

## TNF- $\alpha$ 자극에 의한 U937 단핵구 세포의 HT29 대장 상피 세포 부착에 대한 Berberine의 PPAR $\gamma$ 가 아닌 NF- $\kappa$ B 경로를 통한 억제 효과

박수영 · 이광익 · 김일엽 · 김정애<sup>#</sup>

영남대학교 약학대학

(Received September 8, 2009; Revised October 20, 2009; Accepted October 20, 2009)

### Inhibitory Effect of Berberine on TNF- $\alpha$ -induced U937 Monocytic Cell Adhesion to HT29 Human Colon Epithelial Cells is Mediated through NF- $\kappa$ B Rather than PPAR $\gamma$

Su-Young Park, Gwang Ik Lee, Il-Yeob Kim and Jung-Ae Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**Abstract** — Berberine, an isoquinoline alkaloid, has a wide range of pharmacological effects, including anti-inflammation. It has been reported that berberine inhibits experimental colitis through inhibition of IL-8, and that inhibitory effect of berberine on inflammatory cytokine expression is mediated through peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$ . In this study, we examined the effects and action mechanism of berberine on the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to HT29 human colonic epithelial cells, which is commonly used as an *in vitro* model of inflammatory bowel disease (IBD). Berberine significantly inhibited the TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to HT29, which is similar to the effect of PDTC, a nuclear factor (NF)- $\kappa$ B inhibitor. However, ciglitazone and GW, the ligands of PPAR- $\gamma$ , did not suppress the TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to HT29 cells. In addition, TNF- $\alpha$ -induced chemokine expression and NF- $\kappa$ B transcriptional activity were significantly inhibited by berberine in a concentration-dependent manner. The results suggest that inhibitory effect of berberine on colitis is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B-dependent chemokine expression.

**Keywords** □ berberine, colitis, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$ , chemokine

염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 소장과 대장에 걸쳐 전반적으로 염증이 있으며, 증상으로 설사, 통증, 체중 감소 등을 동반한다.<sup>1)</sup> 염증성 장질환에 대한 병태 생리 기전이나 원인은 정확히 밝혀져 있지 않으나, 장내 세균총에 대한 비정상적인 면역반응, 즉, 염증 세포의 과도한 활성화에 의한 것으로 추정되고 있다.<sup>2)</sup> 활성화된 백혈구의 장 점막 부착 및 조직 내 유주를 통한 점막 손상이 염증성 장질환의 가장 중요한 과정으로 인식되며, 이러한 과정을 매개하는 매개체 중의 하나로 chemokine의 중요성이 대두되고 있다.<sup>3,4)</sup> Chemokine은 단핵구와 T 림프구 등과 같은 여러 종류의 세포에서 발현되며, 다양한 세포를 활성화하여 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine의 발현을 촉진한다.<sup>5,6)</sup> TNF- $\alpha$ 에 의해 발현이 유도되는 chemokine으로 염증 부위로 백혈구의 유주 및 부착을 유도하는

중요인자로 monocyte chemoattractant protein(MCP)-1과 interleukin(IL)-8이 있으며,<sup>7,8)</sup> 이들은 염증성 장질환의 개시는 물론 병변을 악화시키는 인자로 알려져 있다.<sup>9)</sup>

Nuclear Factor(NF)- $\kappa$ B는 세포질에 존재하고 있으며, 활성화되면 핵으로 이동하여 면역 반응과 염증 반응을 조절하는 여러 가지의 유전자들의 발현을 매개한다. TNF- $\alpha$ 에 의한 TNF- $\alpha$  수용체의 활성화는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며, 이는 곧 MCP-1과 IL-8 등의 발현을 증가 시키게 된다.<sup>10,11)</sup> 따라서, NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 MCP-1과 IL-8 등의 발현을 감소 시킬 수 있는 물질은 치료제로서 크게 기여할 수 있을 것이라 생각한다.

환련의 주요 알칼로이드 성분인 berberine은 암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있으며,<sup>12)</sup> 장 상피세포에서 cyclooxygenase-2의 억제 효과 뿐만 아니라,<sup>13)</sup> 망막색소상피세포에 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MCP-1과 IL-8의 발현을 억제하는 효과를 가진다는 보고가 있다.<sup>14)</sup> 또한, berberine은 trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)로 유도한 동물의 장염을 억제하는 효과가 보고되었으며, 이러한 효과는 IL-8의 억제에 의한다는 보고가 있다.<sup>15)</sup> 또한,

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-810-4654  
(E-mail) jakim@yu.ac.kr

berberine이 대식세포에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등의 염증성 사이토카인의 발현을 억제하며, 그 작용은 peroxisome proliferator activated receptor(PPAR)- $\gamma$ 를 통해서 이루어진다고 보고되었다.<sup>16)</sup> 본 연구에서는 *in vitro* 장염 모델인 단핵구 세포와 대장 상피 세포 사이의 부착 모델에서 berberine의 장염 억제 작용 및 이에 대한 전사인자, NF- $\kappa$ B 및 PPAR- $\gamma$ 의 역할을 규명하고자 하였다.

## 실험방법

### 시약

이 실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS)와 penicillin/streptomycin(PS), RPMI1640 배지는 Hyclone사(South Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES), sodium pyruvate, sodium bicarbonate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), BCECF-AM, diphenylpicrylhydrazyl은 Sigma사(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Human TNF- $\alpha$ 는 Biosource사(Camarillo, CA, USA)에서 구입하였고, trizol reagent는 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Taq DNA polymerase는 Takara사(Shiga, Japan)에서 구입하였다. GeneJammer transfection reagent는 Stratagene사(CA, USA)에서 구입하였다. Dual-Luciferase reporter assay system은 Promega사(Corporation, Madison, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양(Cell culture)

HT29 사람 대장 상피세포는 10% FBS, 1% PS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate가 함유된 RPMI1640 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였으며, 세포가 배양 flask에 80% 이상 자라면 1:3의 비율로 계대하여 본 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정(MTT assay)

HT29 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>가 되게 배양한 후 시료들을 처리하였다. 일정시간 처리 후에 5 mg/ml MTT 용액을 각 well에 처리하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 형성된 formazan 크리스탈을 녹여서 540 nm의 파장에서 microplate reader(Molecular Devices, VersaMAX, Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 부착능 실험(Adhesion assay)

U937 세포에 10  $\mu$ g/ml BCECF-AM를 처리하여 37°C에서 30분 동안 반응 시켜 준비해 두었다. HT29 세포를 48 well plate

에  $1 \times 10^5$  cslls/cm<sup>2</sup>가 되게 배양하여 1% PS만 함유된 각 화합물을 1, 5, 10  $\mu$ M 농도로 1시간 전처리 하고, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 처리하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 화합물이 처리된 HT29 세포의 배지를 제거하고 PBS로 1회 씻어 주었다. 그 후 BCECF-AM으로 처리된 U937 세포를 HT29 세포와 함께 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 부착되지 않은 U937 세포를 제거하기 위하여 PBS로 1회 씻어 주었다. 세포 용해를 위해 0.1% Triton X-100 in 0.1 M Tris를 처리하여 30분 동안 실온에서 반응 시킨 후, Fluostar optima microplate reader(BMG Labtechnologies, GERMANY)을 사용하여 형광을 정량 하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

HT29 세포를  $1 \times 10^5$  cslls/cm<sup>2</sup>이 되게 배양하였다. Berberine을 1시간 전처리 하고, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 3시간 동안 37°C에서 반응시켰다. Trizol reagent를 이용하여 total cellular RNA를 추출한 다음, Ready-To-Go T-primed first strand kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 0.5 U Taq DNA polymerase를 사용하여 MCP-1, IL-8, PPAR- $\gamma$ , GAPDH primer로 PCR을 수행하였으며 그 sequence는 아래와 같다. Human MCP-1(5'-ATG AAA GTC TCT GCC GCC CTT-3', 3'-TGG GTT TGA GGC TTC TGA ACT-5'); human-IL-8(5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3', 3'-CTC TTC AAA AAC TTC TCC CGA CTC T-5'); human PPAR- $\gamma$ (5'-ATG ACA GCG ACT TGG CAA TA-3', 3'-TAA AGG GAA GAA GGT CAA CG-5'); human-GAPDH(5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3', 3'-CCA GTA GGT ACT GTT GAA AC-5'). PCR 산물은 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 전기영동을 수행한 후 gel documentation system(UVP, Cambridge, UK)를 이용하여 각각의 밴드를 관찰하였다.

### Reporter gene 발광효소 실험(Reporter gene luciferase assay)

HT29 세포가 50~60% 정도 자랐을 때 PBS로 2회 씻어 준 후, 10% FBS는 포함하고 PS은 포함되지 않은 RPMI1640 배지 6.5 ml와 transfection mixture 700  $\mu$ l를 넣어 37°C에서 3시간 반응 시켰다. 이때의 transfection mixture은 35  $\mu$ l GeneJammer transfection reagent 와 0.24  $\mu$ g/ml NF- $\kappa$ B luciferase construct (firefly luciferase)와 0.2  $\mu$ g/ml pRL-TK(renilla luciferase)를 FBS와 penicillin/streptomycin을 포함하지 않는 700  $\mu$ l의 RPMI1640 배지에 넣어 실온에서 7분간 반응 시킨 후 사용한다. Transfection의 반응이 끝나는 3시간 후 10%의 FBS와 1%의 PS 이 함유된 RPMI1640 배지를 7 ml 넣어 준 후 37°C에서 24시간 배양시켰다. NF- $\kappa$ B가 transfection이 된 세포를 24 well plate에

$1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>이 되게 배양하였다. 10  $\mu$ M의 berberine을 1시간 전처리 하고, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 3시간 처리 후 37°C에서 반응시켰다. PBS로 1회 씻어 낸 후 lysis buffer를 넣어 -70°C에서 24시간의 freezing 과정 후 세포들을 모은 다음 LAS, stop & Glow buffer를 첨가하여 Turner TD20/20 luminometer(Turner Biosystems, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

**Immunocytochemistry 방법에 의한 NF- $\kappa$ B(p65)의 핵 내 이동 측정**

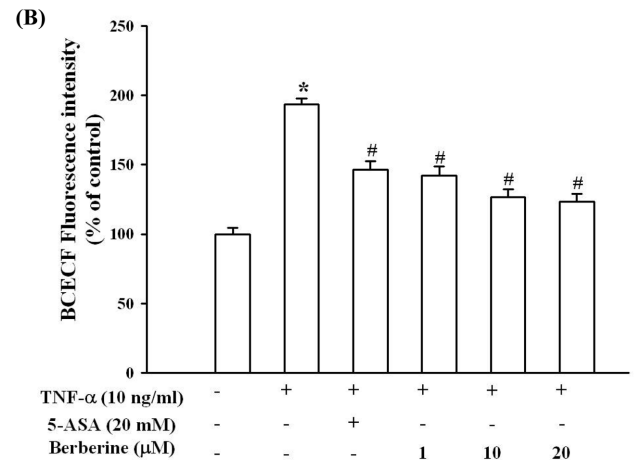
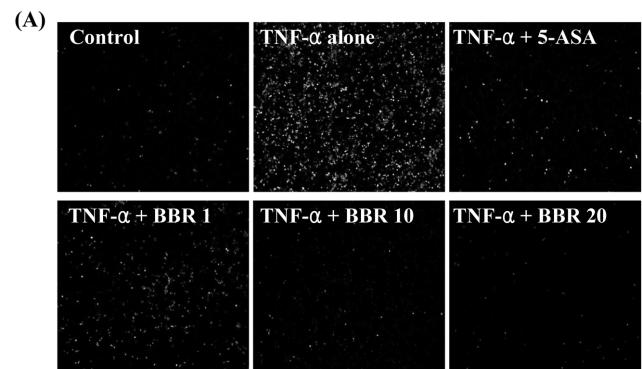
Immunocytochemistry을 이용하여 NF- $\kappa$ B(p65)의 핵 안으로 이동을 측정 하였다.<sup>17)</sup> HT29 대장 상피세포를 배양 한 후, 20  $\mu$ M의 berberine을 1시간 전처리 하고, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 3시간 처리 후 37°C에서 반응시켰다. 3.7% paraformaldehyde/PBS(pH 7.2) 용액으로 세포를 고정시키고, 0.4% Triton X-100 용액으로 permealization시켰다. PBS를 이용해 1회 씻어준 후, 3% bovine serum albumin용액으로 세포를 1시간 동안 반응시키고 1 : 100의 배율로 희석한 anti-NF- $\kappa$ B(p65) antibody 용액에 4°C에서 20 시간 동안 반응시켰다. Tris-buffered saline-Tween20(TBS-T)용액으로 세포를 씻어 주었다. Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG을 3% BSA가 포함된 TBS에 1 : 200의 배율로 희석시킨 용액에 세포를 실온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS-T(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20)용액으로 씻어 준 후, 600 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 세포를 5분 동안 염색시켰다. 다시 세포를 씻어 준 후, Prolong Gold Antifade reagent로 고정시키고 커버 슬라이드로 덮었다. 마지막으로 샘플들은 Nikon microscope(TE-2000U)를 사용하여 측정

하였다.

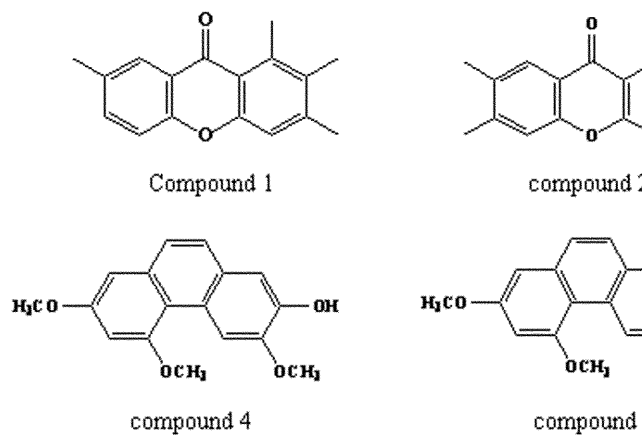
**실험결과 및 고찰**

**TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 대장 상피세포와 백혈구의 부착에 대한 berberine의 억제 효과**

염증성 장질환의 점막 손상에 기여하는 가장 중요한 병적 과정인 활성화된 백혈구의 장 점막 부착 및 조직으로의 이주 과정에 미치는 berberine의 영향을 확인하기 위해 먼저, 대장 상피 세포 생존율에 미치는 berberine의 영향을 조사하였다. 그 결과,



**Fig. 2** – Inhibitory effects of berberine on TNF- $\alpha$ -induced U937 monocytic cell adhesion to HT29 colonic epithelial cells. Monocyte-epithelial adhesion was evaluated using the human leukemia pre-monocytic U937 cells which were pre-labeled with 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF/AM, 10  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C. A set of cells was taken and imaged by inverted fluorescence microscopy (A). In other sets, cells were lysed in 0.1% Triton X-100 in 0.1 mol/l Tris, and the lysates were measured for fluorescence by using a fluorometer (FLUOstar Optima) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm (B). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared to untreated control group. # $P$  < 0.05 compared to the TNF- $\alpha$  treated group.



**Fig. 1** – Effect of berberine and TNF- $\alpha$  on the cell viability of HT29 cells. HT29 cells were seeded in 96-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. The cells were pretreated with berberine for 1hr, and then, incubated in the absence (black bars) or presence (white bars) of of TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 3 hr. The cell viability was assessed using the MTT staining method. The data represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

berberine을 단독으로 4시간 처리하거나(Fig. 1, 검은 막대), berberine을 1시간 전 처리하고 TNF- $\alpha$ (10  $\mu$ g/ml) 3시간 처리의 경우(Fig. 1, 흰색 막대) 모두 세포 생존율에 큰 영향이 없었다.

Berberine은 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 대장 상피세포와 단핵구의 부착능을 유의하게 억제함을 확인하였다(Fig. 2). Berberine (10  $\mu$ M과 20  $\mu$ M 농도)의 효과는, 현재 염증성 장질환 치료에 사용되고 있으며, 본 실험에서 대조 물질로 사용한 5-aminosalicylic acid(5-ASA)의 20 mM 농도에서의 효과와 유사하였다. 이러한 결과는 기존의 보고<sup>15)</sup>와 마찬가지로 berberine이 염증성 장질환의 치료제로서 가능성이 매우 큼을 의미한다.

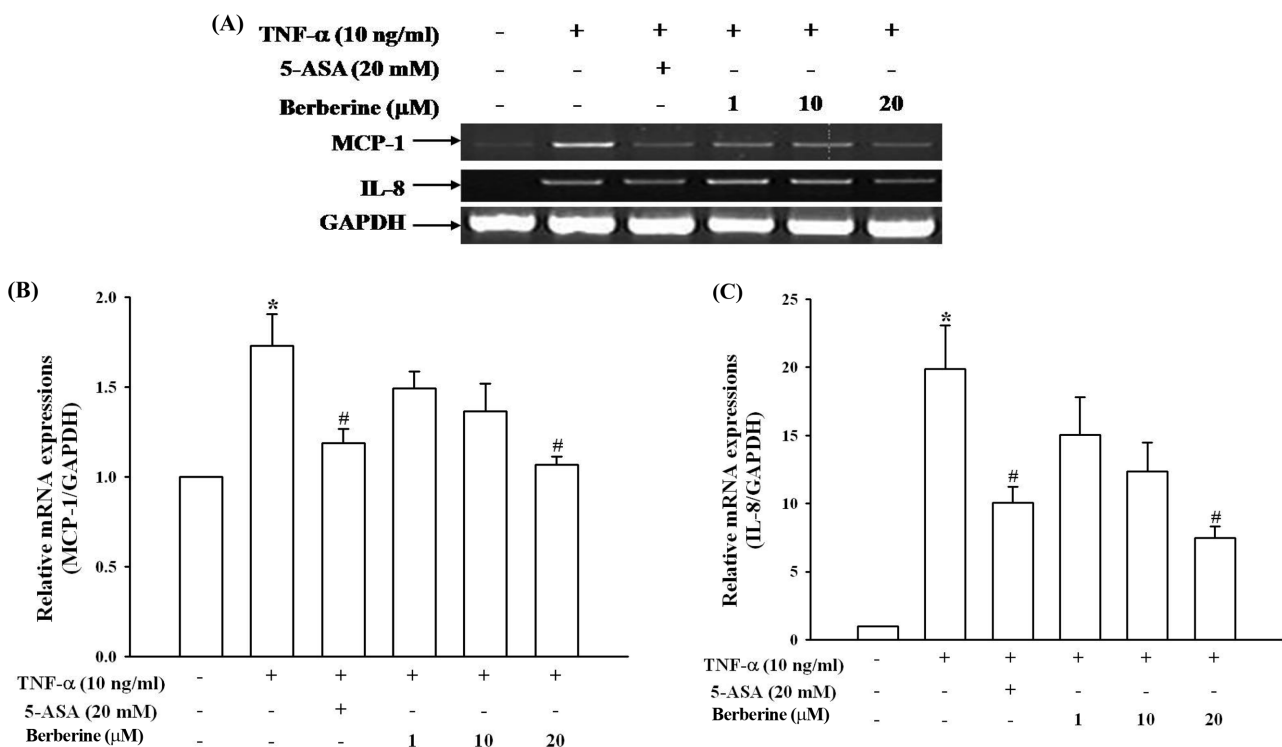
### TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 MCP-1과 IL-8의 발현에 미치는 berberine의 억제 효과

백혈구의 장 점막 부착 및 이주에 중요한 역할을 하는 주요 chemokine인 MCP-1과 IL-8은 TNF- $\alpha$ 에 의해 그 발현이 현저히 증가하였으며, 이러한 발현 증가는 berberine에 의해 유의적으로 억제됨을 확인 하였다(Fig. 3). 대장 상피세포와 단핵구의 부착능 시험 결과와 마찬가지로 chemokine의 발현에 미치는 berberine(20  $\mu$ M)의 영향은 5-ASA 20 mM 농도의 경우와 유사하였다.

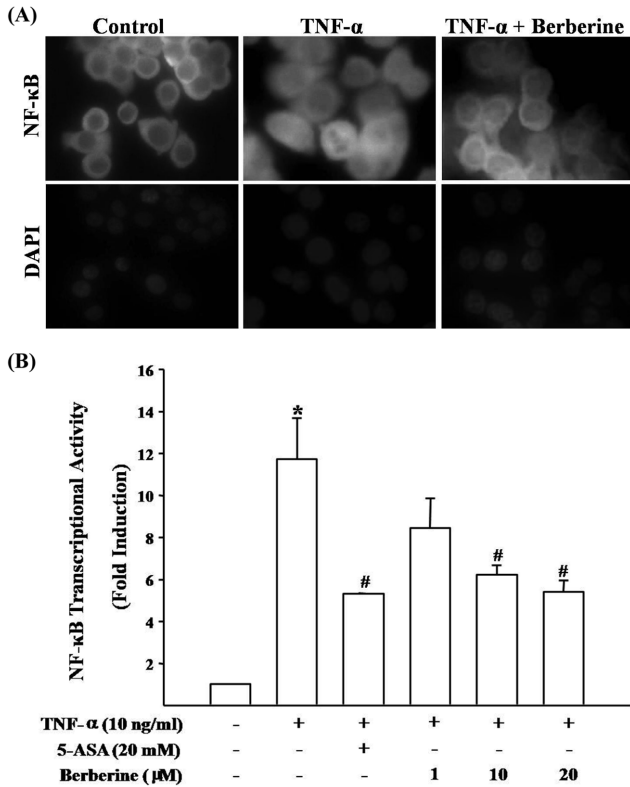
### TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 및 PPAR- $\gamma$ 활성에 미치는 berberine의 영향

MCP-1과 IL-8의 발현은 전사인자 NF- $\kappa$ B에 의해 조절됨은 잘 알려져 있어 berberine이 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동 및 전사활성에 미치는 영향을 조사하였다. NF- $\kappa$ B 항체를 이용한 세포면역염색 시험에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 이동은 현저히 증가하였으며, 이러한 핵내 이동이 berberine에 의해 현저히 감소함을 확인하였다(Fig. 4A). NF- $\kappa$ B 전사활성은 NF- $\kappa$ B luciferase reporter gene을 도입한 HT29 대장 상피세포를 이용하여 측정하였으며, 그 결과, TNF- $\alpha$ 에 의해 현저히 증가한 NF- $\kappa$ B 전사 활성은 berberine 처리에 의해 농도의존적으로 감소됨을 확인 하였다(Fig. 4B). 이러한 결과는 berberine이 사람 각질세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 NF- $\kappa$ B 활성 억제 효과<sup>18)</sup>와 일치되는 결과이다.

한편, berberine이 PPAR- $\gamma$ 를 통해 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등의 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다고도 알려져 있어, PCR을 통한 PPAR- $\gamma$  발현에 미치는 영향을 측정한 결과 대조군으로 사용한 5-ASA의 경우는 큰 영향을 나타내지 못하는 반면, berberine이 PPAR- $\gamma$  발현을 유의하게 증가시킴을 확인하였다(Fig. 5).



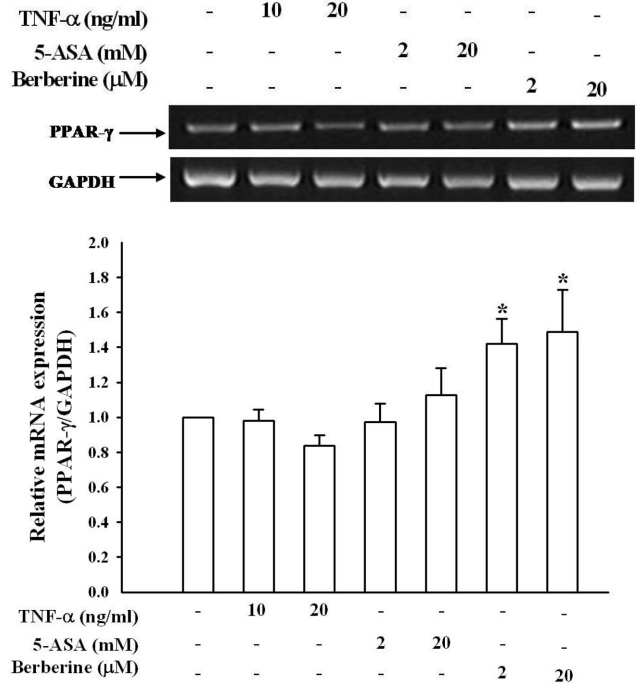
**Fig. 3** – Inhibitory effects of berberine on TNF- $\alpha$  induced MCP-1 and IL-8 mRNA levels in HT29 cells. Serum-starved HT29 cells were pretreated with berberine for 1 hr, and then, treated with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  for 3 hr. MCP-1 and IL-8 mRNA levels were measured by using RT-PCR. The PCR products of MCP-1, IL-8, and GAPDH were separated in 2% agarose gel (A). The relative mRNA expression of MCP-1 (B) and IL-8 (C) to GAPDH was quantitated by densitometry. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$ <0.05 compared to untreated control and # $P$ <0.05 compared to TNF- $\alpha$  treated group.



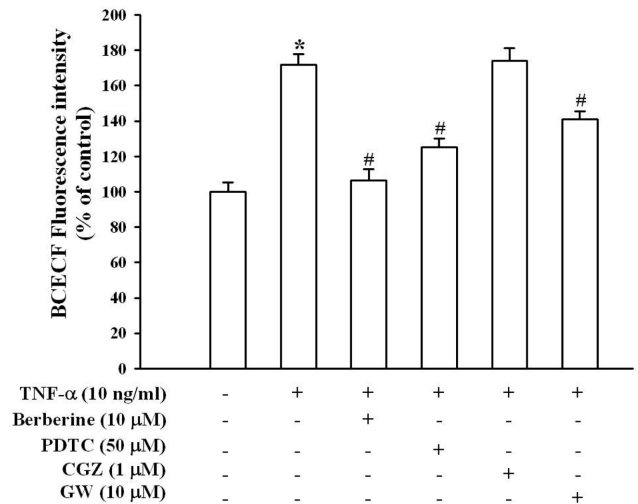
**Fig. 4** – Berberine suppresses the TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B nuclear translocation and transcriptional activity in HT29 cells. (A) Immunocytochemical analysis of NF- $\kappa$ B (p65) localization. HT29 cells were first treated with berberine (20  $\mu$ M) for 1 hr and then exposed to TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 20 min. After fixation with 3.7% paraformaldehyde/PBS, immunocytochemical analysis was performed as described in Materials and Methods. The results shown are representative of two independent experiments. (B) NF- $\kappa$ B luciferase activity. The NF- $\kappa$ B gene transcription activity was measured by luciferase assay using manufacturer's protocol. Data are means $\pm$ SEM from three independent experiments. \* $P$ <0.05 compared to untreated control and # $P$ <0.05 compared to TNF- $\alpha$  treated group.

**TNF- $\alpha$ 에 의한 백혈구와 대장 세포의 부착에 미치는 berberine의 PPAR- $\gamma$  보다는 NF- $\kappa$ B 경로를 통한 억제 효과**

Berberine에 의한 NF- $\kappa$ B 및 PPAR- $\gamma$  전사 활성이 TNF- $\alpha$ 에 의한 단핵구 세포와 대장 상피세포 사이의 부착을 매개하는지 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B 억제제인 PDTC 및 PPAR- $\gamma$ 에 대한 효능제 ciglitazone과 억제제 GW9662의 처리에 의한 단핵구 세포와 대장 상피세포 부착능을 조사하였다. 그 결과, TNF- $\alpha$ 에 의한 백혈구와 대장 상피세포의 부착은 PDTC에 의해 현저하게 억제되었으며, GW의 경우는 어느 정도 억제효과를 나타내었고, ciglitazone은 전혀 억제 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 TNF- $\alpha$ 에 의한 단핵구 세포와 대장 상피세포 사이의 부착을 매개하는 전사인자는 PPAR- $\gamma$  보다는 NF- $\kappa$ B임을 의미한다. 또한,



**Fig. 5** – Berberine alone increases the PPAR- $\gamma$  mRNA level in HT29 cells. Serum-starved HT29 cells were pretreated with berberine for 1 hr, and then, treated with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  for 3 hr. PPAR- $\gamma$  level was measured by using the RT-PCR. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. \* $P$ <0.05 compared to untreated control.



**Fig. 6** – Involvement of NF- $\kappa$ B but not PPAR- $\gamma$  on berberine-mediated adhesion of monocytes to HT29 cells. Experiments were performed as described previously in Fig. 2. HT29 cells were lysed and the fluorescence was quantitated using a fluorescence detecting microplate reader. Data are expressed as a percentage of control, and the bar graph represents the mean $\pm$ SEM from four independent experiments. \* $P$ <0.05 compared to untreated control and # $P$ <0.05 compared to TNF- $\alpha$  treated group.

berberine의 효과가 PDTC 처리의 경우와 유사한 점은 TNF- $\alpha$ 에 의한 단핵구 세포와 대장 상피세포 사이의 부착을 억제하는 berberine의 대장세포 염증 억제 작용이 NF- $\kappa$ B를 경유함을 암시한다.

## 결 론

Berberine은 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 MCP-1과 IL-8의 발현 및 NF- $\kappa$ B의 활성 억제하여 단핵구의 대장 상피세포에 부착을 억제하였으며, 특히, 대조 물질인 5-ASA와 비교해 볼 때, berberine은 훨씬 낮은 농도에서 우수한 억제효과를 나타냈다. 또한, berberine에 의해 증가된 PPAR- $\gamma$ 의 발현 증가는 단핵구의 대장 상피세포에 부착을 영향을 미치지 못하였다. 이상의 결과는 berberine의 대장세포 염증 억제 작용이 NF- $\kappa$ B를 경유함을 의미한다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-204-E00119).

## 참고문헌

- 1) Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P. and Sheron, N. : Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of Pathology* **199**, 28 (2003).
- 2) Groux, H. and Powrie, F. : Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* **20**, 442 (1999).
- 3) Rogler, G. and Andus, T. : Cytokine in inflammatory bowel disease. *Wprle J. Surg.* **22**, 382 (1998).
- 4) Porath, D., Riegger, C., Drewe, J. and Schwager, J. : Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 1172 (2005).
- 5) Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P. and Sheron, N. : Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pathol.* **199**, 28 (2003).
- 6) Richard, P. : Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Immunology* **19**, 5 (1999).
- 7) Izzo, R. S., Witkon, K., Chen, A. I., Hadjiyane, C., Weinstein, M. I. and Pellecchia, C. : Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1447 (1992).
- 8) Spoettl, T., Hausmann, M., Herlyn, M., Gunckel, M., Dirmeier, A., Falk, W., Herfarth, H., Schoelmerich, J. and Rogler, G. : Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clinical and Experimental Immunology* **145**, 190 (2006).
- 9) Tamaki, S., Yamauchi, M., Fukuoka, A., Makinodan, K., Koyama, N., Tomoda, K., Yoshikawa, M. and Kimura, H. : Production of inflammatory mediators by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern. Med.* **48**, 1255 (2009).
- 10) Babu, D., Thapa, D., Lee, J. S., Park, S. Y., Kim, A. R., Kim, Y. H., Yang, H. C. and Kim, J. A. : Inhibitory effects of an aqueous extract of *Cornus kousa* Burg. Leaves on TNF- $\alpha$ -induced chemokine expression and monocyte adhesion to human colonic epithelial cells. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 727 (2008).
- 11) Dijkstra, G., Moshage, H. and Jansen, P. L. : Blockade of NF- $\kappa$ B activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease?. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **236**, 37 (2002).
- 12) Iizuka, N., Miyamoto, K., Okita, K., Tangoku, A., Hayashi, H., Yosino, S., Abe, T., Takayuki, M., Hazama, S. and Oka, M. : Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Letters.* **148**, 19 (2000).
- 13) Fukuda, K., Hibiya, Y., Mutoh, M., Koshiji, M., Akao, S. and Fujiwara, H. : Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* **66**, 227 (1999).
- 14) Cui, H. S., Hayasaka, S., Zhang, X. Y., Hayasaka, Y., Chi, Z. L. and Zheng, L. S. : Effect of berberrubine on interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line. *Life Sci.* **79**, 949 (2006).
- 15) Zhou, H. and Mineshita, S. : The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats *in vivo* and *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 822 (2000).
- 16) Chen, F. L., Yang, Z. H., Liu, Y., Li, L. X., Liang, W. C., Wang, X. C., Zhou, W. B., Yang, Y. H. and Hu, R. M. : Berberine inhibits the expression of TNF $\alpha$ , MCP-1, and IL-6 in AcLDL-stimulated macrophages through PPAR $\gamma$  pathway. *Endocrine.* **33**, 331 (2008).
- 17) Thapa, D., Lee, J. S., Park, M. A., Cho, M. Y., Park, Y. J., Choi, H. G., Jeong, T. C. and Kim, J. A. : Inhibitory effects of clotrimazole on TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression and angiogenesis. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 593 (2009).
- 18) Enk, R., Ehehalt, R., Graham, J. E., Bierhaus, A., Remppis, A. and Greten, H. J. : Differential effect of *Rhizoma coptidis* and its main alkaloid compound berberine on TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B translocation in human keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.* **109**, 170 (2007).