

LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 백두옹 추출물의 항염증 효과

박성주^{#1}, 송호준^{*1}

1: 원광대학교 한의과대학 본초학 교실

Anti-inflammatory effect of extract of *Pulsatilla koreana* N_{AKAI} in LPS-stimulated Murine peritoneal macrophage

Sung-Joo Park^{#1}, Ho-Joon Song^{*1}

1: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from *Pulsatilla koreana* N_{AKAI} (PK) on the peritoneal macrophage.

Methods : To evaluate of anti-inflammatory of PK, we examined cytokines and NO production in lipopolysacchride (LPS)-induced macrophages. Furthermore, we examined molecular mechanism using western blot.

Results : 1.Extract from PK reduced LPS-induced NO, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-12 production in peritoneal macrophages.
2.Extract from PK itself does not have any cytotoxic effect. PK inhibited the activation of extracellular signal-regulated kinase(ERK 1/2) but not another mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38, c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and the degradation of inhibitory kappa B α (I κ B α) does not any effect in the LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Conclusion : PK down-regulated LPS-induced NO and cytokines production, which may be provide a clinical basis for anti-inflammatory properties of PK.

Key words : *Pulsatilla koreana* N_{AKAI} (PK), lipopolysaccharide (LPS), anti-inflammation, mitogen-activated protein kinases(MAPK).

#제1저자: 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 063-850-6844

*교신저자: 송호준, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel: 063-850-6844 · E-mail: songhj@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2007년 01월 26일 · 수정 : 2006년 02월 19일 · 채택 : 2006년 03월 20일

서 론

백두옹 (白頭翁, *Pulsatilla koreana* NAKAI)은 미나리아재비과 (Ranunculacwae)에 속하는 다년초본인 할미꽃의 근이다. 우리나라 야산에 자생하며 중국 동북에도 분포되어 있으며 전체에 긴 견모가 밀포됐으며 직립하였고 높이는 40cm 내외이다. 봄과 가을에 채취하고 냄새는 약간이고 맛은苦苦하다. 이 약의 주요성분은 anemonin 이다 이외에도 pulsatoside도 함유하고 있으며, 가수분해하여 sapogenin ST-1 및 포도당을 생성한다. 이것은 아메바 原蟲, 赤痢菌에 대하여 비교적 강력한 抑制작용을 나타내며, 녹농간菌, 黃色포도球菌에 대하여 더욱 강력하다. 또한 장점막을 수렴하는 작용도 있으므로 止瀉, 止血 작용도 있다. 이 약의 전초에서 뿌리 부분을 제거하면 digitadis와 유사한 強心作用을 나타낸다.^{1,2,3,4)}

이 생약은 전통적으로 痢疾 치료, 소염 및 수렴 목적으로 쓰여 왔으며⁵⁾ 止痛, 解熱, 水腫에 응용하였고⁶⁾ 항균 등에 사용하였다.⁷⁾ 약리작용에 대한 보고로는 백두옹 메탄올 추출물이 alloxan 투여에 의하여 현저하게 증가하는 혈당량과 혈청 total cholesterol 함량을 저하시켜 정상치로 회복시킨다고 보고하였다.⁸⁾ 또한 혈압을 강하시키고, 심박을 늦추며 심장수축을 강하게 하고 위장운동을 활발히 하며⁹⁾ 백두옹의 혈당강하 성분이 ecdysterone임이 확인된 바 있다¹⁰⁾.

이에 저자는 백두옹이 LPS로 유도한 염증반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 염증성 매개물질 즉 NO, 염증성 사이토카인의 생산을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 백두옹은 옴니허브 (경북, 영천)에서 구입하여 물 1L에 100g을 넣고 2시간 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다.

2)시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin등의 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-I κ -B-a, anti-phospho-JNK는 Cell signaling (MA, USA)사에서 구입하였다. anti-mouse IL-6, TNF- α , IL-12 antibodies, 재조합 IL-6, TNF- α ,IL-12는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

3)실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트바이오에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

백두옹 물 추출물은 백두옹 100 g을 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후 동결 건조 시켜서 용매를 제거하고 그 얻어진 분말을 농도별로 녹여서 실린지 필터 (0.2 μ m)로 여과해서 사용했다.

2) Peritoneal macrophage 세포의 배양

실험 3~4일 전에 실험 mouse에 염증 물질 (thioglucollate 2~3ml)을 i.p. 로 투여하여 RPMI-1640+10%FBS medium을 6~7ml를 복강에 투여하여 넣어 5분간 마우스 복강을 마사지 한 뒤 복강액을 뽑아내 원심분리 한 후 cell을 counting해서 1 \times 10⁶cells/ml로 60mm Dish나 12well 또는 24well Plate에 seeding하고 5% CO₂ 37 °C가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고, suspension 세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다.

3) *in vivo* 실험모델

백두옹 추출물을 마우스 한 그룹에 6마리씩으로 마리당 250mg/kg과 25mg/kg 두 가지 농도로 존대를 이용하여 일주일 동안 매일 경구투여 한뒤 일주일째 먹인 후에 치사량의 LPS (25 mg/kg)를 I.P. 하였다. 그 후 2시간 뒤에 마우스를 마취하여서 심장에서 마우스 혈액을 1ml 실린지로 뽑아낸 후 2000RPM으로 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액 serum만 분리하였다. 이 분리한 serum을 ELISA법으로 TNF- α ,

IL-6 와 IL-12를 정량하였다.

4) MTT 분석

대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 1×10^6 /ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1mg/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

5) 일산화질소 (Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 일산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess 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 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100 μ 씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터 (MD, U.S.A)로 540nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6) Cytokine(TNF- α ,IL-6,IL-12) 측정

LPS (500 ng/ml)로 대식세포를 자극하기 전 세신 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

7) Western blot analysis

복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60mm culture dish에 1×10^6 /ml로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)으로 12시간 starvation 시킨 후

백두옹 (500 mg/ml)으로 30분 전처리 한뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로 (0, 15, 30, 60min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리 (5000RPM, 5min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1ml + phosphatase inhibitor 10 μ l +protase inhibitor 10 μ l)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15000RPM, 20min)하여 찌꺼기를 가라 앉히고 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 I κ -Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

3.통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Student's *t*-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 백두옹의 대식세포에 대한 독성

백두옹의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 대식세포에 백두옹을 농도의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Figure 1에 나타난 바와 같이 백두옹은 0.5, 0.1, 0.05 mg/ml농도에서 대식세포에 독성을 나타내지 않았다.

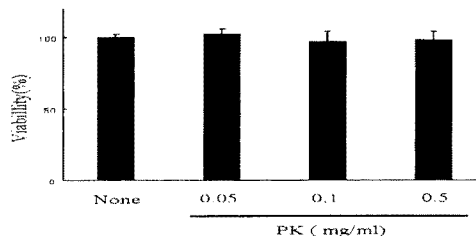


Figure 1. The effect of PK on cytotoxicity in peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were incubated for 24 hrs in the presence or absence of PK at indicated concentration. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.E.M of three separate experiments performed in duplicate.

2. 백두옹 추출물이 마우스 대식세포에서

NO 생성에 미치는 영향

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다¹¹⁾. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 LPS로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다^{12,13,14,15,16)}. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. 백두옹이 항염효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 백두옹을 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 NO의 생성을 측정된 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 백두옹추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다 (Figure 2).

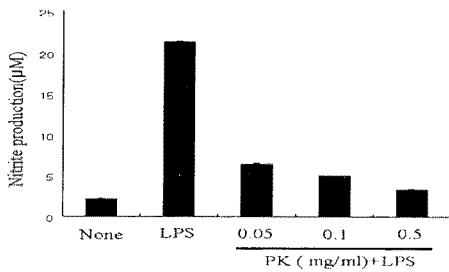


Figure 2. Inhibition of LPS-induced NO production by PK. Cell were pretreated with or without extract at indicated concentration for 20 min, and then incubated with 500 ng/ml LPS for 24 hrs. NO released by cells was measured by the method of Griess.

3. 백두옹 추출물이 마우스 대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-12 발현에 대한 영향

전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여 백두옹을 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 TNF- α , IL-6, IL-12를 측정하였다. 백두옹 추출물이 염증성 세포활성물질들 (TNF- α , IL-12, IL-6)을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다 (Figure 3).

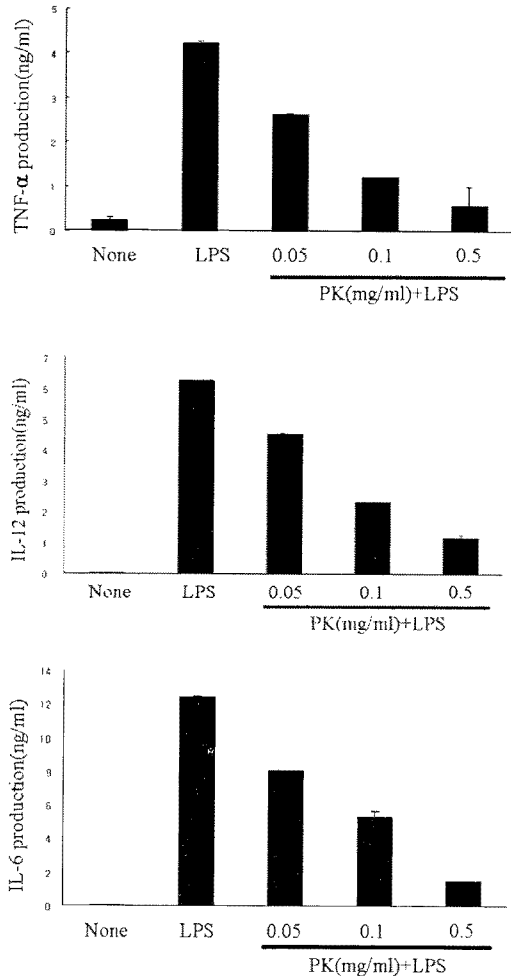


Figure 3. Effect of PK on the productions of TNF- α , IL-6, IL-12. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30 min, and then incubated with 500 ng/ml LPS for 24 hrs. Cytokine production was measured by an ELISA described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.E.M of three separate experiments performed in duplicate.

4. 백두옹 추출물에 의한 LPS로 자극된 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 발현억제 효과

Mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. LPS로 자극된 대식세포에서는 MAPK의 활성이 증가한다. 하지만 백두옹을 전처리했을 경우에 ERK1/2의 활성만이 억제되었고 나머지 p38 이나

JNK는 억제하지 못하였다 (Figure 4). LPS는 NF- κ B를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 백두옹이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 백두옹을 전처리 하고 LPS로 자극한 대식세포에서 I κ B- α 의 분해정도를 조사하였다. NF- κ B는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 I κ B- α 와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화되면 I κ B- α 가 분해되고 NF- κ B는 핵으로 이동하여 다양한 cytokine을 생산하게 된다. 따라서 NF- κ B의 활성화는 I κ B- α 의 분해에 의존하게 되므로 I κ B- α 를 조사하였다. Figure 4에서 나타난 바와 같이 백두옹이 LPS에 의한 I κ B- α 분해를 저해하지 못하였다.

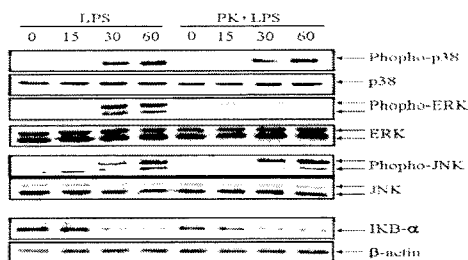


Figure 4. Effects of PK on the activation of MAPK and the degradation of I κ B- α in LPS-stimulated of peritoneal macrophage cells. Cell were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30 min, and then incubated with 500 ng/ml LPS for indicated time. One out of three independent experiments with identical results is shown. Detail methods were described Materials and Methods.

5. 백두옹 추출물을 경구투여 시 혈청 내 TNF- α , IL-6, IL-12 발현에 대한 영향.

백두옹을 두가지 농도 (25 mg/ml, 250 mg/ml)로 일주일 간 경구투여한 후에, LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성을 혈청에서 조사하였다. 백두옹을 일주일동안 경구투여 한 그룹 모두 LPS만 복강주사한 그룹에 비해 TNF- α , IL-6, IL-12의 생산이 현저히 줄어들었다는 것을 보여주었다 (Figure 5).

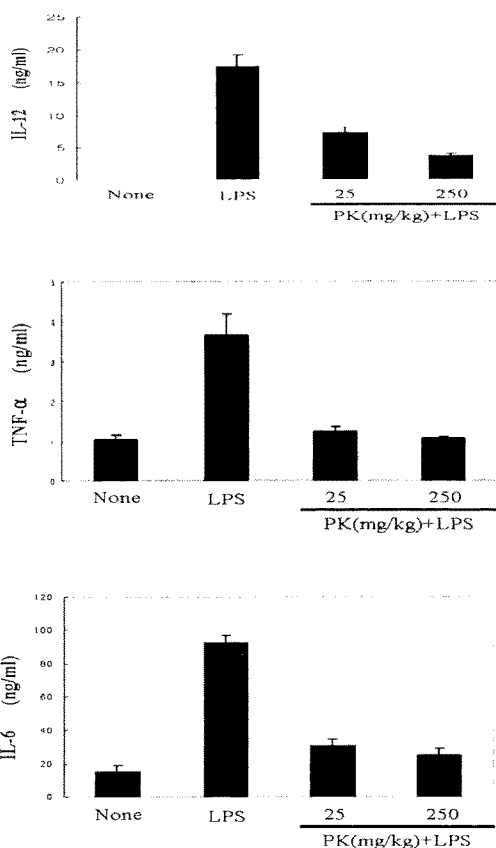


Figure 5. Effect of PK on the productions of TNF- α , IL-6, IL-12 (*in vivo*). PK was orally administered, for 7 days before LPS injected. Cytokine production was measured by an ELISA described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments performed in duplicate.

고찰

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 염증반응을 유발시킨다.

그 중에서도 그람음성 세균 세포외막의 성분인 LPS는 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 염증성 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다^(7,18). 그러나

LPS의 자극을 받은 대식세포에서 방출하는 대량의 사이토카인, TNF- α , superoxide 혹은 NO와 같은 염증성 분자들은 정상적인 세포의 기능을 파괴 하고, 또한 이러한 기능 파괴는 multiple-organ dysfunction syndromes 이나 혹은 lethal septic shock을 유발할 수 있으므로^{19,20,21,22)} LPS로 자극된 대식세포의 면역작용을 억제할 수 있는 약물의 발견은 치료에 매우 중요한 일이다.

LPS 자극에 의하여 현저하게 영향받는 대식세포 신호전달 분자로는 serine/threonine kinase로써 세포 밖 신호를 핵내로 전달하게 하는 MAPK가 있다. LPS에 의하여 활성화되는 MAP Kinase로는 ERK 1/2, p38, JNK등이 있고, LPS에 의해 분비된 TNF- α 에 의해서 NF- κ B 유전자가 전사를 위한 활성화가 되어서 NO 및 superoxide anion 등의 free radicals이 생성된다.^{23,24,25,26)}

이에 따라 본 연구에서 우선 백두옹이 대식세포에 대한 독성을 가지고 있는지 알아보기 위하여 MTT방식으로 조사한 결과 저자가 처리한 농도에서 백두옹은 대식세포에 대한 독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다. 체내 염증과정은 다량의 NO가 생성되는데 백두옹을 농도별로 전처리 하고 LPS로 NO생성을 유도했을때 NO의 생성이 백두옹추출물의 농도에 따라 농도 의존적으로 억제 함을 알수 있었다. 또한 LPS에 의해 매개되는 각종 사이토카인들 또한 백두옹을 처리한 농도 의존적으로 억제함을 알 수있었다.

MAPK 와 IKB- α 를 조사 하였다. 백두옹은 ERK1/2의 신호전달을 억제하였으나, 다른 MAPK은 억제하지 못하였다. 또한 IKB- α 의 분해도 억제하지 못했다. 따라서 백두옹에 의한 NO 생산억제 IL-6, IL-12, TNF- α 의 생산 억제는 ERK1/2의 활성을 억제하여 나타나는 결과로 사료된다. in vivo에서 LPS에 의한 자극에서 백두옹의 효과를 조사하기 위해 마우스 혈액에서 염증성 인자들을 조사했다. 백두옹을 투여한 집단에서 염증성인자들을 분비하는 것이 현저히 억제 하였음을 확인하였다.

결 론

마우스의 복강 대식세포에서 LPS로 자극시 백두옹의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백두옹의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 백두옹 농도별로 처리했을때 세

포독성이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다.

2. 대식세포에서 LPS로 자극 시 NO 생산을 백두옹이 농도 의존적으로 NO 생산을 억제하였다.

3. 백두옹을 전처리 시 TNF- α , IL-6, IL-12 항염증성 사이토카인의 분비를 조사하였을 때 백두옹의 농도 의존적으로 사이토카인 생산을 억제하였다.

4. 백두옹이 ERK 1/2의 인산화를 억제하였으나 다른 MAPK 나 IKB- α 에는 영향을 미치지 못했다.

5. 백두옹을 경구투여 한 마우스에서, serum 사이토카인들을 유의성 있게 감소시켰다.

이와 같은 결과로 보아 백두옹 추출물은 대식세포에 작용하여 ERK1/2의 인산화를 억제함으로써 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제하고 LPS로 유발되는 대식세포의 염증성 반응들을 억제함으로써 항염증성 효과를 가지고 있다고 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 백두옹이 항구균의 효과를 가진다는 것을 현대 과학적으로 증명하는 결과이며, 또한 항염에 탁월한 효과가 있을 것으로, 류마티스성 관절염 및 만성 염증성 질환에도 응용 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2007년 교비지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 金永坂, 康秉秀. 臨床配合本草學. 서울:永林社. 1994:236-7
2. 國家中醫藥管理局<中華本草>編修會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999:3권 1842
3. 韓藥研究所委員會. 韓藥學. 서울:大韓藥師會. 1986:138
4. 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 2000:218-9
5. akamatsu K, wakan yaku. Tokyo:Yichiyaku Publ. new edition. 1980:462-3
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of

- proewin utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.* 1976;72:248-254
- 7.Hendershot LC, Forsaith J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J Pharm Exptl Therap* 1959;125:237-240.
- 8.Lee KH. Pharmacological studies of pulsatillae Radix. Ph D Thesis 1974
- 9.Namba T. The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with color pictures. Osaka:Hoikushj. 1993:57
- 10.Kim HJ, Kim HT, Bae CI, Oh GJ, Park SK, Chung SG, Cho EH. Studies on the hypoglycemic constituent of Pulsatillae Radix(I). *Yakhak Hoeji.* 1997;41:709-713.
- 11.Nathan C, Xie QW, Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 1994;78:915-918
- 12.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.* 2000;28:217-226
- 13.Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:301-309
- 14.Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. 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.* 2000;35:21-28.
- 15.Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001;69:625-635
- 16.Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:119-123.
- 17.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.* 2002;366:376-382
- 18.Binetruy B, Smeal T, Kariu M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature.* 1991;351:122-127
- 19.Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *American journal of physiology.* 2002; 283:G255-G265.
- 20.Dos Santos CC, Slutsky AS. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *Journal of applied physiology.* 1985;89:1645-1655.
- 21.Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Critical care medicine.* 2001;29:S99-S106.
- 22.Shen FM, Guan YF, Xie HH, Su DF. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Shock.* 2004;21:556-560.
- 23.Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:211-218
- 24.Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. 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.* 2004;84:49-62
- 25.Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by suchinone effects on I- κ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British J Pharmacol.* 2003;139:11-20
- 26.Meng F, Lowell CA: Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase. *J Exp Med.* 1997;185(9):1661