

LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 세신 추출물의 항염증 효과

정원석^{#1}, 유현미¹, 서상완¹, 조준기³, 손지우³, 박민철³, 최창민⁴, 염승룡⁴, 황상욱¹, 김영우¹,
송달수¹, 채영석¹, 김영목², 박성주¹, 신민교¹, 송호준^{*1}

1: 원광대학교 한의과대학 본초학 교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학 교실,
3: 원광대학교 익산 한방병원, 4: 원광대학교 광주 한방병원

Anti-inflammatory effect of extract of *Asarum sieboldii* in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage

Won-Seok Jung^{#1}, Hyeon-Mi Yoo¹, Sang-Wan Seo¹, Joon-Ki Cho³, Ji-Woo Son³,
Min-Cheol Park³, Chang-Min Choi⁴, Seung-Ryong Yeom⁴, Sang-Wook Hwang¹,
Yong-Woo Kim⁴, Dal-Soo Song¹, Young-Seok Chae¹, Sung-Joo Park¹,
Min-Kyo Shin¹ and Ho-Joon Song^{*1}

1: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University. 2: Dept. of Oriental Pathology, 3:
Dept. of Internal Medicine, Iksan Oriental Hospital, 4: Dept. of Internal Medicine, Kwangju Oriental Hospital

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from *Asarum sieboldii*(AS) on the peritoneal macrophage.

Methods : To evaluate of anti-inflammatory of AS, we examined cytokines production in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages. Furthermore, we checked molecular mechanism using western blot

Results : 1. Extract from AS reduced LPS-induced Nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-12 production in peritoneal macrophages

2. Extract from AS itself does not have any cytotoxic effect. AS inhibited the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and also the degradation of inhibitory kappa B α (I κ B α) in the LPS-stimulated peritoneal macrophages

Conclusion : AS down-regulated LPS-induced NO and cytokines production, which could provide a clinical basis for anti-inflammatory properties of AS

Key words : *Asarum sieboldii*(AS), lipopolysaccharide (LPS), inflammation.

#제1저자: 정원석, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실 · Tel: 063-850-6844

*교신저자: 송호준, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 063-850-6844 · E-mail: songhj@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2006년 5월 10일 · 수정 : 2006년 5월 26일 · 채택 : 2006년 6월 26일

서 론

세신은 쥐방울덩굴과의 다년생 초본식물로서 키는 12~24cm이다 *Asarum sieboldii* var. *seoulensis*(족도리풀)의 전초를 기원으로 하며 부분적으로 *Asarum sieboldii*(민족도리풀)의 전초가 혼용되어 이용되는 것으로 보고되었다¹⁾

주로 중국과 한국에 분포하는 세신(*Asarum sieboldii*)은 오래 전부터 이용되어온 주요한 전통한 약재로서 해열, 진정, 진통, 진해작용 및 항알레르기 작용^{2,3)} 등이 있는 것으로 알려져 있다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다.

nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생 성분자로서, NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다⁴⁾. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 lipopolysaccharide(LPS)로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다^{5,6,7,8,9)}. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. 또한 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor(TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-12와 같은 pro-inflammatory cytokine과 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등을 생산하게 된다^{10,11)}. 염증 매개 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증 매개 물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다^{12,13)}.

이에 세신이 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 NO, 전염증성 사이토카인(IL-6, IL-12, TNF- α)의 발현을 실험하였고, mitogen-activated protein kinase(MAPK) family인 extracellular signal-regulated kinase(ERK), C-jun N-terminal Kinase(JNK) 및 p38 kinase(p38)에 미치는 영향을 조사하였다. 더불어 IKB- α 를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 세신은 음니허브에서 구입하여 물 1L에 100g을 넣고 2시간 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다

2) 시약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodecyl sulfate(SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-IK-B- α , anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-mouse IL-6, TNF- α , IL-12 antibodies, 재조합 IL-6, TNF- α , IL-12는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다

3) 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

세신 물 추출물은 세신 100g을 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후 동결 건조 시켜서 용매를 제거하고 그 얻어진 분말을 농도별로 녹여서 실린지 필터로 여과해서 사용했다.

2) Peritoneal macrophage 세포의 배양

실험 3~4일 전에 실험 mouse에 염증 물질 (thioglycollate 2% 3ml)을 ip 로 투여하여 RPMI-1640+10% FBS medium을 6~7ml를 복강에 투여하여 넣어 복강액을 뽑아내 원심분리 한 후 cell을 counting해서 Dish나 Plate에 깔고 5% CO₂ 37°C가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고, suspension 세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다

3) MTT 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 1×10^6 /ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT 용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가함으로써 용해 했다. 그리고 계속해서 20~24시간 동안 배양하였다. formazan의 양은 570nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다

4) 일산화질소 (Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 일산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griss reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100 μ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메터(MD, U.S.A)로 540nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

5) Cytokine(TNF- α , IL-6, IL-12) 측정

LPS (500 ng/ml)로 대식세포를 자극하기 전 세신 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 18시간 뒤 이들 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다

6) Western blot analysis

복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60 mm culture dish에 1×10^6 cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 세신(500 mg/ml)으로 전처리 하고 30분 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세

척한 후 시간별(0, 15, 30, 60min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5000RPM, 5min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer(lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15000RPM, 20min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 맴브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2h blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 IK-Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세신의 대식세포에 대한 독성

세신의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 대식세포에 세신을 농도의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Figure 1에 나타난 바와 같이 세신은 대식세포에 독성을 나타내지 않았다.

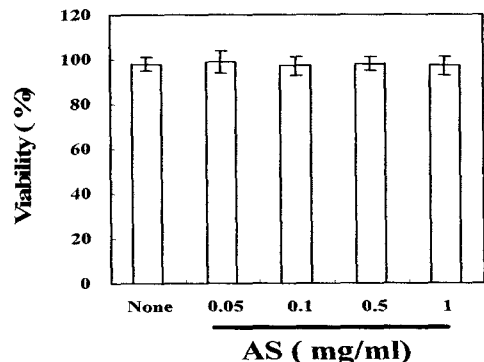


Figure 1. The effect of AS on cytotoxicity in peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were incubated for 24 hrs in the presence or absence of AS at indicated dose. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment.

2. 세신 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

세신은 해열, 진정, 진통, 진해작용 및 항알레르기 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 세신이 항염효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 세신이 대식세포에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세신을 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정된 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 세신추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다 (Figure 2).

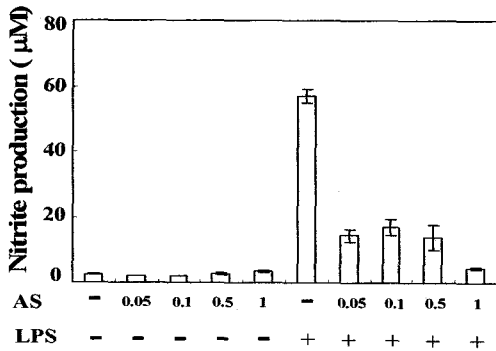


Figure 2 Inhibition of LPS-induced NO production by AS.

Cell were pretreated with or without extract at indicated concentration for 20min, and then incubated with or without 500nm/ml LPS for 24 hrs. NO released by cells was measured by the method of Griess.

3. 세신 추출물이 TNF- α , IL-6, IL-12 발현에 대한 영향

세신이 대식세포에서 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 세신을 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 TNF- α , IL-6, IL-12를 측정된 결과 세신 추출물이 염증성 세포활성물질들을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다 (Figure 3).

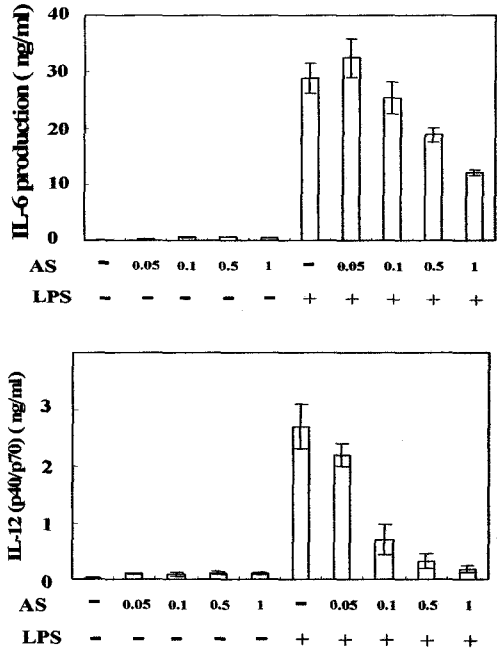
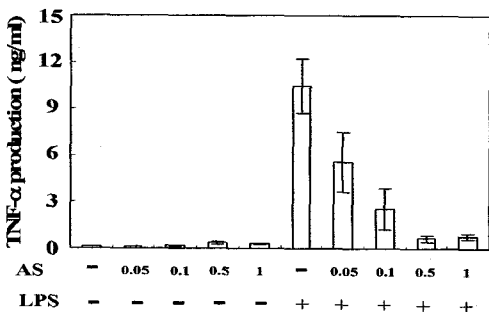


Figure 3. Effect of AS on the productions of TNF- α , IL-6, IL-12 in peritoneal macrophages stimulated with LPS. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30min, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 hrs. at indicated described in materials and methods

4. 세신 추출물에 의한 LPS로 자극된 Mitogen-activated kinase(MAPK)의 발현억제 효과

Mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. LPS로 자극된 대식세포에서는 p38, ERK, JNK의 활성이 증가 하지만, 세신을 전처리 했을 경우에 p38, ERK, JNK의 활성이 억제되었다 (Figure 4). LPS는 NF-KB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 세신이 NF-KB 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 세신을 전처리 하고 LPS로 자극한 대식세포에서 IKB- α 의 분해정도를 조사하였다. NF-KB는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 IKB- α 와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화시킬 수 있는 신호가 존재하면 먼저 IKB- α 가 분해되고 NF-KB는 핵으로 이동하여 다양한 cytokine을 생산하게 된다. 따라서 NF-KB의 활성은 IKB- α 의 분해에 의존하게 된다. Figure 4

에서 나타난 바와 같이 세신이 LPS에 의한 IK-Ba의 분해를 억제하고 있다. 즉 세신이 NF-KB의 활성을 억제하고 있다.

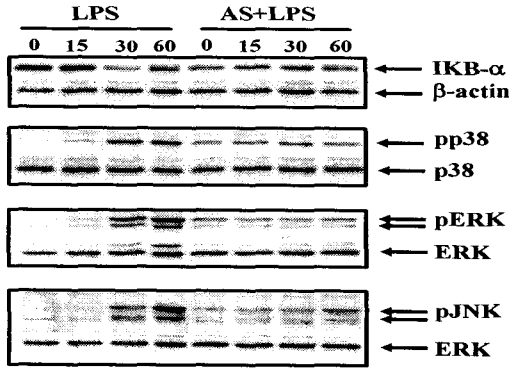


Figure 4. Effects of AS on the expression of IKB- α degradation and MAP kinase activity in LPS-stimulated of peritoneal macrophage cells. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30min, and then incubated with 500 ng/ml LPS for indicated time. Detail methods were described Materials and Methods.

고찰

세신(細辛)은 마두령과(馬兜鈴科)에 속한 多年生草本으로, 味辛性溫한 性品으로 肺腎 二經으로 歸經하여 溫肺化飲, 祛風散寒, 通竅止痛, 利水道하는 效能이 있어 風寒表證, 頭痛, 癆痛, 腹痛, 牙痛, 痰飲咳喘, 鼻淵, 竅閉神昏 등의 병증을 치료한다^{14,15,16,17,18)}.

그람음성 세균 세포외막의 성분인 lipopolysaccharide(LPS)는 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1(IL-1), IL-6, IL-12 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다^{19,20)}.

LPS 자극에 의하여 현저하게 영향받는 대식세포 신호전달 분자로는 serine/threonine kinase로써 세포 밖 신호를 핵내로 전달하게 하는 mitogen-activated protein(MAP) kinase가 있다. LPS에 의하여 활성화되는 MAP kinase로는 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK 1/2), p38, JNK등이 있고 LPS에 의해 분비된 TNF- α 에 의해서 NF κ B 유전자가 전사를 위한 활성화가 되어서 nitric oxide 및 superoxide anion 등의 free radicals이 생성된다^{21,22,23,24)}.

세신은 한의학에서 풍한표증에 거풍산한한 작용으로 사용되고 있고 이에 세신이 항염증작용을 가지고

있다고 생각되어 본 저자는 세신의 물 추출물로 대식세포에 세신이 미치는 영향을 검증하고자 대식세포에 세신이 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구에서 우선 세신이 대식세포에 대한 독성을 가지고 있는지 알아보기 위하여 MTT방식으로 조사한 결과 대식세포에 대한 독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다.그 다음으로 체내 염증과정에서는 다량의 nitric oxide(NO)가 생성되는데 세신을 농도별로 전처리 하고 LPS로 NO생성을 유도 했을때 NO의 생성이 세신추출물의 농도에 따라 농도의존적으로 억제 함을 알 수 있었다.

대식세포가 일단 활성화되면 그 결과로 TNF- α , IL-6, IL-12등의 cytokine이 생산되기 시작한다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 이러한 염증 매개물질을 유도하는데 세신으로 전처리 한 대식세포에서는 이러한 염증 매개물질이 농도 의존적으로 감소함을 볼 수 있었다.

그에 따라 전 염증성 cytokine들이 어떤 경로를 통해 억제되는지 알아보기 위해 MAPK 구성요소들(ERK1/2, JNK, p38)과 NF κ B의 활성을 조사하기 위해 IKB- α 를 Western blot 으로 MAPK 구성요소들의 인산화와 IKB- α 를 조사해 본 결과 세신이 IKB- α 의 분해를 억제했고, MAPK 구성요소들이 인산화 되는 것을 억제 하였다.

이러한 실험 결과들로 보아 세신이 대식세포에서 MAPK의 인산화를 저해하고 IKB- α 의 분해를 억제하여 전염증성 cytokine 들의 발현을 억제 하여 NO의 생산을 줄였다고 사료되어진다. 세신의 이와 같은 작용은 LPS로 유발되어지는 염증에 효과적일 것이라고 생각되고 앞으로 세신의 항염증 작용에 대한 in vivo 실험들도 함께 이루어져야 할 것이다.

결론

마우스의 복강 대식세포를 LPS로 자극하였을때 세신의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세신의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 세신농도별로 처리했을때 세포독성이 거의 나타나지 않음을 확인 할 수 있었고 현미경 관찰을 통해서도 이와 같은 결과를 얻었다.
2. 대식세포에서 LPS로 자극하였을 때 나타나는 NO 생산을 세신이 얼마나 억제할 수 있는지 알아보았

다. 그 결과 세신의 농도 의존적으로 NO 생산이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다.

3. 세신을 전처리 한 대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-12 항염증성 cytokine의 분비를 조사하였을 때 세신의 농도 의존적으로 cytokine 생산이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다
4. 세신 처리시 MAP kinase 활성화와 IKB- α 의 분해를 억제하여 NF κ B의 활성을 저해하는지 알아보기 위하여 western blot를 수행한 결과 IKB- α 의 분해를 방지하였고, ERK 1/2, JNK, p38의 인산화가 억제되었다

이와 같은 결과로 보아 세신 추출물은 대식세포에 작용하여 MAP kinase 의 인산화를 막고 IKB- α 의 분해를 억제함으로써 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제함으로써 LPS로 유발되는 대식세포의 염증성 작용들을 차단함으로써 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Park JH, Kim JS, Jeong AY, Namba T. Pharmacognosical Studies on the "Se Sin" Kor. J. Plant. Res. 1995;9(2):183-188
2. Hishimoto K, Yanagisawa T, Okui Y, Ikeya Y, Maruno M (Chin), Fujita T. Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*. *Planta Med.* 1994;60:124-127
3. Kokuo T, Yokota M, Nukaya H, Gotoh Y, Nagasawa M. Studies on antitussive principles of *asiasari radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 1978;26(7):2284-2285
4. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918
5. Kwqamata H, Ochiai H, Mantani N, terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000;28:217-226
6. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-309
7. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000;35:21-28.
8. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001;69:625-635
9. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:119-123.
10. Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BM. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 2006;176(6):3635-41.
11. Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun* 64(3): 1011, 1996
12. Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I and Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* 11:1995-2000(2003)
13. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004;70(2):93-103.
14. 신민교, 임상본초학 서울:영림사, 2002:327-9

15. 국가중의약관리국<중화본초> 편수회.중화본초.상해:상해과학기술출판사 1999:3권 2093
16. 김영균, 공복철.세신 근의 항 알레르기 효과에 대한 실험적 연구:한방성인병학회지:1998
17. 송호준. 세신뿌리가 아나필락시에 미치는 영향 대한본초학회지:1997
18. 張仲景. 金匱要略. 서울 : 醫道韓國社. 1975:57-61
19. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kun여 M: Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J* 2002;366:376-382
20. Binetruy B, Smeal T, Kariu M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 1991;351:122-127
21. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:211-218
22. Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *lab Invest* 2004;84:49-62
23. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase. TNF- α and COX-2 expression by suchinone effects on I- κ Ba phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J. Phamacol.* 139:11-20(2003)
24. Meng F, Lowell CA: Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 185(9): 1661, 1997
25. Hideshima T, Hayashi T, Chauhan D, Akiyama M, Richardson D, Anderson K. Biologic sequelae of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) activation on multiple myeloma cell lines. *Oncogene*. 2003;22:8797-8801
26. Shin HM, Lee YR, Chang YS, Lee JY, Kim BH, Min KR, Kim Y. Suppression of interleukin-6 production in macrophages by furonaphthoquinone NFD-37. *Int Immunopharmacol*. 2006 Jun;6(6): 916-23.
27. Lander HM, Sehajpai PK, Novogrodsky A: Nitric oxide signaling: a possible role for G protein. *J Immunol* 151(12): 7182, 1993
28. Chelvarajan RL, Liu Y, Popa D, Getchell ML, Getchell TV, Stromberg AJ, Bondada S.: Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *J Leukoc Biol.*: 2006