

오미자 활성성분 DDB의 NF- κ B 신호 전달 및 염증물질 발현 조절

¹중앙대학교 약학대학 면역학교실, ²상지대학교 한의과대학 병리학교실

주성수¹ · 유영민² · 원태준¹ · 김민정¹ · 이선구² · 황광우¹ · 이도익¹

Regulation of Inflammatory Repertoires and NF- κ B Signal Transduction by DDB, an Active Compound from *Schizandra Chinensis Baillon*

Seong Soo Joo¹, Yeong Min Yoo², Tae Joon Won¹, Min Jung Kim¹, Seon Goo Lee², Kwang Woo Hwang¹ and Do Ik Lee¹

¹Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University, ²Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Chronic inflammation in the brain has known to be associated with the development of a various neurological diseases including dementia. In general, the characteristic of neuro-inflammation is the activated microglia over the brain where the pathogenesis occurs. Pro-inflammatory repertoires, interleukin-1 β (IL-1 β) and nitric oxide (NO), are the main causes of neuro-degenerative disease, particularly in Alzheimer's disease (AD) which is caused by neuronal destruction. Those pro-inflammatory repertoires may lead the brain to chronic inflammatory status, and thus we hypothesized that chronic inflammation would be inhibited when pro-inflammatory repertoires are to be well controlled by inactivating the signal transduction associated with inflammation. **Methods:** In the present study, we examined whether biphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB), an active compound from *Schizandra chinensis Baillon*, inhibits the NO production by a direct method using Griess reagent and by RT-PCR in the gene expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and IL-1 β . Western blots were also used for the analysis of NF- κ B and I κ B. **Results:** In the study, we found that DDB effectively inhibited IL-1 β as well as NO production in BV-2 microglial cell, and the translocation of NF- κ B was comparably inhibited in the presence of DDB comparing those to the positive control, lipopolysaccharide. **Conclusion:** The data suggested that the DDB from *Schizandra chinensis Baillon* may play an effective role in inhibiting the pro-inflammatory repertoires which may cause neurodegeneration and the results imply that the compound suppresses a cue signal of the microglial activation which can induce the brain pathogenesis such as Alzheimer's disease. (*Immune Network* 2006;6(1):27-32)

Key Words: Nitric oxide, iNOS, NF- κ B, IL-1 β , biphenyl dimethyl dicarboxylate, alzheimer's disease

서 론

최근 들어 화학합성약제의 독성 및 부작용에 대해 천

연물에서 추출한 활성물질이 이들을 대체할 수 있는 신소재개발 및 활용연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 민간요법으로 흔히 사용하여 왔던 식물이나 물질들의 활성성분이 밝혀지면서 단지 전통적 사용법에 국한하지 않고 과학적인 접근에 의한 질병치료 및 조절에 사용하자는 실험실 및 임상적 연구가 아울러 연구의 대상이 되고 있다. 예로부터 다섯 가지의 맛이 난다고 하여 오미자

책임저자 : 이도익, 중앙대학교 약학대학 면역학교실
☎ 156-756, 서울시 동작구 흑석동 221
Tel: 02-820-5608, Fax: 02-820-5608
E-mail: leedi@cau.ac.kr

(五味子)라는 이름을 가지는 이 식물은 목련과의 낙엽 덩굴식물로서 *Schizandra chinensis* Baillon으로 불리며, 효능으로서 강장, 진정, 진해, 해열, 간 보호, 혈압조절, 알코올 해독작용 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1-3). 특히 한방의학적 측면에서 오미자는 간 보호 작용, 알코올 해독작용, 항산화 및 고지혈증 조절효과를 가지는 것으로 보고되어 있다(4-7). 약리학적 연구에서 오미자로부터 단리된 성분인 Schizandrin C의 유도체 DDB (biphenyl dimethyl dicarboxylate)는 간의 지질과산화물을 억제시키고 마이크로솜 효소계에 중요한 cytochrome p450계에 phenobarbital과 유사한 효소활성 유도 작용을 나타내 독성물질의 불활성화를 유도하며 NF- κ B의 활성억제를 통해 항염작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(8).

생체 내에서 혈관 평활근 확장, 병원균 제거, 신경전달 물질로서의 기능을 가지는 질소산화물, nitric oxide (NO)는(9) 이식 거부 반응에서도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(10). 이와 같은 NO는 병원균 제거 및 면역억제와 관련하여 macrophage가 염증활성 상태에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 다량 생산함으로써 arginine으로부터 NO를 생성, 염증 반응을 촉진하며, pro-inflammatory 인자로서 작용을 하게 된다(11). 특히 bacteria와 같은 세균감염 시 방출된 lipopolysaccharide (LPS)가 host receptor와 결합하여 세포 내 신호 전달이 일어나는데, 이때 I κ B kinase (IKK) complex가 활성화 되어 I κ B의 phosphorylation 및 degradation이 유발된다(12). 이때 I κ B에서 분리되어 자유로워진 NF- κ B dimer (p65/p50)는 세포질에서 핵으로 전위하여 면역 및 염증 관련 유전자들의 promoter 영역에 결합하여 전사를 증가시키므로 iNOS 발현 및 NO 생성을 포함하는 다양한 염증 반응이 일어나게 된다(13). 이러한 과정은 뇌에서도 일어날 수 있으며 이와 같은 과정에 중요하게 관여하는 세포로서 뇌소교세포, microglia가 알려져 있다. Microglia는 뇌에 존재하는 대식세포로서 monocyte에서 분화되어 중추신경계에 산재하는 비신경세포로(14) 뇌 손상이나 감염에 대해 초기 반응을 나타내어 염증성 cytokine, 단백질 분해 효소, 활성 산소 등을 방출하여 생체를 보호하는 면역세포이다(15). 그러나 microglia의 지나친 활성화는 만성 염증을 유발하여 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)과 같은 퇴행성 뇌질환의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다(16). 특히 최근 많은 연구가 진행 중인 AD의 경우, 뇌 내 amyloid β (A β) 펩타이드가 비정상적으로 다량 만들어져 뇌 조직에 노인반이라고 불리는 senile plaque가 형성되면 microglia가 이를 항원으로 인식하여 활성화되고 염증을 일으키는 proinflammatory cytokines 및 NO를 방출하여 염증 반응을 유발하는데, 이때 뇌 조직의 산화적 손상 및 세포사를 유발하여 신경

세포의 기능 손실이 발생한다고 알려져 있다(17). 특히, NO는 pro-inflammatory cytokines와 더불어 신경계 만성 염증 및 퇴행 과정의 주요 매개 인자로 양적인 증가는 주로 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 일어나며, 고농도의 NO가 존재할 때 만성염증 및 신경세포 파괴가 일어나게 된다. 따라서 노인성 치매(예, 알츠하이머)와 같은 질환에서 microglia에 의한 NO 억제가 요구된다. 따라서 microglia 활성화 억제는 AD를 비롯한 다수의 퇴행성 뇌질환의 경과를 경감시키는 효과적인 접근법이라 할 수 있다(18). 본 연구에서 사용된 오미자 Schizandrin C 유도체인 DDB가 항염증 효과를 가지는 선행연구로부터 microglia의 proinflammatory cytokine의 생성 억제 여부를 조사하고자 하였으며, 오미자 활성성분이 microglial cell에서 그와 같은 상위개념의 항염효과를 가진다면 점차 증가일로에 있는 노인성 치매 등에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 특히, DDB의 NF- κ B의 활성억제를 통해 항염작용이 보고되고 있어(19), 본 연구에서는 LPS로 활성화시켜 염증 반응을 유도한 BV-2 microglial cell line에 Schizandrin C 유도체 DDB를 농도 별로 처리하였을 때 발생하는 pro-inflammatory repertoire의 발현과 이러한 신호를 유도하는 NF- κ B signal transduction을 관찰하여 활성물질에 의한 NO 및 IL-1 β 억제작용을 확인하였다.

재료 및 방법

DDB (우리제약), LPS (Sigma, USA) 원액은 마이크로 필터 (0.2 μ m)를 통과한 배지에 녹여 준비했다. DDB는 5, 10, 20, 40 μ g/ml, LPS는 5 μ g/ml의 최종농도가 되도록 조절했다. 이 원액들은 이후의 사용을 위해 -20°C에서 보관하거나 세포 배양 실험을 위해 1~5% 우태아 혈청 (FBS)이 함유된 α MEM (Cellgro, USA) 배지에 직접 희석하였다. 본 실험에서 사용된 BV-2 cell line은 Northwestern University, USA에서 분양받아 사용하였으며, primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogen을 감염시켜 만들어진 세포주로서 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary microglial cell과 같다(20,21). 동결된 BV-2 세포는 즉시 해동하여 10% FBS α MEM 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS α MEM 배지로 교체 후 배양플라스크 바닥에 약 70%의 세포가 확인되었을 때 1% 이하의 FBS가 함유된 저농도 배지를 본 실험에 사용하였다. 이는 혈청에 의한 세포의 영향을 최소화하기 위한 것이며 최대 5% 미만의 FBS 배지에서 BV-2 세포의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS α MEM 배지에서 안정화시킨 BV-2 세포주를 *in vitro* 모델로 사용하였다. 본 실험에서 DDB를 안정화 상태의 BV-2 세포주에 30분간 전처리 후 각 실험군(5, 10, 20, 40 μ g/ml)에 따라 lipopolysaccharide (LPS) 5 μ g/ml를 처리하여 세포에서 나

타나는 생화학적 변화를 관찰하였다. 즉, LPS 투여 1시간 후 세포질과 핵에서 단백질을 각각 추출하여 NF- κ B와 I κ B α 의 상대적 관찰을 하였고 6시간 후 total RNA를 추출하여 NF- κ B에 의해 전사가 조절되는 IL-1 β 와 iNOS의 mRNA 발현을 관찰하였으며 9시간 후 세포질과 핵에서 단백질을 각각 추출하여 NF- κ B의 활성화와 I κ B α 의 degradation 및 iNOS 단백질의 발현을 관찰하였다. 또한 LPS 투여 12시간 및 24시간 후 배지를 취하여 NO의 생성을 확인하였다.

NO 측정. NO는 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다. 즉, NO 측정을 위해 각 군의 상청액 50 μ l를 취하여 96 well plate로 옮긴 후 sulfanilamide 용액 50 μ l를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 이어서 N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride (NED) 용액 50 μ l를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 30분 내에 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 표준검량곡선을 통해 계산하였다.

RT-PCR. 각 군의 1×10^7 /ml의 세포로부터 Trizol Reagent (Life Technologies, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 즉, Trizol reagent 1 ml를 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 5분 동안 방치 후 chloroform 200 μ l를 첨가하여 13,500 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 투명한 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 13,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 RNA를 침강시켰다. RNA pellet을 DEPC 처리한 증류수로 희석한 75% EtOH 1 ml로 세척한 후 공기 중에서 건조시켜 reverse transcription sample로 사용하였다. cDNA template를 대상으로 한 PCR 반응에 사용된 primer는 IL-1 β (sense: agc tgt ggc agc tac ctg tg, anti-sense: gct ctg ctt gtg agg tgc tg), iNOS (sense: ggc acc gag att gga gtt cg, antisense: gcc aga tgt ggg tct tcc ag), GAPDH (sense: tcc atg aca act ttg gca tcg tgg, antisense: gtt gct gtt gaa gtc aca gga gac)이며 522, 382 및 375 bp를 각각의 target size로 하였다. 반응 용량은 20 μ l가 되도록 하였고 ethidium bromide로 염색된 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 UVDoc (UVItec, UK)에서 관찰하였다.

Western Blot. 각 군 별로 세포질과 핵에서 각각 단백질 sample를 분리해낸 후 25 μ g을 SDS loading buffer와 함께 90°C에서 5분 동안 가열하고 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하였다. Gel에서 분리된 단백질을 PVDF membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk/TBS-T로 1시간 동안 blocking 한 후 TBS-T에 희석된 anti-NF- κ B p65 (Delta Biolabs, USA), anti-NF- κ B p50 (Delta Biolabs, USA), anti-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, USA) 또는 anti-GAPDH (Lab Frontier, Korea)를 1시간 동안 incubation 후 anti-rabbit Ig-horse radish peroxidase (Zymed,

USA) 2차 항체를 붙여 ECL (enhanced chemiluminescence luminogram) reagent (Amersham, USA)로 반응시킨 후 x-ray film에 exposure 하였다.

통계처리. 결과분석은 GraphPad Prizm4 software를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의성(t-test)이 있음을 인정하였고, PCR 및 western blot 결과의 분석은 gel/membrane band scanning 후 UVIDocMW program을 통해 band intensity의 상대비교 분석을 실시하였다.

결 과

DDB의 염증물질 발현 조절. Fig. 1A, 1B는 DDB 처리 후 1시간 내 나타나는 신호전달과정을 동일한 cell lysate에서 추출되는 세포질/핵 단백질로부터 관찰하였다. DNA-binding subunit인 p65는 cytosol과 nuclear간 상대적 농도차가 현격하여 positive control인 LPS 처리에 의한 NF- κ B의 translocation을 예측할 수 있었다. LPS의 경우 처리 후 1시간 이내에 신속한 반응이 일어나 세포질 내 농도대비 nuclear 내 p65의 농도가 높게 나타나는 것으로 생각되며, DDB 처리군에서는 세포질 내 농도가 상대적으로 높게 유지되고 있어 DDB에 의한 NF- κ B의 활성이 억제되는 것으로 생각된다(Fig. 1A, 1B). 반면, NF- κ B (p50)의 세포 내 농도가 DDB 40 μ g/ml군을 제외한 전체 농도에서 농도 의존적으로 증가하였으며 핵 내 농도변화의 LPS와 대조하여 감소한 결과가 유지되는 것으로 관찰되었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 결국 DDB에 의해 NF- κ B가 조절될 수 있음을 제시하는 것으로 생각된다. 또한 NF- κ B 활성화와 관계된 I κ B α 의 세포질 내 농도를 관찰한 결과 LPS 처리 1시간 후 I κ B가 degradation되어 상대적 농도가 낮게 관찰되었으며 DDB 처리 시에는 고농도(20, 40 μ g/ml)를 제외한 군에서 control과 유사한 패턴을 보였다. 이와 같은 결과는 LPS 및 DDB 처리 9시간 후 I κ B 증가가 관찰되어 basal 상태로 신속히 복구되는 것으로 사료되며 특히 고농도에서 I κ B의 상대적 증가가 관찰되었다(Fig. 1C). 이와 같은 결과로부터 DDB 처리 시 시간이 경과함에 따라 I κ B 증가에 의한 NF- κ B의 불활성화가 예측되며, 따라서 NF- κ B의 inactivation 조절자로서 DDB가 염증인자의 발현을 제어할 수 있음을 제시하고 있다(Fig. 1D). Fig. 1D는 NF- κ B 활성화의 결과로 생성되는 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 발현 여부를 RT-PCR을 통해 확인한 결과 DDB에 의한 염증유발 물질인 IL-1 β 가 농도 의존적으로 억제됨을 제시해주고 있다.

DDB의 NO 생성 및 iNOS 발현 억제 효과. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, DDB 처리군에서 NO의 억제가 용량 및 시간 의존적으로 나타났으며, 농도의 차이는 있었으나, 12 h 및 24 h에서 용량별 유사한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 유전자발현(RT-PCR) 및 단백질 분석(Western

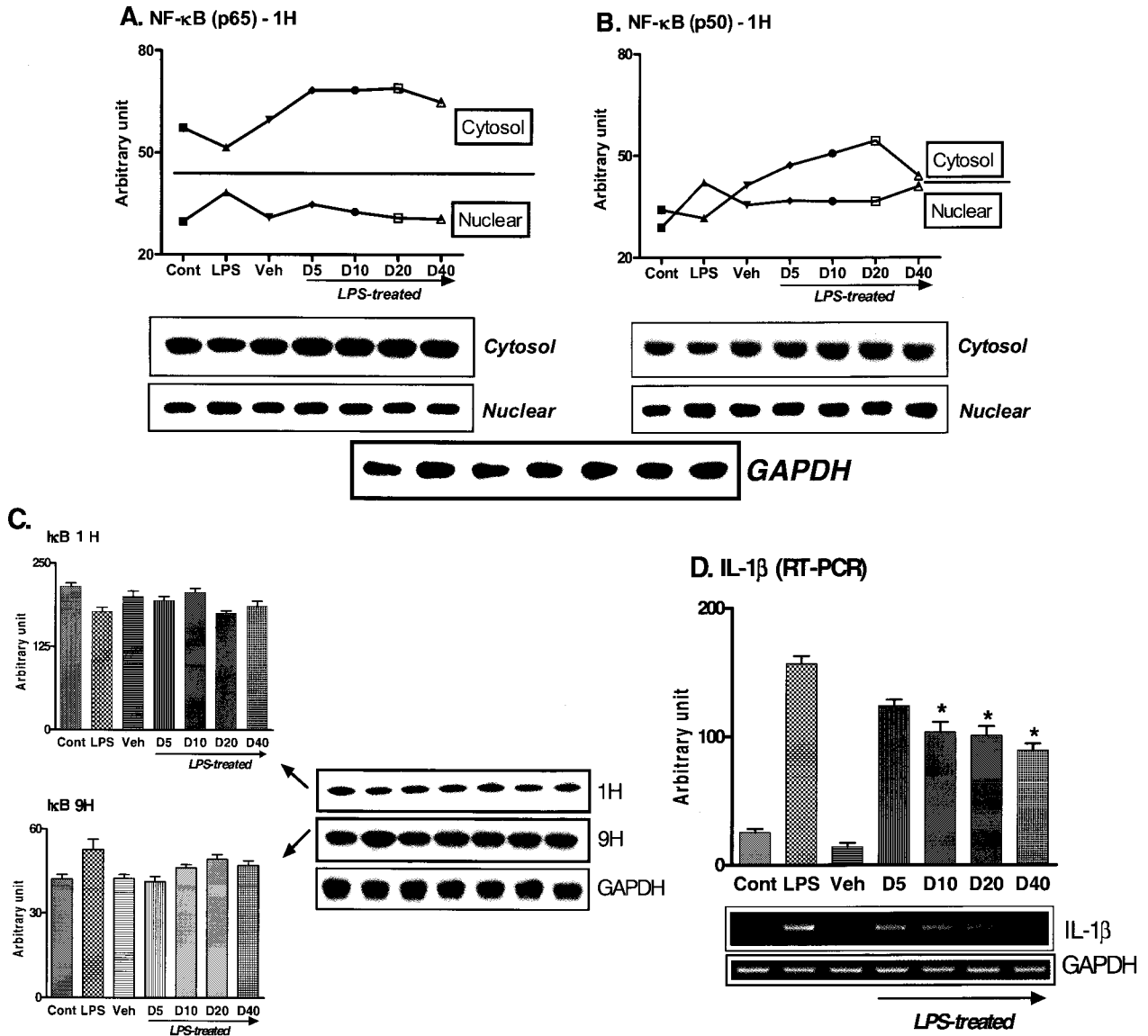


Figure 1. Regulation of NF-κB and IκB and inhibition of IL-1β expression by DDB. Equal amounts of lysate (25 μg) extracted from cytosol and nucleus was loaded for the detection of NF-κB p65 (A), NF-κB p50 (B) and IκB (C), and the blot intensity was compared between cytosol and nucleus. Gene expression of proinflammatory cytokine IL-1β was analyzed by RT-PCR method as described in the materials and methods (D). Cont: control (culture media), LPS: lipopoly-saccharide (5 μg/ml), Veh: vehicle (acetonitrille), D5: 5 μg/ml DDB, D10: 10 μg/ml DDB, D20: 20 μg/ml DDB, D40: 40 μg/ml DDB. GAPDH was measured as the internal control. Data are presented as mean ± SD values (n=3). *P < 0.05 vs LPS.

blot)에서 보다 구체적인 비교를 실시하였으며, 결과적으로 Fig. 2B, 2C에서와 같이 DDB에 의한 iNOS gene expression 억제효과로부터 iNOS protein이 조절되고 있음을 알 수 있었다. 특히 40 μg/ml에서 가장 효과적인 억제가 관찰되었다.

고찰

많은 연구로부터 알츠하이머형 치매는 전구단백질인 amyloid precursor protein (APP)으로부터 다량 생성된 Aβ가 뇌에 응집되어 plaque가 형성되고 결국 뇌신경계 파괴

의 결과로 나타나는 것으로 알려져 있으며, 이때 활성화되는 뇌 대식세포인 microglia에 의해 IL-1β, IL-6, NO와 같은 pro-inflammatory 매개 물질들이 방출되고 이는 ROS, pro-inflammatory cytokine, neurotoxic factor들의 점진적인 상승을 유도하는 과정을 거친다(22-24). 따라서 본 연구에서는 오미자의 단리 성분인 DDB가 염증과정에 조절자로 역할을 하는지에 대한 여부를 관찰하였으며, figures에서 나타난 바와 같이 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 실험에서 관찰된 NO는 host defense를 위해 생체 내 및 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 반면, NO의 지

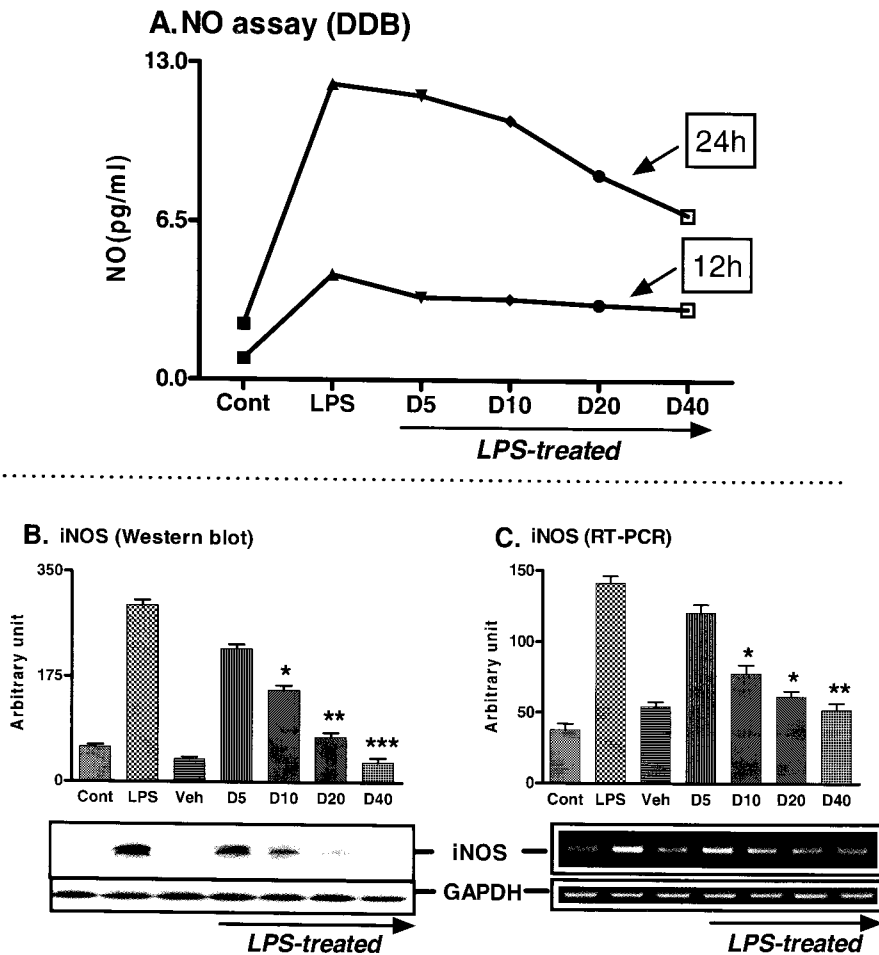


Figure 2. NO assay and comparison of iNOS expression in RT-PCR and Western blot. NO concentration was examined under Griess reagent system by taking culture media at 12 h and 24 h (A). iNOS was measured either by Western blot (B) or RT-PCR expression at 24 h (C) and the intensity of the bands was analyzed by UVIDoc. Cont: control (culture media), LPS: lipopolysaccharide (5 μ g/ml), Veh: vehicle (acetonitrille), D5: 5 μ g/ml DDB, D10: 10 μ g/ml DDB, D20: 20 μ g/ml DDB, D40: 40 μ g/ml DDB. Data are presented as mean \pm SD values (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs LPS.

나친 생성은 세포사를 유발하고 조직에 손상을 주는 퇴행성 기능을 동반하기도 하므로(25), 중추신경계에서 microglia의 만성 염증 반응에 의한 NO의 생성은 신경세포의 기능 손실 및 사멸을 유도하여 AD를 비롯한 신경퇴행성 질환을 유발시킬 수 있다(26). 따라서 microglia와 같은 대식세포의 활성화에 의한 NO의 증가는 퇴행성 뇌질환에서의 임상적 의미가 크므로, 본 연구에서는 LPS 처리로 microglia를 활성화시켜 그로부터 발현되는 iNOS를 측정하여 NO 농도 변화에 대한 관찰을 하였다. Fig. 1은 DDB가 이러한 iNOS의 발현을 촉진하는 신호전달과정인 NF- κ B, I κ B의 활성을 억제하여 최종적으로 NO 생성을 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있다. Fig. 2에서 NO의 농도와 iNOS의 발현은 상호 일치하는 결과가 인정되었고 특히 DDB 40 μ g/ml에서 의미 있는 결과가 관찰되었다. 이러한 결과는 NF- κ B 활성억제 실험에서 확인되었는데, NF- κ B의 upstream 과정인 I κ B degradation과 관련하여 DDB 처리 시 시간이 경과함에 따라 I κ B의 농도가 조절되었고 이 결과 NF- κ B의 활성화를 억제하여 DDB가 NF- κ B의 inactivation에 작용할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1A, B, C). 이와 같은 결과는 DDB

처리 시 염증유발물질의 발현을 억제하여 항염 효과를 예측할 수 있으며, 또한 NO에 의한 세포손상을 차단하여 세포보호 효과가 있음을 제시하고 있다. 따라서 이와 같은 결과가 뇌의 microglia로부터 얻어진 결과임을 고려할 때 만성염증에 의한 퇴행성 뇌질환 예방과 더불어 치매 치료요법제로 기대할 만한 물질로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Zhu M, Lin KF, Yeung RY, Li RC: Evaluation of the protective effects of Schizandra chinensis of phase I drug metabolism using a CCl₄ intoxication model. J Ethnopharmacol 67; 61-68, 1999
2. Molokovskii DS, Davydov VV, Tiulenev VV: The action of adaptogenic plant preparations in experimental alloxan diabetes. Probl Endokrinol 35;82-87, 1987
3. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS: The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of Schizandra chinensis RUPRECHT (Omija) seed. Korean J Food Sci Technol 32;928-935, 2000
4. Kim OC, Jang HJ: Volatile components of Schizandra chinensis Bullion. Agric Chem Biotechnol 37;30-36, 1994
5. Shoji K, Yasufumi O: Effect of gomicin A on liver generation. Planta Med 58;489-482, 1992
6. Shoc HJ, Lee MY, Hwang GS: The effect of Scizandra fructus extract on blood constituents of alloxan-induced diabetes

- rabbits. *J Korean Soc Food Nutr* 24;658-662, 1995
7. Jang EH, Pyo YH, Ahn MS: Antioxidant effect of Omija extracts. *Korean J Soc Food Sci* 12;372-376, 1996
 8. Kang KW, Kim YG, Kim CW, Kim SG: The anti-fibrogenic effect of a pharmaceutical composition of [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-bithiol-3-thione] (oltipraz) and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB). *Arch Pharm Res* 25;655-663, 2002
 9. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120;227-237, 1994
 10. Tsoulfas G, Geller DA: NF-kappaB in transplantation: friend or foe. *Transpl Infect Dis* 3;212-219, 2001
 11. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39;191-220, 1999
 12. Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR, Kim Y: Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett* 571;50-54, 2004
 13. Yamamoto Y, Gaynor RB: IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29;72-79, 2004
 14. Kreutzberg GW: Microglia a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19;312-318, 1996
 15. Kim HS, Whang SY, Woo MS, Park JS, Kim WK, Han IO: Sodium butyrate suppresses interferon-gamma, but not lipopolysaccharide-mediated induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in microglia. *J Neuroimmunol* 151;85-93, 2004
 16. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F: Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374;647-650, 1995
 17. Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81;741-766, 2001
 18. Kim WK, Jang PG, Woo MS, Han IO, Piao HZ, Lee K, Lee H, Joh TH, Kim HS: A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in activated microglia. *Neuropharmacology* 47;243-252, 2004
 19. Kang KW, Kim YG, Kim CW, Kim SG: The anti-fibrogenic effect of a pharmaceutical composition of [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] (oltipraz) and dimethyl-4,4'-demethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB). *Arch Pharm Res* 25;655-663, 2004
 20. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F: Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27;229-237, 1990
 21. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H: An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res* 31;616-621, 1992
 22. Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ: Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E (2). Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J Biol Chem* 274;28823-28827, 1999
 23. Kim WK, Jang PG, Woo MS, Han IO, Piao HZ, Lee K, Lee H, Joh TH, Kim HS: A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in activated microglia. *Neuropharmacology* 47;243-52, 2004
 24. Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH: Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 1548;197-206, 2004
 25. Furge LL, Fields PR, Goode WE, Konwinski RR, Tressler MC, Stevens-Truss R: Oltipraz inhibits inducible nitric oxide synthase in vitro and inhibits nitric oxide production in activated microglial cells. *Arch. Biochem Biophys* 424;163-170, 2004
 26. Joo SS, Won TJ, Lee DI: Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Arch Pharm Res* 27;954-960, 2004