

# LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 신이 추출물의 염증성 사이토카인 및 NO 억제 효과

김도윤 · 정원석 · 문형철<sup>1</sup> · 박성주\*

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 원광대학교 부속 광주한방병원 침구학교실

## Water Extract of Flowers of Magnolia Denudata Inhibits LPS-induced Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines Production in Murine Peritoneal Macrophage by Inhibiting NF-κB Activation

Do Yun Kim, Seok Won Jeong, Hyoung Chul Moon<sup>1</sup>, Sung Joo Park\*

*Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.*

*1: Department of Clinical laboratory, Wonkwang University Gwangju Medical Center*

Flowers of *Magnolia denudata* has been reported to possess a variety of pharmacological activities. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects and mechanism of the water extract of Flowers of *Magnolia denudata*(MD) in lipopolysaccharide (LPS)-mediated inflammatory mediators in murine peritoneal macrophages. MD itself does not have any toxic effects in murine peritoneal macrophages. MD inhibits LPS-induced nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-6 and IL-12 production in murine peritoneal macrophages. Furthermore, we have found that MD inhibited LPS-induced NF-κB but not c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. These results suggested that MD inhibit LPS-induced production of TNF-α, IL-6 and IL-12 via suppression of the NF-κB activation.

Key words : *Magnolia denudata*, Nitric oxide(NO), TNF-α, IL-12, IL-6 NF-κB

### 서 론

신이는 목련과(Magnoliaceae)의 백목련(*Magnolia denudata*) 및 그 밖의 동속 근연 식물의 꽃봉오리를 말린 것으로, 맛은 맵고 약성은 따뜻하며, 한방에서는 두통, 비염(축농증), 치통 등에 사용한다. 성분으로는 cineol, a-pinene, methylchavicol, citral, engenol, capric acid등이 알려져 있다<sup>1)</sup>.

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 박테리아의 외부 세포막을 구성하는 성분으로 이전부터 대식세포의 활성화 인자이며, endotoxic shock의 원인물질로 알려져 있다. 대부분의 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 염증에 대항하기도 하지만 과도한 면역인자 생성은 오히려 조직을 상해 시키고 때로는 그로 인해 죽음까지 이르게 한다.

대식세포에서 생성되는 nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine로부터 생성된다<sup>2)</sup>. 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<sup>3,7)</sup>. 이런 기전에 의해 생성된 NO는 과도하게 생성된 경우엔 혈관을 이완시켜 저혈압 shock을 유발시키는 역할을 하게 된다. 또한 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor(TNF-α), interleukin-1 beta (IL-1β), IL-6, IL-12와 같은 pro-inflammatory cytokine과 prostaglandin E2 (PEG2) 등을 생산하게 된다<sup>8,9)</sup>. 염증 매개 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE2, TNF-α, IL-1β 및 IL-6와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및

\* 교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : parksj0822@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6450

· 접수 : 2007/07/03 · 채택 : 2007/07/23

인체질환의 치료에 도움이 될 것이다<sup>10,11)</sup>.

이에 신이의 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 NO, 전염증성 사이토카인(IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ )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- $\alpha$ 를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제

실험에 사용한 신이는 옴니허브에서 구입하여 물 1 L에 100 g을 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 dodesyl 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- $\alpha$ , anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-mouse IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 antibodies, 재조합 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다

#### 3) 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 제조

신이 물 추출물은 신이 100 g을 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 (thiogluconate 2~3 ml)을 i.p.로 투여하여 RPMI-1640+10%FBS medium을 6~7 ml를 복강에 투여하여 넣어 복강액을 뽑아내 원심분리 한 후 cell을 counting해서 Dish나 Plate에 깔고 5% CO<sub>2</sub> 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<sup>6</sup>/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1

mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,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-알라닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 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 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100  $\mu$ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100  $\mu$ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터(MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

#### 5) Cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) 측정

LPS (500 ng/ml)로 대식세포를 자극하기 전 신이 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<sup>6</sup> cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 신이(500 mg/ml)으로 전처리 하고 30분 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로(0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5000 RPM, 5 min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer(lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu$ l+protase inhibitor 10  $\mu$ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15000 RPM, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일한양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skin 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. 신이의 대식세포에 대한 독성

신이의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 대식세포에 신이

를 농도의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존률을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 신이는 대식세포에 독성을 나타내지 않았다.

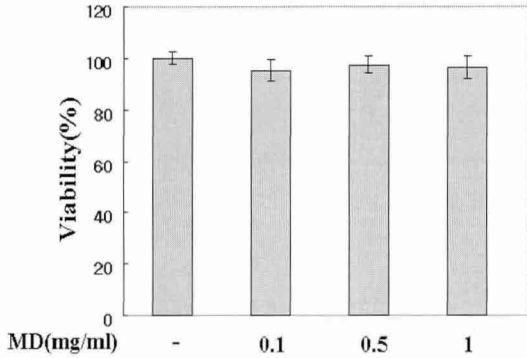


Fig. 1. The effect of MD on cytotoxicity in peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were incubated for 24 hrs in the presence or absence of MD at indicated dose. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment.

2. 신이 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

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

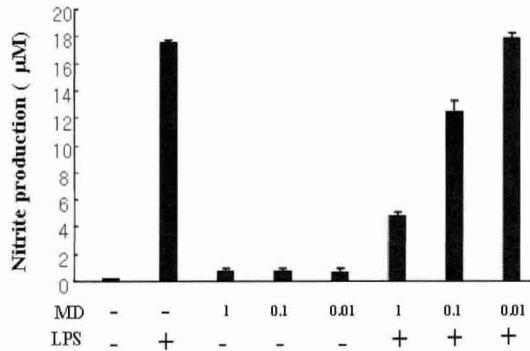
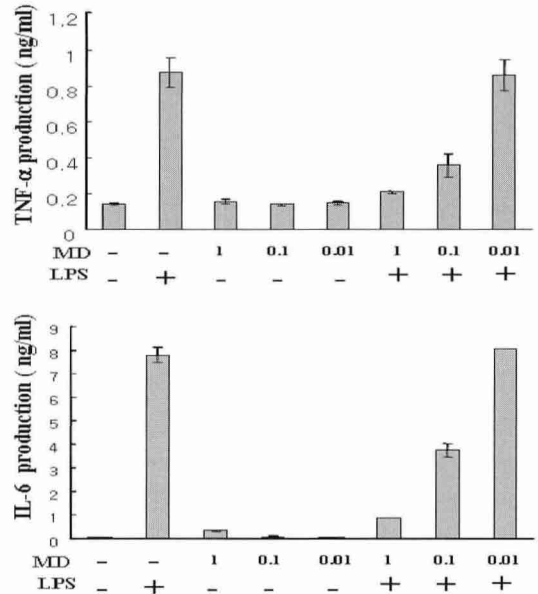


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by MD. Cell were pretreated with or without extract at indicated concentration for 20min, and then incubated with or without 500 nm/ml LPS for 24 hrs. NO released by cells was measured by the method of Griess.

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

신이가 대식세포에서 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 신이를 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 단백질 수준에서 실험(Fig. 3a)하였고 RT-PCR 방법으로 mRNA생성을 실험(Fig. 3b)하였다. 그 결과 TNF-α,IL-6,IL-12와 같은 염증성 세포활성물질들을 신이가 농도 의존적용 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

a)



b)

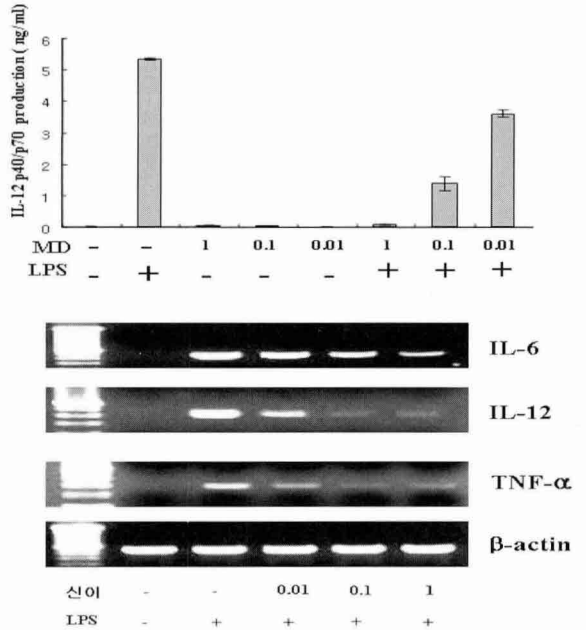


Fig. 3. Effect of MD on the productions of TNF-α, IL-6, IL-12 in peritoneal macrophages stimulated with LPS. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30min, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 hrs, at indicated described in materials and methods

4. 신이 추출물에 의한 LPS로 자극된 IκB-α의 분해억제 효과

LPS는 NF-KB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 신이가 NF-kB 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 신이를 전처리 하고 LPS로 자극한 대식세포에서 IκB-α의 분해정도를 조사하였다. NF-KB는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 IκB-α와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화시킬 수 있는 신호가 존재하면 먼저 IκB-α가 분해되고 NF-KB는 핵으로 이동하여 다양한 cytokine을 생산하게 된다. 따라서 NF-KB의 활성화는 IκB-α의 분해에 의존하게 된다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 신이가 LPS에 의한 IκB-α의 분해를 억제하고 있다. 즉 신이가 NF-KB의 활성을 억제하고

있다. 또한 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. 하지만 실험 결과 신이는 erk, p38, jnk의 활성화에는 관여하고 있지 않다(Fig. 4).

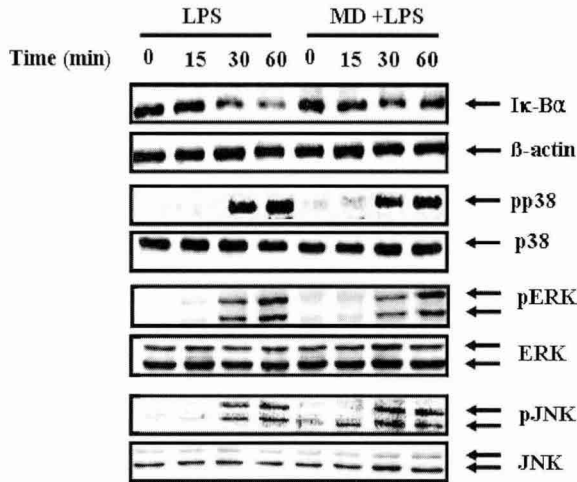


Fig. 4. Effects of MD on the expression of IκB-α degradation and MAP kinase activity in LPS-stimulated of peritoneal macrophage cells. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30min, and then incubated with 500 ng/ml LPS for indicated time. Detail methods were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

## 고찰

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<sup>12,13</sup>. 그러나 LPS의 자극을 받은 대식세포에서 방출하는 대량의 사이토카인, TNF-α, superoxide 혹은 NO와 같은 전염증성 분자들은 정상적인 세포의 기능을 파괴 하고, 또한 이러한 기능 파괴는 multiple-organ dysfunction syndromes 이나 혹은 lethal septic shock을 유발할 수 있으므로<sup>14-17</sup> LPS로 자극된 대식세포의 면역작용을 억제할 수 있는 약물의 발견은 치료에 매우 중요한 일이다.

LPS 자극에 의하여 현저하게 영향을 받는 대식세포의 신호 전달 분자로는 serine/threonine kinase로써 세포 밖 신호를 핵내로 전달하게 하는 mitogen-activated protein(MAP) kinase가 있다. LPS에 의하여 활성화되는 MAP kinase로는 extracellular signal-reguated kinase 1/2(ERK 1/2), p38, JNK등이 있고 LPS에 의해 분비된 TNF-α에 의해서 NFκB 유전자가 전사를 위한 활성화가 되어서 nitric oxide 및 superoxide anion 등의 free radicals 이 생성된다<sup>18-21</sup>.

신이는 한의학에서 풍한표증에 거풍산한한 작용으로 사용되고 있고 이에 신이가 항염증작용을 가지고 있다고 생각되어 본 저자는 신이의 물 추출물로 대식세포에 신이가 미치는 영향을

검증하고자 대식세포에 신이가 미치는 영향을 조사하였다.

본 연구에서 우선 신이가 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 신이를 농도별로 전처리 하고 LPS로 NO생성을 유도 했을때 NO의 생성이 신이추출물의 농도에 따라 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다.

대식세포가 일단 활성화되면 그 결과로 TNF-α, IL-6, IL-12 등의 cytokine이 생산되기 시작한다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 이러한 염증 매개물질을 유도하는데 신이으로 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-κB의 활성을 조사하기위해 IκB-α를 Western blot 으로 MAPK 구성요소들의 인산화와 IκB-α를 조사해 본 결과 신이가 IκB-α의 분해를 억제했지만, MAPK 구성요소들이 인산화 되는 것을 억제 하지 못하였다.

이러한 실험 결과들로 보아 신이가 대식세포에서 IκB-α의 분해를 억제하여 전염증성 cytokine 들의 발현과 NO의 생산을 줄였다고 사료되어진다. 신이의 이와 같은 작용은 LPS로 유발되어지는 염증에 효과적일 것이라고 생각되고 앞으로 신이의 항염증 작용에 대한 in vivo 실험들과 실제로 어떤 성분이 이러한 치료효과를 내는지에 관한 연구가 계속되어야 할 것이라고 사료되어진다.

## 결론

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

신이의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 신이농도별로 처리했을때 세포독성이 거의 나타나지 않음을 확인 할 수 있었고 현미경 관찰을 통해서도 이와 같은 결과를 얻었다. 대식세포에서 LPS로 자극하였을 때 나타나는 NO 생산을 신이 추출물이 얼마나 억제할 수 있는지 알아보았다. 그 결과 신이의 농도 의존적으로 NO 생산이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 신이를 전처리 한 대식세포에서 TNF-α, IL-6, IL-12 항염증성 cytokine의 분비를 조사하였을 때 신이의 농도 의존적으로 cytokine 생산이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 신이 처리시 MAP kinase 활성화와 IκB-α의 분해를 억제하여 NFκB의 활성을 저해하는지 알아보기 위하여 western blot를 수행한 결과 IκB-α의 분해를 방지하였고, ERK 1/2, JNK, p38의 인산화가 억제되었다

이와 같은 결과로 보아 신이 추출물은 대식세포에 작용하여 IκB-α의 분해를 억제함으로써 NF-κB에 의한 신호전달을 억제하여 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제하여서 LPS로 유발되는 대식세포의 염증성 작용들을 차단함으로써 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비 지원(2006)에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

1. Pharmacognosy Research Group. Modern Pharmacognosy. (Edited in 1992).
2. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994
3. 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.* 28: 217-226, 2000.
4. Lee, B.G., Kim, S.H. Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406: 301-309, 2000.
5. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun YG, Kwon T.O., Chung, H.T. 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-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 35: 21-28, 2000.
6. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 69: 625-635, 2001.
7. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 76: 119-123, 2001.
8. Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 176(6):3635-3641, 2006.
9. Hirohashi, N., Morrison, D.C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun* 64(3):1011, 1996.
10. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* 11: 1995-2000, 2003.
11. Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2):93-103, 2004.
12. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J.* 366: 376-382, 2002.
13. Binetruy, B., Smeal, T., Kariu, M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351: 122-127, 1991.
14. Su, G.L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *American journal of physiology.* 283: G256-G265, 2002.
15. Dos Santos, C.C., Slutsky, A.S. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *Journal of applied physiology.* 89: 1645-1655, 1985.
16. Marshall, J.C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Critical care medicine.* 29: S99-S106, 2001.
17. Shen, F.M., Guan, Y.F., Xie, H.H., Su, D.F. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Shock.* 21: 556-560, 2004.
18. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-218, 1999.
19. Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H., Kim, K.H. *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* 84: 49-62, 2004.
20. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase. TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by suchinone effects on I- $\kappa$ B phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J. Pharmacol.* 139: 11-20, 2003.
21. Meng, F., Lowell, C.A. 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.