

## Ascofuranone에 의한 plasminogen activator inhibitor-1 발현저해 효과

### 장 영 채\*

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

Received July 26, 2009 / Accepted August 18, 2009

**Inhibitory Effect of LPS-Induced Plasminogen Activator Inhibitor-1 by Ascofuranone in Rat Kidney Fibroblast Cells.** Young-Chae Chang\*. *Department of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, 705-034, Korea* - Renal fibrosis is a final common manifestation of every type of chronic kidney disease. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 is induced by lipopolysaccharide (LPS) and is known to play an essential role in the progress of renal fibrosis. In this paper, we found that an isoprenoid antibiotic, ascofuranone (AF), suppresses expression of profibrotic factors, PAI-1 and promoter activity of PAI-1 induced by LPS in rat kidney fibroblast cells. We therefore investigated signaling pathway mediated inhibitory effects of LPS-induced PAI-1 by AF in rNRK-49F cells. PAI-1 expression is suppressed by treatment with kinase inhibitors for MEK-1/2, as it is inhibition of PAI-1 expression by AF, and AF inhibits phosphorylation of ERK-1/2. This study suggest that AF suppresses expression of PAI-1 through the inhibition of an ERK-1/2-dependent signal transduction pathway. The data indicates the possibility that AF can be used to prevent the development and progression of renal fibrosis.

**Key words :** Renal fibrosis, fibronectin, ascofuranone, plasminogen activator inhibitor-1, renal Fibroblast

### 서 론

신장섬유화는 급성 및 만성 신장질환의 대표적인 유발증상으로 그 진행에 따라 신장의 기능부전이 발생된다[28]. 신장섬유화의 특징으로는 혈관 기저막이 두꺼워지거나 세뇨관의 위축, 단핵세포의 침투와 세포외기질의 침착 등이 있다[13]. 신장섬유화를 유도하는 대표적인 인자들로는 Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\gamma$ , Lipopolysaccharide (LPS), Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) 등의 촉매제가 알려져 있다[21,22]. 신장섬유화 유도인자인 LPS는 그람음성 박테리아의 세포벽 구성 성분으로 인체 유해 내독소로 작용하며[5], 급성 및 만성 신장질환의 병인과 관련되어 있다[26]. 또한 LPS는 대식세포를 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1과 IL-6와 같은 사이토카인들의 활성화 및 발현을 조절하며[7], 발현된 사이토카인들 또한 신장섬유화를 유도하는 것으로 보고 되었다[22].

Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1은 serpin super-family의 하나로, LPS와 TGF- $\beta$ 1을 비롯한 다양한 인자에 의해 활성화 된다[25]. 활성화된 PAI-1은 단백질분해효소 의존적인 섬유소 용해 작용을 억제하며, 세포외기질의 축적을 증가시킨다[14]. 따라서 PAI-1 발현이 신장섬유화를 포함한 섬유화 진행에 따른 표지인자임으로 향후 신장섬유화를 비롯한 섬유화 치료를 위한 주요한 표적 유전자이다[8]. 또한 PAI-1 발현이 MEK/ERK 기전을 통해 발현이 조절됨이 확인되었으며[2], LPS도 CD14와 Toll-like receptor (TLR)-4에 결합하여 하위의

MEK/ERK 기전을 활성화 시킨다고 알려져 있어[11,18,27], LPS에 의한 PAI-1 발현이 MEK/ERK 기전을 통해 조절될 가능성이 있음을 예상할 수 있다.

이 연구에서 사용한 Ascofuranone (AF)은 불완전한 균류인 *Ascochyta visiae*에서 분리한 항진균성 플레닐페놀계 항생 물질로, 주로 항바이러스성 효과에 대한 연구와[19], 피하조직과 관련한 다양한 생리학적 효과에 대한 연구가 보고 되었다[10]. 또한, 고혈압 억제, 제1형 및 제2형 당뇨병 개선[10] 그리고 항암제로서의 활성[16,17]을 가지는 것으로 보고되었다. 최근에는 신장암세포(Caki-1)에서 AF가 암세포 전이 시 발현되는 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)의 발현을 억제하고 그 메커니즘을 조사한 결과 extracellular signal regulated kinase-1/2 (ERK-1/2)의 인산화 저해를 통한 activator protein (AP)-1 전사활성의 선택적인 조절로 MMP-9 발현을 억제한다는 연구결과가 발표 되었다[3,9]. 이 연구에서는 LPS에 의해 유도된 섬유화 표지인자인 PAI-1을 비롯한 섬유화 관련인자들의 발현제어에 대한 AF의 저해효과를 확인하고자 하며 동시에 PAI-1 발현 저해 기전을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양

신장섬유아(rNRK-49F) 세포는 American culture type collection (ATCC)으로부터 구입하였다. 신장섬유아 세포는 10% 혈청(Fetal bovine serum: FBS) (Gibco-BRL, Grand Island, NY)과 1% 항생제(Gibco)를 함유한 DMEM-Low glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium)(Gibco) 배지에서 배양하였으며, 37°C, 5% 이산화탄소 조건 하에 배양하였다. asco-

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4848, Fax : +82-53-650-4849

E-mail : ycchang@cu.ac.kr

furanone (AF)은 일본 중의 제약에서 합성된 물질을 제공받았다[23].

**WST-1에 의한 세포 증식억제 조사**

신장섬유아 세포를 96 wells 플레이트에서 1 일 동안 배양 후 12 시간 동안 AF를 농도 별로 처리하였다. AF 처리 후 WST-1 reagent를 4시간 동안 반응 시켜 ELISA 480 nm에서 측정하였다. Cell proliferation reagent WST-1 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 분석방법에 의해 신장섬유아 세포의 증식에 대해 AF가 미치는 영향을 평가하였다.

**SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 면역학적 검색법**

신장섬유아 세포를 80-90% 정도의 밀도가 되도록 배양하였다. 기존의 배양액을 제거하고 LPS와 AF를 농도 별로 처리하여 6 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배양액을 제거하고 세포를 스크레퍼로 모아 4°C, 12000 rpm으로 5 분간 원심분리를 하여 상등액을 제거하고 IPH lysis buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 100 mM PMSF, leupeptin 1 mg/ml, aprotinin 1 mg/ml and 1 M DTT]로 4°C, 30 분 동안 용해시킨 후 12,000 rpm에서 20 분 동안 원심분리를 하였다. 상등액으로부터 얻어진 단백질을 정량하여 2×SDS-loading buffer [Tris-Cl (pH 6.8) 100 mM, Glycerol 20%, Bromophenol blue 0.2%, SDS 4%, Dithiothreitol 200 mM]와 섞어 98°C에서 5 분간 가열 한 후 SDS-PAGE gel로 전기 영동하여 Immobilon-P-membrane (Millipore, Harrow, Middlesex, UK)에 이동 시켰다. Membrane은 5% 탈지분유로 blocking 하여 anti-PAI-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)과 anti-fibronectin (Santa Cruz), anti-β-actin (Santa Cruz)에 각각 반응시켰다. 반응 후 각각의 항체에 단일 혹은 복합 이차항체를 반응 시켰다. 항체들에 대한 발현분석은 Horseradish Peroxidase-Linked 이차항체에 의해 발현되는 enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blot Analysis (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, USA) 시스템을 이용하여 결과를 확인하였다.

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석**

RNA 추출은 TRIzol (Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 분리하였으며 1 ug의 RNA를 사용 Moloney murin leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Meadison, WI)로 역전사 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 PAI-1 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고, 생성된 결과물은 1% 아가로스 겔로 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV 하에서 결과를 확인 하였다. PCR에 사용한 PAI-1 primer sequence는 forward: 5'-tgtctctggtgctggctatgctg-3'; reverse: 5'-tcagactgtggaacagcgctg-3' 이

고, β-actin primer sequence는 forward: 5'-agggtgtgatggggatgagg-3'; reverse: 5'-caggatcttcatgagtagtc-3'이다.

**Plamid transfection과 luciferase Reporter gene 분석**

AF의 PAI-1 전사제어에 대한 영향을 분석하기 위해 p800neo-luc (PAI-1 luciferase promoter construct)[1]를 사용하였다. 신장섬유아 세포를 1×10<sup>4</sup> cells/ml로 60 mm 플레이트에 하루 동안 배양 후 plasmid constructs 2 ug과 pCMA-β-galactosidase plasmid 1 ug을 12 시간 동안 DNA transfection reagent (TransIT-LT1 Transfection reagent, Mirus, Madison, USA)로 co-transfection 시켰다. 12 시간 후 LPS와 AF를 6 시간 동안 처리하여 luciferase 및 β-galactosidase의 활성을 commercial kits (Promega Corp., Madison, WI)를 사용하여 확인하였다.

**통계처리**

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준 차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 다양성 분석은 Duncan's test에 의해 분석하였다. 통계처리 후 P값이 0.05 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

**결 과**

**신장섬유아 세포에서 세포증식에 대한 AF의 영향**

신장섬유아 세포를 1×10<sup>4</sup>/ml로 96 wells 플레이트에서 1 일 동안 배양 후, 혈청 유조건과 혈청 무조건에서 각각 AF를 1, 10, 30, 50 uM 농도로 12 시간 동안 처리하였다. 12 시간 처리 후 WST-1 reagent를 4 시간 동안 처리하여 AF의 신장섬유아 세포에 대한 세포증식 효과를 조사하였다. AF는 배지의 혈청 유무에 상관없이 세포증식억제 효과가 10% 미만으로 유의성이 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 1). 따라서 AF는 세포에 대한 독성 및 증식에는 큰 영향이 없음을 확인하였다.

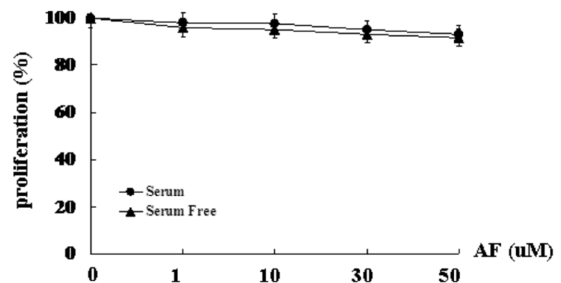


Fig. 1. Effect of AF on the proliferation of rat kidney fibroblasts. rNRK-49F cells (1×10<sup>4</sup> cells/ml) were treated with AF in the presence and absence of serum for 12 hr. Cell proliferation was determined by WST-1 assay. Results shown are means±SE of three separate experiments.

**LPS로 유도된 PAI-1 단백질의 발현에 대한 AF의 억제효과**

AF 처리에 의한 PAI-1의 발현 저해효과를 조사하기 위하여 신장섬유아 세포에 LPS 및 AF를 각각 처리하여 PAI-1 발현변화를 확인하였다. 우선 LPS를 처리한 후 PAI-1 발현의 증가현상을 시간 및 농도 의존적으로 확인하였다. 신장섬유아 세포에 LPS 2 ug/ml을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간 동안 처리한 경우 PAI-1 발현이 시간 의존적으로 유도되었으며(Fig. 2A), 6 시간 동안 LPS 0, 0.5, 1, 2 ug/ml의 농도로 처리한 경우에도 농도 의존적으로 PAI-1 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 2B). 신장섬유아 세포에서 LPS로 유도된 PAI-1 단백질 레벨이 AF를 농도 의존적으로 처리한 결과 효과적으로 감소되었다(Fig. 2C). 또한 PAI-1 mRNA 발현 레벨 역시 AF 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 2D). 따라서 신장섬유아 세포에서 LPS에 의해 증가된 PAI-1 전사 레벨이 AF 처리에 의해 효과적으로 억제되는 사실을 확인 하였다.

**AF에 의한 PAI-1 단백질의 발현조절 작용**

AF가 LPS로 유도된 PAI-1 발현을 프로모터 활성화 저해를 통한 발현조절을 확인 하기 위하여 reporter gene assay를 수행하였다. 신장섬유아 세포에 p800-PAI-1-luciferase reporter gene을 transfection 시킨 후 LPS 처리구와 무처리구, LPS+AF 처리구로 나누어 실험하였다. 약물 처리에 따라 LPS만 처리한 경우 luciferase 활성이 무처리구와 비교하여 3배 정도 증가하였으며, AF와 함께 처리한 경우에는 LPS 처리구와 비교하여 농도 의존적으로 luciferase 활성이 감소하였다(Fig. 3B). 또한 PAI-1과 더불어 신장섬유화 유도인자로 알려진 fibronectin 단백질 발현도 신장섬유아 세포에 AF 농도 의존적으로 처리한 결과, 효과적으로 저해되는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 따라

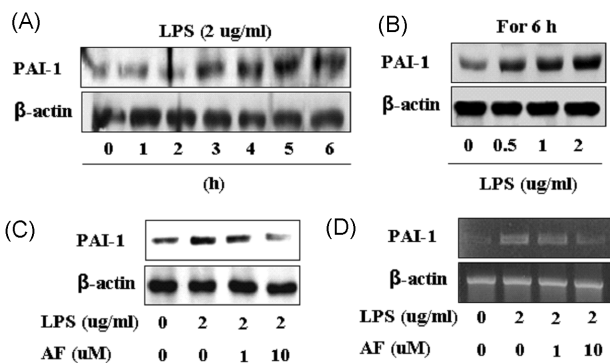


Fig. 2. Effect of AF on LPS-induced PAI-1 expression. rNRK-49F cells ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were treated with LPS (2 ug/ml) for the indicated time (A), or with the indicated concentration of LPS for 6 hr (B). rNRK-49F cells ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were incubated with 2 ug/ml LPS for 30 min, followed by treatment with AF for 6 hr. PAI-1 protein expression (C) and mRNA expression (D) were analyzed by western blot and RT-PCR. Results are means $\pm$ S.E. of three separate experiments, and representative.

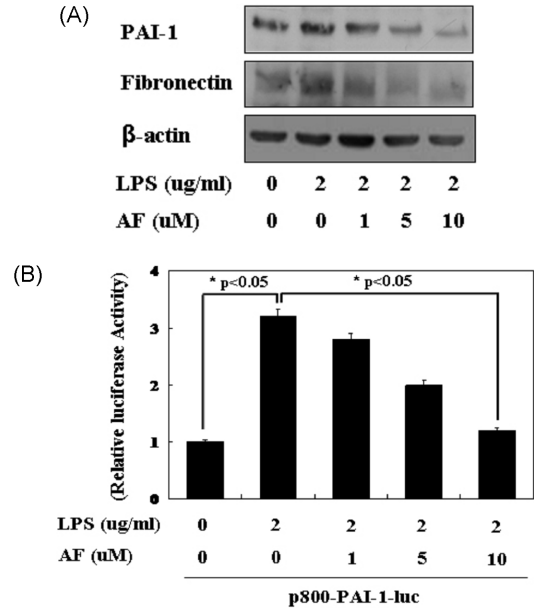


Fig. 3. Suppression of LPS-activated PAI-1-promoter by AF. rNRK-49F cells ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were incubated with 2 ug/ml LPS for 30 min, followed by treatment with AF for 6 hr. PAI-1 and fibronectin protein expression (A) were analyzed by western blot. rNRK-49F cells ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were transfected with PAI-1 promoter-containing reporter vector (p800-PAI-1-luc) and incubated with various concentrations of AF in the absence or presence LPS (2 ug/ml). Luciferase activity was measured 6 hr after LPS and/or AF treatment (B). Results shown are means $\pm$ SE of three separate experiments, \* $p < 0.05$ , compared between two groups as indicated.

서 AF는 신장섬유화 유도인자인 fibronectin과 PAI-1의 단백질 발현을 저해함과 동시에, PAI-1의 경우 프로모터 활성 저해를 통한 발현 조절 현상임을 확인하였다.

**AF의 ERK-1/2 인산화 조절을 통한 PAI-1 발현 저해효과**

최근 본 연구실에서 AF가 신장섬유아 세포에서 MEK/ERK 기전 조절을 통해 PAI-1의 발현을 억제한다는 연구결과를 발표하였으며[2], LPS 또한 ERK-1/2 신호전달 기전을 활성화시킨다고 보고되었다[18]. 따라서 본 연구에서는 LPS에 의해 유도된 PAI-1 발현 레벨이 AF에 의해 저해되는 PAI-1 발현 조절 기전을 해석하였다. 먼저 신장섬유아 세포에 ERK-1/2 상위에 존재하는 MEK inhibitor인 PD98059 및 AF를 각각 처리하여 PAI-1의 발현을 확인한 결과, MEK inhibitor 및 AF를 처리한 경우 각각 동일하게 PAI-1의 발현 레벨이 감소 하였다(Fig. 4A). 또한 AF에 대한 MEK/ERK 인산화 조절기전을 조사한 결과, 신장섬유아 세포에 처리한 LPS는 ERK-1/2의 인산화를 증가시켰으며, AF를 처리한 결과 농도 의존적으로 ERK-1/2의 인산화가 감소됨을 확인하였다(Fig. 4B). 따라서 LPS로 유도된 PAI-1 발현레벨이 AF에 의해 감소되는 현상은

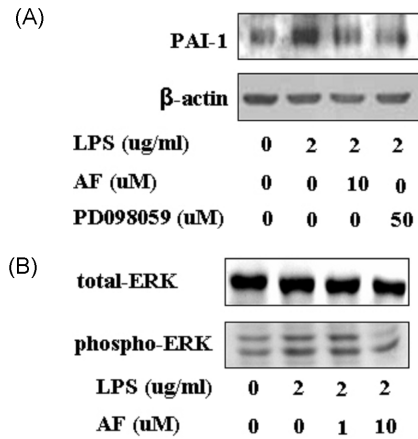


Fig. 4. Suppression of LPS-induced PAI-1 expression by MEK inhibitors of ERK-1/2 upstream. rNRK-49F ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were treated with inhibitors MEK (PD98059, 50  $\mu$ M) or with AF (10  $\mu$ M) for 6 h. PAI-1 protein expression was analyzed by western blot (A). rNRK-49F ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were incubated with 2 ug/ml LPS for 30 min, followed by the treatment with AF for 6 h. Phospho-ERK-1/2 was analyzed by Western blot (B).

MEK/ERK 기전 조절을 통하여 저해함을 예상 할 수 있다.

### 고 찰

PAI-1은 신장섬유화 및 신장암 발생 시 다른 정상조직과 세포에 비해 과발현되며[20], 섬유소분해를 억제할 뿐만 아니라 기질과의 긴밀한 상호작용으로 신장섬유화 진행에 있어 주요한 작용인자로 알려져 있다[6]. 이 연구에서 LPS가 PAI-1 발현을 농도 및 시간 의존적으로 증가시킨 연구결과(Fig. 2), LPS가 PAI-1 발현을 유도하는 매개인자임을 확인할 수 있었다[27]. 또한 LPS로 증가된 PAI-1 mRNA와 단백질 발현이 AF의 농도 의존적으로 저해되었고(Fig. 2), fibronectin 발현 레벨도 AF 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 신장섬유화를 유도하는 PAI-1 발현 조절이 AF에 의해 감소되는 이전의 연구결과와 동일함을 확인할 수 있었다[2]. 또한 AF가 PAI-1의 프로모터 활성을 현저하게 억제되는 사실은 AF가 PAI-1의 전사활성 조절을 통해 발현을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

PAI-1의 발현 조절은 다양한 신호전달 경로가 관여한다. 그 중 대표적인 신호전달 경로로 TGF- $\beta$ /Smad와 Receptor mediated-mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 있다[12,15,25]. TGF- $\beta$ /Smad 신호전달 경로는 TGF- $\beta$ 1이 TGF- $\beta$  receptor II와 결합하여 활성이 개시되면 TGF- $\beta$  receptor I과 결합하여 Smad 기전을 활성화시켜, 전사인자인 Smad가 핵 내로 이동하여 TGF- $\beta$ 1에 의한 하위 신호표적인자를 발현시킨다[4]. Receptor mediated-MAPK 신호전달 경로는 LPS에 민감한 염증반응 기전으로 LPS는 CD14와 Toll-like receptor

(TLR)-4에 결합하여 하위의 MEK/ERK 기전을 활성화 시킨다고 알려져 있다[18,27]. 이 연구에서도 LPS가 ERK-1/2의 인산화를 활성화시켰으며, AF에 의해 농도의존적으로 활성화된 ERK-1/2의 발현이 감소되었다(Fig. 4B). 또한, ERK-1/2 상위에 존재하는 MEK의 inhibitor인 PD98059 처리 시 AF 처리구와 동일하게 PAI-1 발현이 감소하여 PAI-1이 LPS/MAPK 신호전달 경로를 통해 조절됨을 확인 하였다(Fig. 4A)[24]. 이 결과는 최근 발표된 AF에 대한 연구결과와 같이 신장섬유아 세포에서 MEK/ERK-1/2 기전 조절을 통해 PAI-1 발현을 조절한다는 결과와 동일한 것으로 확인된다[2]. 또한 LPS에 의한 PAI-1 발현이 receptor-mediated MAPK 기전을 활성화 시켜 PAI-1 발현을 유도함을 알 수 있었다.

따라서 이 연구를 통해 LPS로 유도된 PAI-1 발현이 ERK-1/2 신호전달 경로를 통해 조절되는 것을 확인 하였으며, AF가 ERK-1/2의 활성화 저해를 통해 PAI-1의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 AF가 신장섬유화 치료를 위한 유력한 후보 물질임을 예상할 수 있었다.

### 요 약

이 연구는 신장섬유아 세포를 이용하여 LPS에 의해 유도된 신장섬유화 표적유전자인 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 발현과 Ascofuranone (AF)에 의한 신장섬유화 저해효과를 연구하였다. 이 연구를 통해 LPS가 PAI-1의 발현을 농도 및 시간 의존적으로 증가시켜 LPS가 신장섬유화 유도물질임을 확인할 수 있었다. 또한 LPS로 유도된 PAI-1 mRNA 및 단백질 발현 레벨이 AF에 의해 저해되었으며, 신장섬유화의 또 다른 대표유전자인 fibronectin의 단백질 발현도 AF에 의해 억제되어 AF가 신장섬유화를 저해하는 사실을 확인할 수 있었다. 그리고 AF에 대한 PAI-1 프로모터 활성을 조사하기 위하여 p800-PAI-1-luc을 신장섬유아 세포에 형질전환 시킨 결과, AF가 PAI-1의 전사 활성 조절을 통해 발현을 억제한다는 것을 확인하였다. ERK-1/2의 상위에 존재하는 MEK inhibitor를 처리하여 PAI-1의 발현을 확인한 결과에서도 AF를 처리한 경우와 동일하게 PAI-1 발현이 저해되어 LPS로 유도된 PAI-1의 발현이 ERK-1/2에 의해 조절됨을 알 수 있었다. 또한 LPS로 유도된 ERK-1/2의 인산화가 AF 농도의존적으로 저해된 결과는, AF가 ERK-1/2의 활성저해를 통하여 PAI-1 발현을 조절한다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 연구결과 AF가 신장섬유화를 저해하는 유력한 후보물질로서의 가능성을 제시하였다.

### References

- Ahn, J. D., R. Morishita, Y. Kaneda, H. J. Kim, Y. D. Kim, H. J. Lee, K. U. Lee, J. Y. Park, Y. H. Kim, K. K. Park, Y. C. Chang, K. H. Yoon, H. S. Kwon, K. G. Park, and I. K.

- Lee. 2004. Transcription factor decoy for AP-1 reduces mesangial cell proliferation and extracellular matrix production in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **11**, 916-923.
2. Cho, H. J., J. H. Kang, T. Kim, K. K. Park, C. H. Kim, I. S. Lee, K. S. Min, J. Magae, H. Nakajima, Y. S. Bae, and Y. C. Chang. 2009. Suppression of PAI-1 expression through inhibition of the EGFR-mediated signaling cascade in rat kidney fibroblast by ascofuranone. *J. Cell Biochem.* **107**, 335-344.
  3. Cho, H. J., J. H. Kang, J. Y. Kwak, T. S. Lee, I. S. Lee, N. G. Park, H. Nakajima, J. Magae, and Y. C. Chang. 2007. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* **28**, 1104-1110.
  4. Derynck, R. and Y. E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584.
  5. Fang, J., C. Xia, Z. Cao, J. Z. Zheng, E. Reed, and B. H. Jiang. 2005. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J.* **19**, 342-353.
  6. Fogo, A. B. 2003. Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky. *J. Clin. Invest.* **112**, 326-328.
  7. Garcia-Lazaro, J. F., F. Thieringer, S. Luth, P. Czochra, E. Meyer, I. B. Renteria, P. R. Galle, A. W. Lohse, J. Herkel, and S. Kanzler. 2005. Hepatic over-expression of TGF-beta1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock. *Immunol. Lett.* **101**, 217-222.
  8. Higuchi, C., Y. Tanihata, H. Nishimura, T. Naito, and T. Sanaka. 2005. Effects of glucose and plasminogen activator inhibitor-1 on collagen metabolism in the peritoneum. *Ther. Apher. Dial.* **9**, 173-181.
  9. Hong, S., K. K. Park, J. Magae, K. Ando, T. S. Lee, T. K. Kwon, J. Y. Kwak, C. H. Kim, and Y. C. Chang. 2005. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway: inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 25202-25209.
  10. Hosokawa, T., M. Sawada, K. Ando, and G. Tamura. 1981. Alteration of cholesterol metabolism by 4-O-methylascochlorin in rats. *Lipids* **16**, 433-438.
  11. Imai, K., A. Takeshita and S. Hanazawa. 2000. Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect. Immun.* **68**, 2418-2423.
  12. Kutz, S. M., C. E. Higgins, R. Samarakoon, S. P. Higgins, R. R. Allen, L. Qi, and P. J. Higgins. 2006. TGF-beta 1-induced PAI-1 expression is E box/USF-dependent and requires EGFR signaling. *Exp. Cell Res.* **312**, 1093-1105.
  13. Lam, S., R. N. van der Geest, N. A. Verhagen, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2004. Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. *Nephrol. Dial. Transplant* **19**, 1694-1701.
  14. Leyland, H., J. Gentry, M. J. Arthur, and R. C. Benyon. 1996. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* **24**, 1172-1178.
  15. Li, G., Q. Xie, Y. Shi, D. Li, M. Zhang, S. Jiang, H. Zhou, H. Lu, and Y. Jin. 2006. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J. Gene Med.* **8**, 889-900.
  16. Magae, J., J. Hayasaki, Y. Matsuda, M. Hotta, T. Hosokawa, S. Suzuki, K. Nagai, K. Ando, and G. Tamura. 1988. Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone, and activation of phagocytes. *J. Antibiot. (Tokyo)* **41**, 959-965.
  17. Magae, J., T. Hosokawa, K. Ando, K. Nagai, and G. Tamura. 1982. Antitumor protective property of an isoprenoid antibiotic, ascofuranone. *J. Antibiot. (Tokyo)* **35**, 1547-1552.
  18. Sung, M. J., M. Davaatseren, W. Kim, S. K. Park, S. H. Kim, H. J. Hur, M. S. Kim, Y. S. Kim, and D. Y. Kwon. 2009. Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 319-323.
  19. Nawata, Y., K. Ando, G. Tamura, K. Arima, and Y. Itaka. 1969. The molecular structure of ascochlorin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **22**, 511-512.
  20. Ohba, K., Y. Miyata, S. Kanda, S. Koga, T. Hayashi, and H. Kanetake. 2005. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitors in patients with renal cell carcinoma: correlation with tumor associated macrophage and prognosis. *J. Urol.* **174**, 461-465.
  21. Perrella, M. A., C. M. Hsieh, W. S. Lee, S. Shieh, J. C. Tsai, C. Patterson, C. J. Lowenstein, N. C. Long, E. Haber, S. Shore, and M. E. Lee. 1996. Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor beta1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2054-2059.
  22. Ricardo, S. D., H. van Goor, and A. A. Eddy. 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J. Clin. Invest.* **118**, 3522-3530.
  23. Sasaki, H., T. Hosokawa, M. Sawada, and K. Ando. 1973. Isolation and structure of ascofuranone and ascofranol, antibiotics with hypolipidemic activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* **26**, 676-680.
  24. Sawdey, M. S. and D. J. Loskutoff. 1991. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* **88**, 1346-1353.
  25. Wickert, L., N. Chatain, K. Kruschinsky, and A. M. Gressner. 2007. Glucocorticoids activate TGF-beta induced PAI-1 and CTGF expression in rat hepatocytes. *Comp. Hepatol.* **6**, 5.
  26. Yamaguchi, N., S. Jesmin, S. Zaedi, N. Shimojo, S. Maeda, S. Gando, A. Koyama, and T. Miyauchi. 2006. Time-dependent expression of renal vaso-regulatory molecules in LPS-induced endotoxemia in rat. *Peptides* **27**, 2258-2270.

27. Yamamoto, K., T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito. 2002. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis : increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide signaling with aging. *Am. J. Pathol.* **161**, 1805-1814.
28. Yang, Y. L., S. Y. Chang, H. C. Teng, Y. S. Liu, T. C. Lee, L. Y. Chuang, J. Y. Guh, F. R. Chang, T. N. Liao, J. S. Huang, J. H. Yeh, W. T. Chang, M. Y. Hung, C. J. Wang, T. A. Chiang, C. Y. Hung, and T. J. Hung. 2008. Safflower extract: a novel renal fibrosis antagonist that functions by suppressing autocrine TGF-beta. *J. Cell Biochem.* **104**, 908-919.