

lipopolysaccharide로 자극된 대식세포에서 금앵자의 Nitric Oxide 생성 및 NF-κB 활성 억제 효과

하현희 · 박순영 · 고우신¹ · 장정수² · 김영희*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, 1: 동의대학교 한의과대학 한의학과, 2: (주) 바이넥스 중앙연구소

Inhibitory Effect of *Rosa laevigata* on Nitric Oxide Synthesis and NF-κB Activity in lipopolysaccharide-stimulated Macrophages

Hyun Hee Ha, Sun Young Park, Woo Shin Ko¹, Jeong-Su Jang², Young Hee Kim*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
1: Department of Oriental Medicine, College of Medicine, Dongeui University, 2: Central Research Institute, Binex Co., Ltd.

Nitric oxide (NO) has been suggested to play an important role in endotoxin-mediated shock and inflammation. In this study, we investigated the effect of *Rosa laevigata* Michx. (Rosaceae) on the production of NO and the molecular mechanism of its action. *Rosa laevigata* inhibited NO generation and iNOS expression in LPS-stimulated murine macrophages. Activity of nuclear factor-κB (NF-κB) and the degradation of IκB-α were suppressed by *Rosa laevigata*. Furthermore, extracellular signal-stimulated kinase (ERK), which is known to be involved in NF-κB activation, is inhibited by *Rosa laevigata*. These results suggest that *Rosa laevigata* could exert its anti-inflammatory actions by suppressing the synthesis of NO through inhibition of NF-κB activity.

Key words : *Rosa laevigata*, Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Nuclear factor-κB (NF-κB), IκB-α, Extracellular signal-regulated kinase (ERK); lipopolysaccharide (LPS)

서 론

금앵자 (金櫻子: *Rosae Laevigatae* Michx.)는 열대지방에 자라는 상록성 관목의 장미과 식물의 열매로, 수렴성이 강하여 한방에서 유정 (遺精), 유뇨 (遺尿), 소변빈약, 만성 장염, 설사, 자궁출혈, 자궁하수에 사용한다. 성분으로는 유기산(사과산, 레몬산), 탄닌질, 정유, 비타민 C, 수지, 사포닌 등이 있다는 것이 알려져 있으나¹⁾, 금앵자의 항염증 기작에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

대식세포는 박테리아나 바이러스와 같은 외부의 침입자에 대항하는 면역계에 중요한 역할을 담당하고 있다. 대식세포는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 박테리아 독소에 의해 활성화되면 산화질소 (nitric oxide, NO)와 프로스타글란딘 및 사이토카인 (cytokines)과 등을 방출함으로써 외부의 침입자나 암세포를 죽이거나 성장을 억제한다. 특히 NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 대량 생산되는데 이런 다량의 NO는 의

부 침입자나 암세포를 제거하는 것 뿐 아니라 자신의 조직에도 손상을 입히게 된다²⁾. 따라서 iNOS 발현 저해를 통해 NO의 과도한 생성을 억제하는 것이 염증 치료에 중요한 한 target이 되고 있다^{3,4)}. 실제로 iNOS의 선택적인 억제제들을 투여했을 때 골관절염, 치주염, 실험적 자가면역성 심근염, 다발성 경화증 및 폐혈증 등이 개선된다는 보고들이 발표되었다⁵⁻⁹⁾.

iNOS 유전자 발현의 조절은 여러 가지 전사인자의 활성화에 의해 좌우된다. NF-κB, AP-1, IRF-1 및 Oct 등을 포함하는 전사인자에 대한 여러 결합 자리가 iNOS 유전자의 프로모터 (promoter) 부분에 있는 것이 밝혀져 있다¹⁰⁻¹²⁾. 이들 전사인자 중에 NF-κB는 LPS에 대한 iNOS 유전자의 발현에 주된 역할을 하는 것으로 보인다^{12,13)}. NF-κB는 p50와 p65로 구성된 이종이합체 전사인자인데, 여러 종류의 다른 Rel을 포함하는 이합체가 존재하는 것으로 알려져 있다. 정상 세포에서, NF-κB는 세포질에서 저해단백질 I kappa B (IκB)와 결합하여 존재한다. LPS 등에 반응하여, IκB는 26S 프로테아좀 복합체 (proteasome complex)에 의해 빠르게 유비퀴틴화 (ubiquitination) 되고 분해된다. 그러면 자유로운 NF-κB 이합체는 핵으로 이동하여 목표 유전자의 프로

* 교신저자 : 김영희, 부산시 금정구 장전동 산 30 부산대학교 분자생물학과

· E-mail : yheekim@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-2526

· 접수 : 2008/03/10 · 채택 : 2008/04/11

모터 부분에 강하게 결합하게 되고, 그것의 전사를 촉진한다. I κ B의 유비퀴틴화와 분해를 유도하는 작용은 I κ B의 보존된 N-말단 조절 부위에 존재하는 두 개의 세린 잔기 (Ser 32 and 36)를 인산화하는 것이다. 이 조절 부위를 인산화 시키는 것이 I κ B kinase (IKK) complex로 밝혀졌다. IKK는 IKK α 와 IKK β 의 두개의 촉매 활성 아단위 (catalytic subunits)와 조절 아단위 (regulatory subunit)인 IKK γ 로 이뤄져있다^{14,15}. IKK는 TNF- α , IL-1, LPS 등에 의한 자극에 빠르게 활성화 되어, I κ B- α 와 I κ B- β 에서 N-말단의 serine을 인산화시킨다.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 신호전달계의 활성화는 NF- κ B의 활성이 관여하는 여러 가지 세포 반응, 즉 증식, 분화, 특이적 대사기작 등과 관련된다. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)는 주로 성장촉진 인자 (growth factors), 사이토카인, 발암 촉진제 (tumor promoter)에 반응하며, LPS에 의해서도 활성화되는 것으로 나타났다¹⁶. ERK는 NF- κ B의 활성화와 iNOS 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 44 kDa ERK1과 42 kDa ERK2가 그 상위의 MEK1 및 MEK2에 의해 인산화되어 활성화 된다¹⁷.

본 연구에서는 금앵자의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 자극한 대식세포에서 염증매개 물질인 NO의 생성에 금앵자 추출물이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하고 그 작용기전을 밝혔다.

재료 및 방법

1. 추출물의 준비

본 실험에 사용한 금앵자 (*Rosa laevigata* Michx.)는 (주)광명생약 (Pusan, Korea)에서 구매하여 300 g을 2 시간 동안 전탕하여 추출하였다. 추출물을 0.45 μ m 필터를 통하여 거르고, 냉동 건조하여 12 g (4%)을 얻었다. 냉동 건조된 추출물 (*Rosa laevigata* extract, RLE)을 사용 전에 phosphate buffered saline (PBS)에 녹이고 0.22 μ m 필터로 걸러 사용하였다.

2. 세포 배양

쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 10% FBS가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 의 공기 상태로 배양하였다.

3. 산화질소 (NO) 농도 측정

세포 배양액 안의 NO 농도는 microplate 분석 실험 방법에 의해 측정하였다¹⁸. 세포배양액 100 μ l와 Griess reagent [1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)에 ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H $_3$ PO $_4$] 100 μ l를 섞어 실온에서 10 분간 배양하고 Vmax 96-well microplate spectrophotometer (분광광도계)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 아질산 나트륨의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

4. 세포 독성 분석 (MTT) 실험

대식세포의 생존율은 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의

해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 측정하였다¹⁹. 세포의 NO 양을 측정하고 남은 세포에 MTT 용액 (5 mg/ml)을 5 μ l 첨가하고 (최종 농도 62.5 100 μ g/ml) 3시간 동안 배양한 후 상층액을 제거한다. DMSO를 150 μ l 첨가하여 형성된 formazan 결정을 녹인 후 Vmax 96-well microplate 분광광도계로 575 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 핵 단백질 추출

핵 단백질 추출은 이전에 묘사한 바와 같이 하였다²⁰. 세포를 PBS로 3번 헹구고 완충액 A [10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl $_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 4 $^{\circ}$ C에서 15 분간 처리한 후 Nonidet P-40 (NP-40)을 넣고 5 분간 둔다. 그 후 12000 g에서 30 초간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 침전물에 완충액 B (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl $_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30 분간 배양하는데 수시로 교반을 해준다. 12000 g에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 모아 -70 $^{\circ}$ C에 보관한다.

6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

핵 단백질 추출물의 EMSA 실험은 NF- κ B consensus oligonucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3', Promega)를 사용하여 실행하였다²¹. oligonucleotide를 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 [γ -³²P]-ATP (3000Ci/mmol at 10 mCi/ml)로 표식을 하였다. 핵 추출물을 실온에서 10분 동안 EMSA 완충용액 (10 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 0.05% NP-40, 0.25 mg/ml poly dI/poly dC, protease inhibitor cocktail)에 배양한 후 혼합물을 32P-labeled oligonucleotide와 같이 실온에서 20 분 동안 배양했다. 배양 혼합물을 0.25X Tris/borate/EDTA 완충액에서 nondenaturing gel에 전기영동하였다. Gel을 말리고, -70 $^{\circ}$ C에서 X-ray 필름에 노출했다.

7. Western blot 분석

세포를 PBS에 3번 세척하고, 세포용해 용액 (1% Triton X-100, 1% deoxycholate)으로 파괴하였다. 단백질 농도를 측정하고²², 단백질의 동량을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후, gel을 0.45 μ m nitrocellulose 필터로 옮겼다. Blot을 anti-iNOS, p65, I κ B- α , ERK1/2, TBP, phospho-I κ B- α , phospho-ERK1/2, α -tubulin antibody 및 secondary antibody에 배양하고 화학 발광 검출 시스템 (Enhanced chemiluminescence system)으로 검출하였다.

8. 통계 분석

모든 결과는 평균 \pm S.E. 으로 나타내었다. 각 실험은 적어도 3번 반복했다. 통계처리는 paired student's t-test로 분석하였다. P 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 대식세포에서 NO 합성과 iNOS 발현에 미치는 금앵자 추출물의 효과

금앵자 추출물의 항염증 효과를 밝히기 위해 NO 합성에 대한 금앵자 추출물의 효과를 조사하였다.

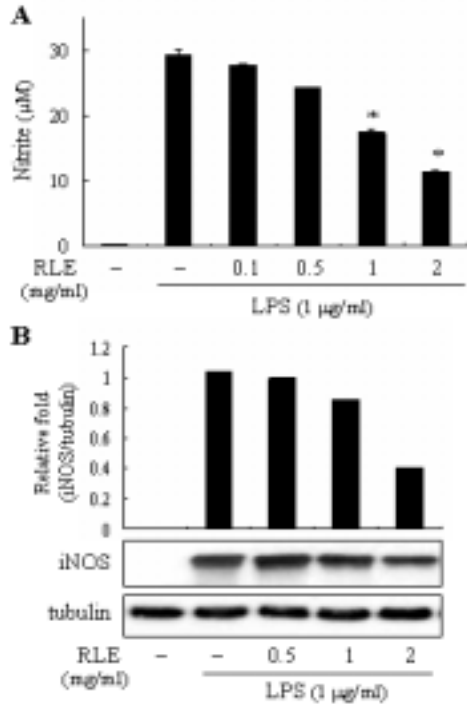


Fig. 1. RLE inhibits NO production and iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. (A) The cells were treated with 1 µg/ml of LPS in the absence or presence of different concentrations of AFRL for 20 h. At the end of incubation time, 100 µl of the culture medium was collected for nitrite assay. Data represented as means ± S.E. from three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. LPS-treated group. (B) RAW 264.7 cells were treated with RLE and/or LPS as mentioned above and equal cytosolic extracts were analyzed by Western blotting with anti-iNOS antibody. Western blot detection of α -tubulin was estimated protein-loading control for each lane.

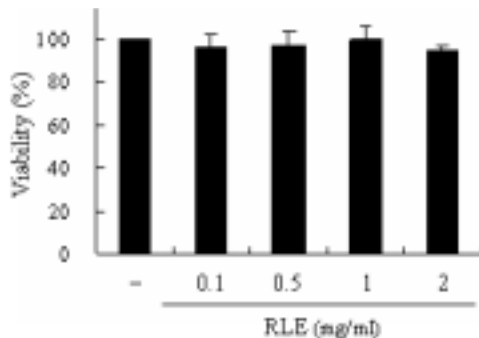


Fig. 2. Effects of RLE on cell viability. RAW 264.7 cells were incubated with various concentrations of RLE for 1 h and then stimulated with 1 µg/ml of LPS for 20 h at 37°C. The remaining cells after Griess reaction were used for MTT assay as described in Materials and methods. Data represented as means ± S.E. from three independent experiments.

RAW 264.7 대식세포에 금앵자 추출물을 1시간 동안 처리하고, 1 µg/ml LPS로 20 시간 동안 자극하였다. 배양액에 분비된 NO의 양을 Griess 법으로 측정하였다. LPS를 처리한 세포는 많

은 양의 NO를 생성하는 반면, 금앵자 추출물을 처리한 세포는 금앵자 추출물의 농도에 의존적으로 NO의 분비를 억제하였다 (Fig. 1A). NO 합성의 감소가 iNOS 발현과 관련되어 있는지를 확인하기 위해, Western blot analysis를 통하여 iNOS의 양을 분석한 결과 iNOS의 수준이 금앵자 추출물의 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 1B). 반면, MTT assay 결과 대식세포의 생존력은 금앵자 추출물에 영향을 받지 않았다(Fig. 2). 이 결과는 금앵자 추출물이 세포에 독성을 나타내지는 않으면서 iNOS의 발현에 영향을 주어 NO의 분비를 저해한다는 것을 나타낸다.

2. NF- κ B 활성화에 대한 금앵자 추출물의 효과

iNOS 프로모터에 전사인자인 NF- κ B가 결합하는 자리가 2 군데 존재하고 iNOS의 발현에 NF- κ B가 중요한 역할을 하므로 금앵자 추출물이 NF- κ B 활성을 조절하여 iNOS 발현을 억제하는 지 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 금앵자 추출물을 1시간 동안 전처리하고, 1 µg/ml LPS로 30분 동안 자극했다. LPS로 자극하지 않은 대조군에서는 NF- κ B/DNA 복합체가 거의 형성되지 않는 반면, LPS 처리에 의해 NF- κ B/DNA 복합체가 많이 형성되었다. 또한 금앵자 추출물을 전처리 했을 때 NF- κ B/DNA 복합체의 형성이 금앵자 추출물의 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 게다가 NF- κ B p65의 세포질로부터 핵으로의 이동이 금앵자 추출물에 의해 억제되었다(Fig. 3B). 이러한 결과들로 보아 금앵자 추출물이 대식세포에서 NF- κ B 활성을 억제함으로써 iNOS의 발현을 저해함을 알 수 있다.

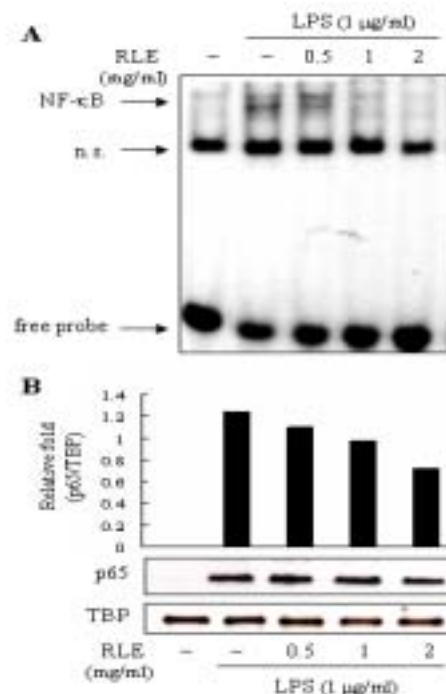


Fig. 3. Effect of RLE on NF- κ B activation. RAW 264.7 cells pretreated with a various concentration of RLE for 1 h and stimulated with 1 µg/ml of LPS for 30 min. (A) Nuclear proteins were extracted and assayed for NF- κ B DNA binding affinity by EMSA as described in Materials and methods. n.s., non-specific band. (B) Effect of RLE on nuclear translocation of NF- κ B. Cells were incubated as mentioned in (A) and equal amount of nuclear extracts were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 antibody. Western blot detection of TATA-binding protein (TBP) was estimated protein-loading control for each lane.

3. I κ B- α 인산화 및 분해에 대한 금앵자 추출물의 억제 효과

금앵자 추출물이 NF- κ B 신호전달 기전에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, NF- κ B의 활성을 조절하는 I κ B- α 의 인산화 및 분해에 미치는 금앵자 추출물의 효과를 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 금앵자 추출물을 1 시간 동안 전처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 15 분 동안 처리하고 I κ B- α 혹은 phospho-I κ B- α 의 단백질 수준을 Western blotting을 통해 검사했다. I κ B- α 는 LPS에 반응하여 분해되었지만, 금앵자 추출물을 전처리했을 때 금앵자 추출물의 농도 의존적으로 I κ B- α 의 분해를 억제하였다. 또한 LPS에 의해 I κ B- α 의 인산화가 유발되었으나, 금앵자 추출물 전처리에 의해 I κ B- α 의 인산화가 상당히 저해되었다(Fig. 4). 그러므로 이 결과는 금앵자 추출물이 I κ B- α 의 인산화를 저해하여 I κ B- α 의 분해를 억제하며, I κ B- α 를 인산화시키는 상위 kinase에 작용함을 시사한다.

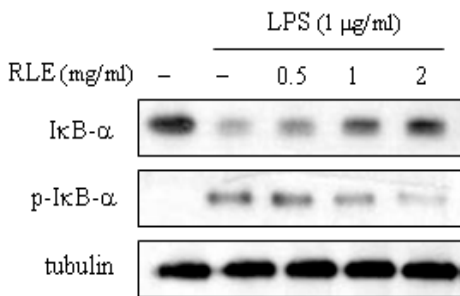


Fig. 4. Effects of RLE on LPS-induced phosphorylation and degradation of I κ B- α . RAW 264.7 cells were incubated with various concentrations of RLE for 1 h, and then stimulated with 1 μ g/ml of LPS for 15 min. Cells were harvested and equal cytosolic extracts were analyzed by Western blotting with anti-I κ B- α or anti-phospho-I κ B- α antibody. Western blot detection of α -tubulin was estimated protein-loading control for each lane.

4. MAPK 활성화에 미치는 금앵자 추출물의 효과

보다 상위 신호전달계에서 금앵자 추출물의 분자적 target을 밝혀내고자, NF- κ B의 기능을 조절하는 MAPK 활성화에 대한 금앵자 추출물의 효과를 관찰하였다. ERK1/2는 LPS에 반응하여 인산화되며 iNOS 발현 및 NF- κ B 활성을 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에, ERK1/2 활성을 그것의 인산화를 통하여 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 위와 같은 농도로 금앵자 추출물을 1 시간동안 전처리한 후, LPS를 1 μ g/ml 농도로 30 분 동안 처리하였다.

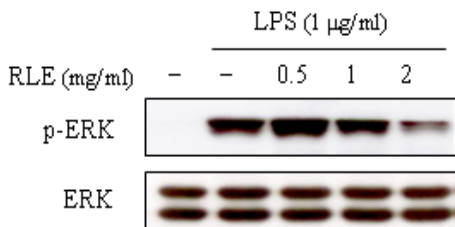


Fig. 5. Effects of RLE on the phosphorylation of ERK1/2. RAW264.7 cells were treated with indicated concentrations of RLE for 1 h and stimulated with 1 μ g/ml of LPS for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Equal amount of cell extracts was separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-phospho-ERK1/2 antibody. Western blot detection of anti-ERK1/2 was estimated protein-loading control for each lane.

Fig. 5에서 보듯이, 금앵자 추출물은 LPS에 의한 ERK1/2의

활성을 농도 의존적으로 억제하였다. 인산화되지 않은 ERK1/2의 양은 LPS와 금앵자 추출물 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 금앵자 추출물이 ERK1/2의 발현에는 영향을 주지 않으면서 ERK1/2의 인산화를 저해한다는 것을 나타낸다.

결론

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극했을 때 금앵자 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

대식세포에서 LPS에 의한 NO의 생성이 금앵자 추출물의 농도 의존적으로 감소하였으며 NO를 생성하는 효소인 iNOS의 발현 또한 감소하였다. 금앵자 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 금앵자 추출물에 의해서 세포독성이 거의 나타나지 않음을 확인하였다. 이 결과는 금앵자 추출물이 세포에 독성을 나타내지는 않으면서 iNOS의 발현에 영향을 주어 NO의 분비를 저해한다는 것을 나타낸다. 금앵자가 iNOS의 발현을 억제하는 기작을 조사하기 위하여 iNOS 발현에 중심적인 역할을 하는 NF- κ B의 활성화에 대한 금앵자 추출물의 효과를 EMSA 방법으로 조사하였다. 그 결과 금앵자 추출물의 농도에 의존적으로 NF- κ B의 DNA 결합능력이 떨어졌으며 NF- κ B가 핵으로 이동되는 정도 또한 금앵자 추출물에 의해 감소됨을 관찰하였다. 이 결과로 보아 금앵자가 NF- κ B의 활성을 감소시킨다는 것을 알 수 있다. NF- κ B의 활성 저하가 NF- κ B의 활성을 조절하는 I κ B- α 의 분해 및 인산화 억제 때문인지를 Western blotting으로 조사하였다. 금앵자 추출물이 LPS에 의한 I κ B- α 의 분해를 억제하였으며, I κ B- α 인산화 또한 억제하였다. 이것으로 보아 I κ B- α 를 인산화시키는 효소인 IKK1/2의 활성을 금앵자 추출물이 저해함을 유추할 수 있다. 또한 NF- κ B의 상위 신호전달계에 대한 영향을 알아보기 위하여 ERK1/2 인산화를 조사한 결과 금앵자 추출물에 의해 ERK1/2의 인산화가 억제됨을 관찰하였다.

이상의 결과들로 보아 금앵자는 LPS로 자극된 대식세포에서 ERK1/2의 활성, I κ B- α 의 인산화 및 분해를 억제함으로써 NF- κ B의 활성을 저해하고 이로 인해 iNOS의 발현 및 NO 생성이 억제됨을 알 수 있다. 그러므로 금앵자는 LPS로 유발되는 대식세포의 염증성 작용을 차단함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 여겨진다. 본 연구결과는 금앵자를 이용한 항염제 개발에 대한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원 (KRF-2005-042-E00184)과 2004년도 부산대학교 교내 학술연구비(신임교수연구정착금)지원으로 이루어졌음

참고문헌

1. 안덕균, 한국본초도감. 교학사, p 819, 2003.

2. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350, 1997.
3. Szekanecz, Z., Koch, A.E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19: 289-295, 2007.
4. Yan, Z.Q., Hansson, G.K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol. Rev.* 219: 187-203, 2007.
5. Pelletier, J.P., Jovanovic, D., Fernandes, J.C., Manning, P., Connor, J.R., Currie, M.G., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and Rheumatism* 41: 1275-1286, 1998.
6. Lohinai, Z., Benedek, P., Feher, E., Gyorf, A., Rosivall, L., Fazekas, A., Salzman, A.L., Szabo, C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 123: 353-360, 1998.
7. Shin, T., Tanuma, N., Kim, S., Jin, J., Moon, C., Kim, K., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Hyun, B. An inhibitor of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 92: 133-138, 1998.
8. Hua, L.L., Liu, J.S., Brosnan, C.F., Lee, S.C. Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon-beta: implications for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43: 384-387, 1998.
9. Levy, B., Valtier, M., de Chillou, C., Bollaert, P.E., Cane, D., Mallie, J.P. Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock* 11: 98-103, 1999.
10. Goldring, C.E.P., Reveneau, S., Algarte, M., Jeannin, J.F. In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6. *Nucleic Acids Res.* 24: 1682-1687, 1996.
11. Martin, E., Nathan, C., Xie, Q.W. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180: 977-984, 1994.
12. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 269: 4705-4708, 1994.
13. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., Murphy, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9730-9734, 1993.
14. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF-kB. *Nature* 388: 548-554, 1997.
15. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 395: 297-300, 1998.
16. Kim, S.H., Kim, J., Sharma, R.P. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol. Res.* 49: 433-439, 2004.
17. Guha, M., Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13: 85-94, 2001.
18. Schmidt, H.H.H.W., Kelm, M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: *Methods in Nitric Oxide research*, John Wiley & Sons Ltd. pp 491-497, 1996.
19. Kim, Y.H., Ko, W.S., Ha, M.S., Lee, C.H., Choi, B.T., Kang, H.S., Kim, H.D. The production of nitric oxide and TNF-alpha in peritoneal macrophages is inhibited by Dichroa febrifuga Lour. *J. Ethnopharmacol.* 69: 35-43, 2000.
20. Ha, M.S., Kim, Y.H., Ko, W.S., Kim, H.D. Scrophularia buergeriana inhibits the production of NO through the suppression of NF-kB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Korean J of Oriental Physiology & Pathology* 16: 1284-1290, 2002.
21. Kim, Y., Moon, J.S., Lee, K.S., Park, S.Y., Cheong, J., Kang, H.S., Lee, H.Y., Kim, H.D. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through IKK and NF-kappaB activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 695-703, 2004.
22. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.