다(Fig. 1B). *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염 후 5분부터 단핵구에서 강한 ERK 1/2의 인산화가 관찰되었으며 결핵균 자극 후 30분 내지 1시간에 ERK 1/2의 인산화 정도가 가장 높았다. 또한 *M. tbc* H37Rv에 비해 *M. tbc* H37Ra 감염 후 5분부터 더욱 강한 ERK 1/2 활성을 관찰할 수 있었으며 이는 48시간까지 전 시간대에서 유의하게 증가된 양상이었다. 대조군으로 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 단핵구에 자극한 결과 결핵균과 유사하게 ERK 1/2의 활성을 유도하였다(결과는

그림으로 제시하지 않음).

결핵균 감염에 의한 사람 단핵구의 MEK 활성화 측정. 사람 단핵구를 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra으로 MOI 1 : 1의 비율로 감염한 후 5, 10 및 15분간 자극하였다. 각 시간대에서 세포를 lysis buffer로 용해하여 수집하고 MEK 활성도를 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염 후 5분부터 단핵구에서 강한 MEK kinase 활성이 관찰되었으며 결핵균 자극 후 10분 내지 15분에 MEK kinase 활성도가 가장 높았다. 또한 *M. tbc* H37Rv에 비해 *M. tbc* H37Ra 감염에 의해 더욱 강한 MEK 활성을 관찰할 수 있었다.

ERK 1/2 활성이 결핵균 감염에 의한 케모카인 생성에 미치는 영향. ERK 1/2 경로는 결핵균에 의한 사이토카인 생성에 매우 중요한 역할을 담당한다고 보고되었기 때문에(11,18), 이 신호전달 경로의 활성이 결핵균에 의한 케모카인 생성에 어떤 역할을 하는지 조사하고자 하였다. 사람 단핵구를 MEK 특이 억제제(PD98059 혹은 U0126)로 45분간 전처리한 후 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra으로 감염하였다. U0126 및 PD98059는 DMSO 용매제 내에 최종농도가 0.1%가 되도록 용해되어 있었기

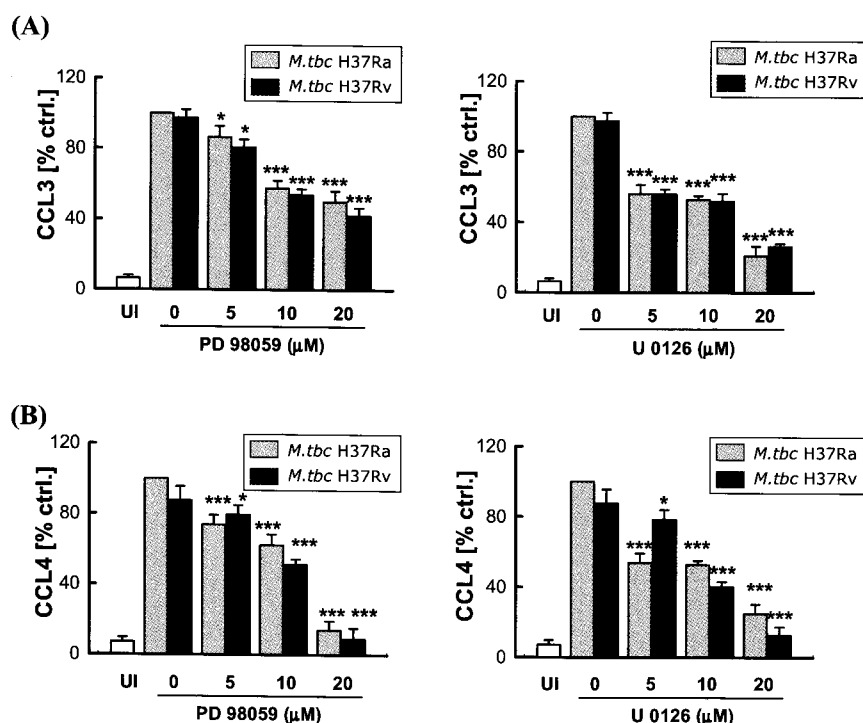


Figure 3. Effects of MEK inhibitors on *M. tbc*-mediated CCL3 and CCL4 production. The MEK inhibitor PD98059 or U0126 was added to monocytes at concentrations ranging from 5 to 20 M at 45 min before infection with *M. tbc* H37Rv and *M. tbc* H37Ra (MOI=1). The supernatants were harvested after 18 h for chemokine assessment using ELISA. One representative experiment performed in triplicate is shown. Similar data were obtained in five independent experiments. The mean levels (plus standard errors of the mean) of CCL3 (Panel A) or CCL4 (Panel B) following infection with *M. tbc* H37Ra were set to 100, and the relative loss of cytokine production in the presence of inhibitor is shown. The solvent control was 0.1% DMSO. UI: uninfected. The chemokine synthesis by cells infected with mycobacteria was statistically compared with those by uninfected control (UI). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

때문에 이 농도의 DMSO를 대조군으로 사용하였다.

Fig. 3A에서 보는 바와 같이 사람 단핵구에 대한 PD98059 혹은 U0126 전처리에 의해 *M. tbc* H37Rv 혹은 *M. tbc* H37Ra으로 감염 후 CCL3의 생성이 각 특이억제제의 농도별로 매우 유의하게 감소하였다. 또한 결핵균 감염에 의한 CCL4의 생성도 PD98059 및 U0126 전처리에 의해 농도 의존적으로 매우 유의하게 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3B). 이와 같은 결과를 통해 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL3 및 CCL4의 생성에 ERK 1/2 신호전달경로가 매우 중요한 역할을 하고 있음

을 알 수 있었다.

Ras 및 Raf 활성이 결핵균 감염에 의한 케모카인 생성 및 ERK 1/2 경로 활성화에 미치는 영향. 저자들은 상기 결과를 바탕으로 결핵균 감염에 의한 ERK 1/2 활성화의 상위 조절 인자들 중 어떤 신호전달 경로가 관여하는지를 조사하고자 하였다. Ras는 MEK/ERK 경로의 상위 조절 인자 중 하나로서 고전적으로 Ras-Raf-1-MEK-ERK kinase 경로는 ERK 활성을 유도하는 중요한 조절인자로 알려져 있다(15).

Ras 억제제인 manumycin과 Raf-1 억제제인 GW5074를

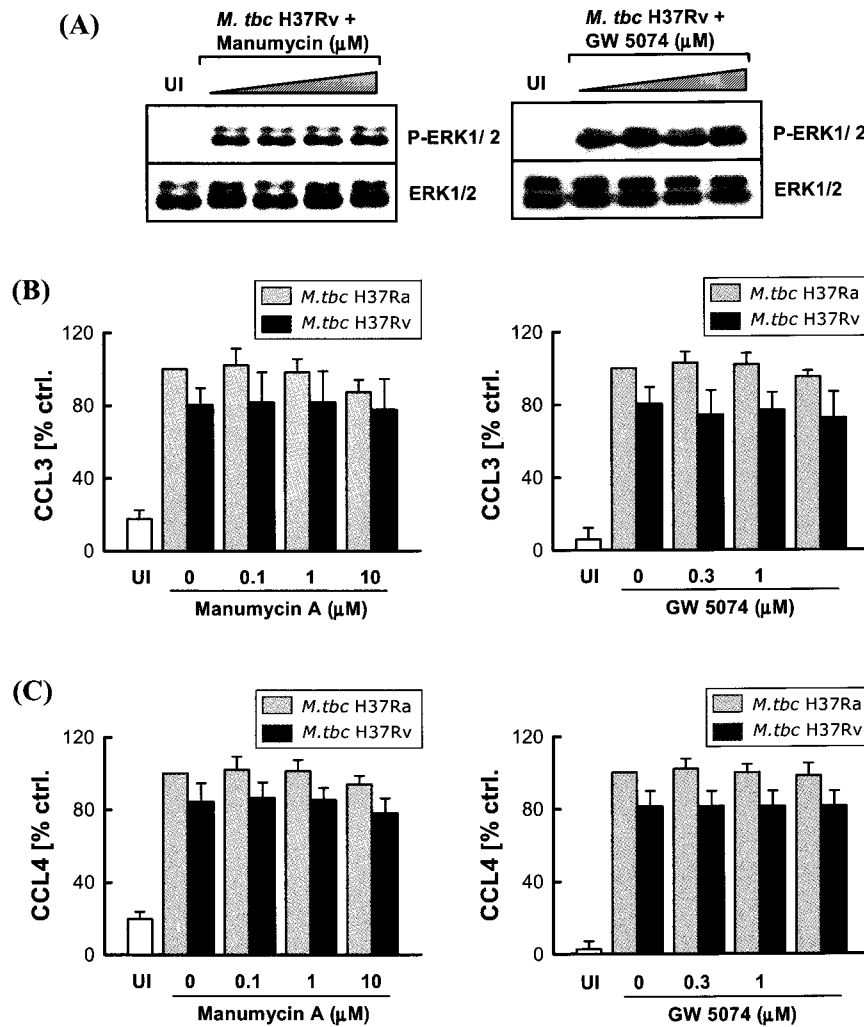


Figure 4. Effects of specific Ras or Raf-1 inhibitor on *M. tbc*-mediated ERK-1 phosphorylation, and CCL3 and CCL4 production. (A) The Ras inhibitor manumycin A or Raf-1 inhibitor GW5074 were added to monocytes at concentrations indicated for 30 min before infection with *M. tbc* H37Rv and *M. tbc* H37Ra (MOI=1). Whole-cell lysates were prepared at 30 min after infection with *M. tbc*, and 20 μg of total protein were analyzed by immunoblotting using phospho-specific Abs to ERK 1/2. To ensure equal protein loading, the blots were stripped and reprobed with an Ab to total ERK 1/2. A representative experiment of five independent replicates with similar results is shown. (B) Human monocytes were pre-incubated with manumycin A or GW5074 for 30 min before infection with *M. tbc* H37Rv or *M. tbc* H37Ra. The supernatants were harvested after 18 h for chemokine assessment using ELISA. The mean levels (plus standard errors of the mean) of CCL3 (Panel B) or CCL4 (Panel C) following infection with *M. tbc* H37Ra were set to 100, and the relative loss of cytokine production in the presence of inhibitor is shown. The solvent control was 0.1% DMSO. The chemokine synthesis by cells infected with mycobacteria was statistically compared with those by uninfected control (UI).

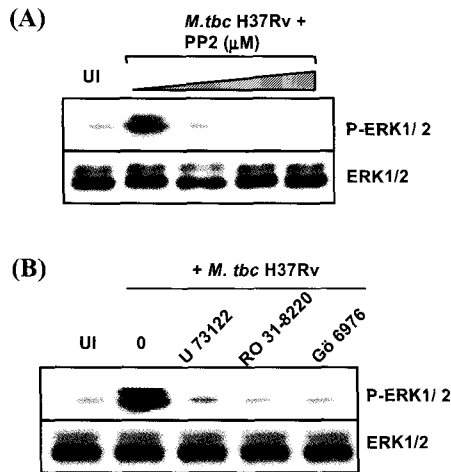


Figure 5. The role of Src, PLC, or PKC activity in modulating *M. tbc*-induced phosphorylation of ERK 1/2. Human monocytes were pre-incubated with the src kinase inhibitor PP2 at concentrations ranging from 5 to 20 μ M (Panel A). Panel B shows the data for the PLC inhibitor (U73122, 500 nM) and PKC inhibitors (RO 31-8220, 5 μ M; Gø6976, 2 μ M). Whole-cell lysates were prepared at 30 min after infection with *M. tbc*, and 20 μ g of total protein were analyzed by immunoblotting using phospho-specific Abs to ERK 1/2. To ensure equal protein loading, the blots were stripped and reprobed with an Ab to total ERK 1/2. A representative experiment of three independent replicates with similar results is shown. UI: uninfected.

농도별로 사람 단핵구에 전처리 후 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra으로 감염하고 30분 후 ERK 1/2 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 ERK 1/2 활성에 전혀 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 4A). Ras 혹은 Raf-1 억제제 전처리 및 결핵균 감염 후 4시간까지 ERK 1/2의 활성은 억제제를 처리하지 않은 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았다(결과는 그림으로 제시하지 않음).

또한 Ras 혹은 Raf-1 억제제 전처리 및 균 감염 18시간의 상층액을 수집하여 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL3 및 CCL4의 생성을 비교 분석하였다. Fig. 4B 및 C에서 보는 바와 같이 Ras 억제제인 manumycin과 Raf-1 억제제인 GW5074를 농도별로 사람 단핵구에 전처리한 후 결핵균 감염에 의한 CCL3 및 CCL4의 생성을 억제제를 전처리하지 않은 대조군과 비교한 결과, 서로 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 Western analysis의 결과와 일치하였다.

Src-kinase, PLC 및 PKC 활성이 결핵균 감염에 의한 ERK 활성 및 케모카인 생성에 미치는 영향. 케모카인 발현과 PLC 효소간에는 매우 밀접한 연관성이 있으며 PLC 효소 활성은 세포의 이주와 같은 다양한 생물학적 활성에 주도적인 역할을 담당한다(21). 또한 PKC도 다양한 자극에 의해 ERK 및 NF- κ B를 활성화하는 효소로서 보고되었다(18). 따라서 저자들은 src kinase, PLC 및

PKC 경로의 활성이 결핵균에 의한 ERK 1/2 활성 및 케모카인 생성에 어떤 영향을 미치는지 살펴보고자 하였다.

사람 말초혈액 단핵구를 Src kinase 억제제인 PP2, PLC 억제제인 U73122 혹은 PKC 억제제인 Gø6976과 Ro31-8220로 전처리하고 *M. tbc* H37Rv 혹은 *M. tbc* H37Ra으로 30분간 감염 후 ERK 인산화 정도를 Western analysis에 의해 비교 분석하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 Src kinase 억제제(PP2), PLC 억제제(U73122) 혹은 PKC 억제제(Gø6976 및 Ro31-8220) 전처리 후 결핵균 감염에 의한 ERK 1/2의 활성은 매우 유의하게 억제되었다. *M. tbc* H37Ra에 의해 감염된 단핵구에서도 매우 유사한 양상이 관찰되었다(결과는 그림으로 제시하지 않음).

또한 Src kinase 억제제(PP2), PLC 억제제(U73122) 혹은 PKC 억제제(Gø6976 및 Ro31-8220) 전처리 후 결핵균 감염 18시간의 상층액을 수집하여 *M. tbc* H37Rv 및 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL3 및 CCL4의 생성을 비교 분석하였다. Src kinase 억제제(PP2), PLC 억제제(U73122) 혹은 PKC 억제제(Gø6976 및 Ro31-8220) 전처리 후 *M. tbc* H37Rv 혹은 *M. tbc* H37Ra 감염에 의한 CCL3 및 CCL4 생성은 농도 의존적으로 감소하여 western analysis의 결과와 매우 일치함을 알 수 있었다(Fig. 6).

본 연구에서 사용된 모든 억제제에 의한 세포 생존율의 변화를 Fig. 6D에 나타내었으며 각 억제제의 가장 높은 농도에서도 세포 생존율의 유의한 감소는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서 Src kinase, PLC 및 PKC가 사람 단핵구에서 결핵균 감염에 의한 ERK 1/2 경로 활성 및 CCL3와 CCL4 생성에 매우 중요한 신호전달 효소로 작용함을 알 수 있었다. 또한 ERK 1/2와 MEK1의 활성 및 케모카인의 생성은 *M. tbc* H37Rv 감염에 비해 *M. tbc* H37Ra 감염에 의해 보다 유의하게 증가된 양상이었다. 그러나 Src kinase, PLC 및 PKC 경로 억제제를 전처리한 결과 병원성 및 비병원성 결핵균 모두에서 ERK 1/2 및 케모카인 활성이 감소되어 이들 신호전달경로는 병원성 및 비병원성 결핵균 모두에 공통적으로 관여한다는 것을 알 수 있었다.

이러한 연구 결과는 보다 병원성이 높은 *M. avium*에 비해 비병원성이며 증식속도가 빠른 *M. phlei* 및 *M. smegmatis*에 의한 MAPK 활성도가 매우 유의하게 증가되어 있었다고 하는 이전 보고(11)와 일치한다. 또한 대식세포에 대한 비병원성 결핵균 감염 후 ERK 1/2 및 p38 MAPK의 활성은 보다 오랫동안 지속되었다고 하며 이는 유의하게 증가된 TNF- α 생성에 기여하였다(11). 다른 보고에 의하면 사람과 마우스 대식세포에서 서로 다른 *M. avium* 균주형에 따라 MAPK 활성의 차이가 관찰

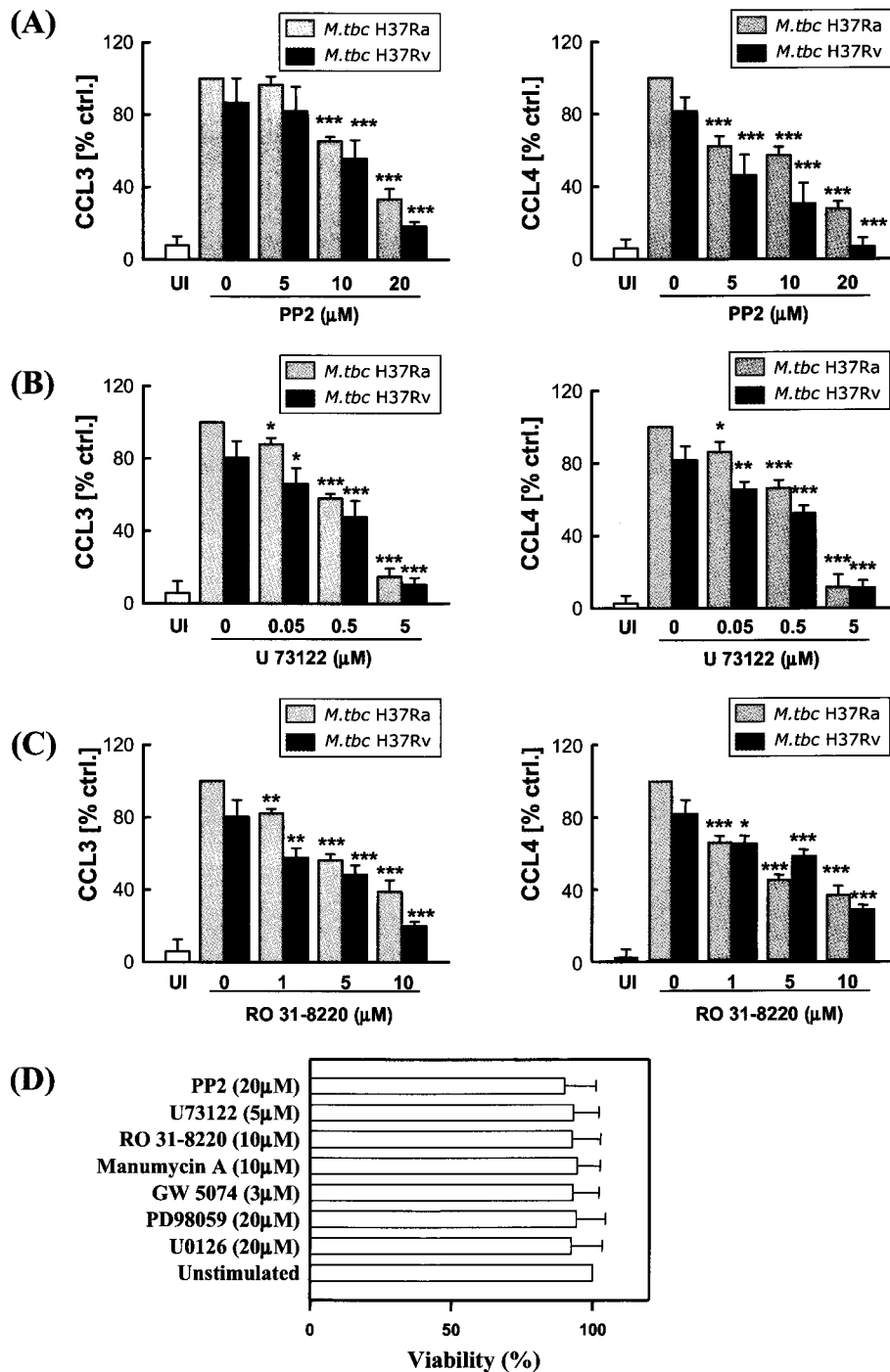


Figure 6. Effects of a Src kinase inhibitor (PP2), a PLC inhibitor (U73122), and a PKC inhibitor (RO 31-8220) on CCL3 and CCL4 production. The Src kinase inhibitor PP2 (Panel A), the PLC inhibitor U73122 (Panel B), or the PKC inhibitor RO 31-8220 (Panel C) were added to monocytes at the concentrations indicated for 30 min before infection with *M. tb* H37Rv or *M. tb* H37Ra (MOI=1). The supernatants were harvested after 18 h for cytokine assessment using ELISA. One representative experiment performed in triplicate is shown. Similar data were obtained in five independent experiments. The mean levels (plus standard errors of the mean) of CCL3 or CCL4 following infection with *M. tb* H37Ra were set to 100, and the relative loss of cytokine production in the presence of inhibitor is shown. The solvent control was 0.1% DMSO. UI, uninfected. (D) Assessment of cell viabilities after pre-treatment of various inhibitors. Assessment by Trypan blue exclusion indicated that monocyte viability was not affected by the presence of the inhibitors at the maximal dose. The chemokine synthesis by cells infected with mycobacteria was statistically compared with those by uninfected control (UI). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

되었다고 하며 MAPK 활성화는 대식세포의 항결핵 작용과 밀접한 연관성이 있었다고 한다(13). 이같은 연구결과들을 종합해 볼 때 병원성 결핵균에 의해 MAPK 활성화가 제한되는 것은 결핵균에 의해 유발되는 중요한 병독력 기전의 하나로 생각한다. 본 연구에서는 처음으로 병원성 결핵균에 의한 MEK1의 활성화도 역시 비병원성 결핵균에 비해 감소되어 있음을 확인하였다. 이와 같이 병원성 결핵균에 의해 MAPK 활성화가 제한되는 이유는 아직 명확히 알려지지 않았으나 *M. tbc* H37Ra와 *M. tbc* H37Rv 간의 병독력 차이에 중요한 인자 중 하나로 lipoarabinomannan (LAM) 성분에 의한 대식세포 활성화 및 세포 내 신호전달의 차이에 대한 연구결과들이 보고되었다(13). 주로 비병원성 마이코박테리아가 생산하는 Ara-LAM에 의해 TNF- α , chemokines 및 각종 염증성 매개물질들의 생성이 증가되었다고 한다. 반면에 Man-LAM의 경우는 대식세포 활성능을 억제하며 대식세포 내 결핵균 사멸에 중요한 아포토시스를 저해하는 역할이 있다고 보고되었다(13).

최근, 다양한 세포모델에서 다양한 자극에 의해 유도되는 염증성 사이토카인 발현의 세포 내 신호전달 경로에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(13). 특히 MAPK 신호전달 경로는 면역반응에 의해 매개되는 염증성 반응의 조절에 중요한 조절자이며 이러한 염증반응의 조절은 인간의 많은 질병과 관련성이 높기에 많은 연구가 집중되고 있다. 세포 내 MAPK 신호전달경로를 담당하는 단백질군은 다양한 면역반응에서 매우 필수적인 역할을 수행하며 ERK, p38 MAPK 및 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) 등의 인산화 효소 단백질들로 구성되어 있다(13). 대식세포에 대한 다양한 자극 후 ERK 1/2 활성화가 유도될 때 상위 신호전달 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 결핵균에 의해 유도되는 ERK 1/2 신호전달 과정의 상위 조절인자에 대한 연구는 매우 미흡하다. 최근 마우스의 골수 유래 대식세포에 옴소닌화시킨 결핵균을 감염한 후 ERK 1/2 경로의 활성화가 일어날 때, calcium/calmodulin/calmodulin kinase II 경로가 중요한 상위 신호전달 경로로 역할하고 있음이 보고되었다(14). 또한 *M. smegmatis*에 의해 감염된 세포는 *M. avium*에 의해 감염된 세포에 비해 cAMP의 생성량이 지속적으로 증가되었으며 이는 TNF- α 의 생성에도 기여하였다(14). 본 연구에서 cAMP/PKA 및 PLC/PKC 경로 간의 상관관계는 규명하지 않았으나 상호의존적 혹은 각기 독립적으로 MAPK 활성화에 기여하여 대식세포의 항결핵 방어능을 증가시킬 것으로 생각된다.

본 연구에서는 MAPK 활성화에 중요한 인자로 보고된 Ras effector의 역할을 탐구하였다. Ras는 작은 GDP 결합 단백질로 이들은 다양한 사이토카인 혹은 mitogen에 의

해 유도되는 면역세포의 활성화과정에 필수적인 신호전달 분자가 된다(22). 고전적인 Ras 매개 경로는 Raf-1과의 결합에 의해 Raf-1 활성화 및 다른 인산화 효소에 의한 Raf-1 Ser-338 위치 인산화를 유도하여(23) 이 Raf-1은 다시 ERK 분자들을 활성화시킴으로써(15) 궁극적으로 다양한 전사 인자들 및 단백질 인산화 효소의 활성화에 기여하게 된다(17). 그러나 세포 내 복잡한 정보전달 기전 중 Ras의 작용은 세포 내 다양한 인산화효소의 레퍼토리에 따라 어떤 신호전달경로가 활성화되느냐에 따라 활성화 여부가 결정되므로 매우 세포 의존적이다. Pathak 등(24)은 *M. avium*을 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포주에 감염시켰을 때 Toll-like receptor 2 (TLR2) 매개 신호전달경로를 통해 ERK 1/2 및 p38 MAPK를 활성화하고 cyclooxygenase-2 유전자 및 PGE₂의 생성에 기여하였다(24)고 한다. 동일한 보고에서 Ras는 *M. avium*에 감염된 대식세포에서 ERK와 결합하여 ERK 경로를 활성화하였다(24).

본 연구 결과에서 *M. tbc*에 의해 유도되는 사람 단백질의 CCL3 및 CCL4의 생성은 Ras와 Raf-1이 관여하지 않음을 알 수 있었다. 반면 PLC 및 PKC 경로가 *M. tbc*에 의해 유도되는 ERK 1/2 활성화 및 CCL3 및 CCL4의 생성에 기여하였다. 이러한 결과는 다양한 세포 형태에서 ERK 1/2가 결핵균 감염에 의해 활성화될 때 서로 다른 상위 신호전달경로가 이를 매개할 것임을 시사한다. PKC는 처음 phospholipid-dependent serine/threonine kinase로 동정되었으며 PKC family member들은 매우 다양한 세포 기능 수행 및 조절을 담당한다(19). PKC는 각종 세포 내 자극에 반응하여 ERK 및 NF- κ B 경로의 활성화에 관여하며(18) 현재까지 보고된 11개의 PKC 유전자들을 targeted disruption하여 연구한 보고들을 종합해 보면, PKC isotype 유전자들은 면역세포 내에서 각기 독특하고 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 특히, PKC ζ 돌연변이가 일어난 마우스는 TNF- α 에 대한 NF- κ B의 활성화가 급격히 감소되어 있으며(25) LPS 신호전달 과정에서도 중요한 신호전달 매개자 역할을 하였다(26). 본 연구에서 결핵균에 의해 유도되는 ERK 1/2 및 케모카인 활성화 과정 중 PKC family의 서로 다른 아형의 특이적인 기능에 대한 보다 면밀한 연구가 요청된다.

또한 본 연구결과는 *M. tbc* 감염에 의해 유도되는 케모카인 중 MCP-1 및 IL-8의 생성이 PKC 및 PLC에 의존하였다고 하는 이전 보고(12)와 부분적으로 일치한다. 한편, Ca²⁺ 의존성 PKC 활성화는 ERK 1/2 및 IKK/I κ B/NF- κ B 활성화에 기여하여 다양한 사이토카인 발현을 유도하였다(27). 이와 같은 이전 보고들 및 본 연구결과를 종합해 볼 때 마이코박테리아에 의해 유도되는 Ras-ERK 경로는 주로 PGE₂ 생성을 통한 면역억제(24)를 담당하는 반면 대식세포 내 PKC-ERK 활성화는 주로 사이토카인 등

다양한 effector 분자들의 활성화에 기여할 것으로 생각된다. 본 연구결과 사람 말초혈액 단핵구에서 결핵균에 의해 유도되는 케모카인의 발현에 Ras-Raf-1-MEK-ERK 경로보다는 PLC- PKC-MEK-ERK 경로가 주도적인 역할을 함을 알 수 있었다. 향후 ERK 활성화에 대한 상위 신호전달 경로 인자들의 상호의존성 및 조절 기전을 보다 면밀히 분석함으로써 염증성 케모카인 발현 및 항결핵 방어능 조절을 통한 새로운 결핵 치료기전을 모색하기 위한 기초 자료의 축적이 시급히 요청된다.

참 고 문 헌

- Orme I: The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. Trends Microbiol 6;94-97, 1998
- Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM: CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. Cell Immunol 216;65-72, 2002
- Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA: Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. Am J Respir Cell Mol Biol 19;513-521, 1998
- Luster A: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338;436-445, 1998
- Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12;121-127, 2000
- Rot A, von Andrian UH: Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. Annu Rev Immunol 22;891-928, 2004
- Maurer M, von Stebut E: Macrophage inflammatory protein-1. Int J Biochem Cell Biol 36;1882-1886, 2004
- Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK, Dawson T, Kuziel WA, Maeda N, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC: Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. J Immunol 164;6303-6312, 2000
- Luther SA, Cyster JG: Chemokines as regulators of T cell differentiation. Nat Immunol 2;102-107, 2001
- Blumenthal A, Ehlers S, Ernst M, Flad HD, Reiling N: Control of mycobacterial replication in human macrophages: roles of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. Infect Immun 70;4961-4967, 2002
- Roach SK, Schorey JS: Differential regulation of the mitogen-activated protein kinases by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. Infect Immun 70;3040-3052, 2002
- Fietta AM, Morosini M, Meloni F, Bianco AM, Pozzi E: Pharmacological analysis of signal transduction pathways required for *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-8 and MCP-1 production in human peripheral monocytes. Cytokine 19; 242-249, 2002
- Schorey JS, Cooper AM: Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. Cell Microbiol 5;133-142, 2003
- Yadav M, Roach SK, Schorey JS: Increased mitogen-activated protein kinase activity and TNF-alpha production associated with *Mycobacterium smegmatis*- but not *Mycobacterium avium*-infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/protein kinase A pathways. J Immunol 172;5588-5597, 2004
- Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J: Normal and oncogenic p21 ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. Nature 364;308-313, 1993
- Marshall C: Ras effectors. Curr Opin Cell Biol 8;197-204, 1996
- Whitmarsh AJ, Davis RJ: Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. Trends Biochem Sci 23;481-485, 1998
- Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D: ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. Am J Physiol Cell Physiol 283;C251-C260, 2002
- Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. FASEB J 9;484-496, 1995
- Song CH, Lee JS, Lee SH, Lim K, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK: Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein-1 by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-infected human monocytes. J Clin Immunol 23;194-201, 2003
- Anand-Apte B, Zetter B: Signaling mechanisms in growth factor-stimulated cell motility. Stem Cells 15;259-267, 1997
- Buscher D, Hipskind RA, Krautwald S, Reimann T, Baccarini M: Ras-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. Mol Cell Biol 15;466-475, 1995
- Zang M, Hayne C, Luo Z: Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. J Biol Chem 277;4395-4405, 2002
- Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S, Basak C, Mandal D, Kundu M, Basu J: Toll-like receptor 2 and mitogen- and stress-activated kinase 1 are effectors of *Mycobacterium avium*-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. J Biol Chem 279;55127-55136, 2004
- Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J: Targeted disruption of the PKC gene results in the impairment of the NF-B pathway. Mol Cell 8;771-780, 2001
- Procyk KJ, Rippo MR, Testi R, Hoffmann F, Parker PJ, Baccarini M: Distinct mechanisms target stress and extracellular signal-activated kinase 1 and Jun N-terminal kinase during infection of macrophages with Salmonella. J Immunol 163;4924-4930, 1999
- Matsubara M, Tamura T, Ohmori K, Hasegawa K: Histamine H1 receptor antagonist blocks histamine-induced proinflammatory cytokine production through inhibition of Ca²⁺-dependent protein kinase C, Raf/MEK/ERK and IKK/I kappa B/NF-kappa B signal cascades. Biochem Pharmacol 69;433-449, 2005