

## PMA에 의해 유도된 cyclooxygenase-2 활성에 대한 새로운 발효법에 의한 대두산물의 억제 효능

박 철 · 이정옥<sup>1</sup> · 류충호<sup>1</sup> · 최영현\*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과(BK21), <sup>1</sup>경상대학교 농업생명과학대학 응용생명공학과

Received December 11, 2007 / Accepted February 14, 2008

**Inhibition of Phorbol 12-myristate-13-acetate Induced Cyclooxygenase-2 Activity by Three-step Fermented Soybeans.** Cheol Park, Jeong Ok Lee<sup>1</sup>, Chung Ho Ryu<sup>1</sup> and Yung Hyun Choi\*. *Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea; <sup>1</sup>Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea* - In this study, we examined the effects of the fermented soybeans by *Bacillus subtilis* (FSB) and the novel three-step fermented soybeans (TFS) on the expression and activity of COX-2 in human leukemic U937 cell model. Treatment of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) significantly induced pro-inflammatory mediators such as COX-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production, whereas the levels of COX-1 remained unchanged. However, pre-treatment with FSB and TFS significantly attenuated the PMA-induced COX-2 protein as well as mRNA, which was associated with inhibition of PGE<sub>2</sub> production. Moreover, TFS exerts a much better inhibitory activity than FSB against PMA-induced activation of COX-2 and production of PGE<sub>2</sub> in U937 cells. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-inflammatory activity of FSB and TFS.

**Key words :** Cyclooxygenase-2, prostaglandin E<sub>2</sub>, fermented soybeans by *Bacillus subtilis*, three-step fermented soybeans

### 서 론

생체 내에서 유발되는 염증반응에 있어서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[7]. Prostaglandin의 합성에는 2가지의 cyclooxygenase (COX) isoform이 관여하고 있는데, COX-1의 경우는 housekeeping gene으로서 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되어 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하는 반면에 COX-2는 interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, lipopolysaccharide (LPS) 및 tumor promoter 등에 의하여 과발현되며, 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 있어서 중요한 역할을 한다 [1,6,15,27]. 이러한 COX-2의 발현 정도는 정상세포에 비하여 여러 종류의 암세포에서 높은 수준으로 발현되고 있으며, COX-2의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 있어서도 COX-2가 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다[3,8,18]. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전

이능이 높아지고 apoptosis가 억제된다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있으며[8,25,30], 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor kappa B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다[30]. 하지만 COX-2에 대한 연구는 정상적인 세포에서 많이 이루어지고 있을 뿐 암세포에서의 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 있다. 최근에는 다양한 인체 암세포에서 염증매개물질에 의하여 유도되는 COX-2의 발현억제에 관한 연구가 많이 시도됨으로써 암세포에서의 염증매개물질들의 기전을 정확히 밝히는데 비중이 가해지고 있다[5,19,21].

한편 tumor promoter인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 유전자의 전사, 세포의 성장과 분화, apoptosis, 면역반응 및 protein kinase C 신호 전달계를 통한 receptor desensitization 등과 같은 다양한 세포반응을 조절하는 것으로 알려져 있다[2,13,14]. 또한 PMA는 강력한 PKC activator로서 growth factors, hormones 및 세포의 성장과 분화를 조절하는 cytokine에 의한 기작을 연구하는데 사용되며[22,23], cytokine 및 LPS와 마찬가지로 여러 세포들에서 COX-2의 발현 및 prostaglandin의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[9,11,16,24].

본 연구에서는 식물성 고단백 자원인 콩에 고초균(*Bacillus*

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : lab301@nate.com

*subtilis*)을 접종하여 단일 발효시킨 탈지고초와 항균성 peptide인 bacteriocin (nicin)을 생성하는 유산균으로 1단 발효시킨 후 황국균을 접종하여 2단 발효시킨 다음 다시 고초균을 접종하여 3단 발효시킨 탈지3단(three-step fermented soybeans) 산물[20]의 항염증 효과에 대한 생화학적 기전을 조사하였다. 이를 위하여 인체혈구암세포인 U937 세포모델에서 PMA에 의한 COX-2 및 prostaglandin의 발현과 탈지고초 및 탈지3단 산물이 PMA에 의해 유도된 COX-2 및 prostaglandin의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시료준비 및 세포배양

본 실험에 사용된 탈지고초(fermented soybeans by *Bacillus subtilis*, FSB) 및 탈지3단(three-step fermented soybeans, TFS) 산물은 Lee 등[20]의 방법에 준하여 제조된 것을 사용하였다. U937 세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였다.

### MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 U937 세포를 5×10<sup>4</sup> 개/ml로 분주하고 FSB 및 TFS를 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 6시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dime-thylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft Excel 프로그램으로 구하였다.

### DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

FSB 및 TFS 처리에 의한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 3.7% formaldehyde 및 0.2%의 Triton X-100 (Amresco) 용액으로 고정 후, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Luis, MO, USA) 용액으로 상온에서 약 10분간 염색하였다. 염색된 세포를 PBS로 충분히 세척하고 absolute alcohol을 이용하여 탈수 과정을 거친 후, 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화

를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

### Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

상기와 동일한 조건으로 준비된 세포들을 PBS로 씻어 내고 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 g로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

동일 조건에서 배양된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer (Table 1), DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 행하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 house-

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

keeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

### Prostaglandin E<sub>2</sub>의 측정

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 양의 측정을 위한 PGE<sub>2</sub> EIA kit는 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하기 위하여 U937 세포에 다양한 농도의 FSB 및 TFS를 1시간 전 처리 후 PMA (40 nM)를 처리한 배지에서 6시간 동안 세포를 배양시킨 다음 상층액만 이용하여 제시된 방법에 따라 처리한 다음 ELISA reader를 이용한 420 nm의 흡광도로 반응의 정도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포의 증식에 미치는 PMA, FSB 및 TFS의 영향

FSB 및 TFS를 단독 처리했을 경우와 PMA와 같이 처리했을 경우 U937 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하였다. Fig. 1A 및 B에서 나타난 바와 같이 FSB를 6시간동안 처리했을 경우는 3.0 mg/ml의 농도까지 아무런 변화가 나타나지 않았고, TFS의 경우는 2.5 및 3.0 mg/ml의 농도에서는 세포의 증식이 유의적으로 감소하였지만 2.0 mg/ml 이하의 농도에서는 변화가 관찰되지 않았다. 또한 Fig. 1C 및 D와 같이 FSB 및 TFS를 1시간 선처리한 다음 40 nM의 PMA를 6시간동안 처리했을 경우는 2 mg/ml의 농도까지 세포의 증식에 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 40 nM의 PMA와 2.0 mg/ml의 FSB 및 TFS는 U937 세포의 증식에 아무런 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

### 세포 형태에 미치는 PMA, FSB 및 TFS의 영향

PMA와 FSB 및 TFS의 처리에 따른 U937 세포의 전체적인 형태 변화를 알아보기 위하여 PMA를 1시간 선처리한 다음 FSB 및 TFS를 6시간 처리하였을 경우 Fig. 1E에서 보는 바와 같이 세포의 밀도도 감소하지 않았으며 세포의 형태에도 변화가 없음을 알 수 있었다. 또한 Fig. 1F에서 나타난 바와 같이 U937 세포 핵의 형태적 변화를 관찰하였을 경우, 염색질

응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 관찰되지 않았고 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색되었다. 이는 PMA와 FSB 및 TFS의 처리에 따른 세포 증식 결과와 잘 부합되는 결과였다.

### COXs의 발현에 미치는 PMA의 영향

U937 세포에서 PMA 처리농도 또는 시간에 따른 COX-2 단백질의 발현 정도를 Western blotting으로 관찰하였다. Fig. 2A에서 나타난 바와 같이 PMA를 농도별로 6시간동안 처리하였을 경우 COX-1의 경우는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 COX-2의 경우는 40 nM의 농도에서부터 강하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 다음으로 PMA 처리시간에 따른 COX-2의 발현정도를 관찰한 결과 Fig. 2B에서와 같이 PMA 처리 2시간까지는 아무런 변화가 나타나지 않았지만 4시간부터 COX-2의 발현이 나타나기 시작하여 6시간에서는 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 PMA는 U937세포에서 증식 및 COX-1의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하지만 염증발현에 중요한 역할을 하는 COX-2의 발현을 증가시켰음을 알 수 있었다.

### PMA에 의한 COX-2의 발현 증가에 미치는 FSB 및 TFS의 영향

인체의 거의 모든 세포에서 COX-2의 과발현은 여러 가지 질병을 일으키는 요인이 되는 것으로 밝혀지면서 이러한 염증매개인자의 억제에 관한 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다[4,8,12,19,26]. 따라서 U937 세포에서 PMA에 의한 COX-2의 과발현 현상에 대한 FSB 및 TFS의 영향을 관찰하기 위하여 FSB 및 TFS를 2 mg/ml의 농도로 단독 처리하였을 경우와 PMA를 1시간 선처리한 후 FSB 및 TFS를 처리하여 6시간 경과 후의 COX-1 및 COX-2의 발현 정도를 Western blot 및 RT-PCR 방법으로 관찰하였다. Fig. 2C 및 E에서 나타난 바와 같이 COX-1의 경우는 아무런 변화가 없었지만 PMA에 의해서 과발현된 COX-2의 경우는 단백질 및 mRNA 발현 모두에서 FSB 및 TFS의 선처리에 의해서 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 특히 FSB에 비해서 TFS를 선처리하였을 경우 COX-2 발현의 억제정도가 증가하는 것으로 관찰되었다.

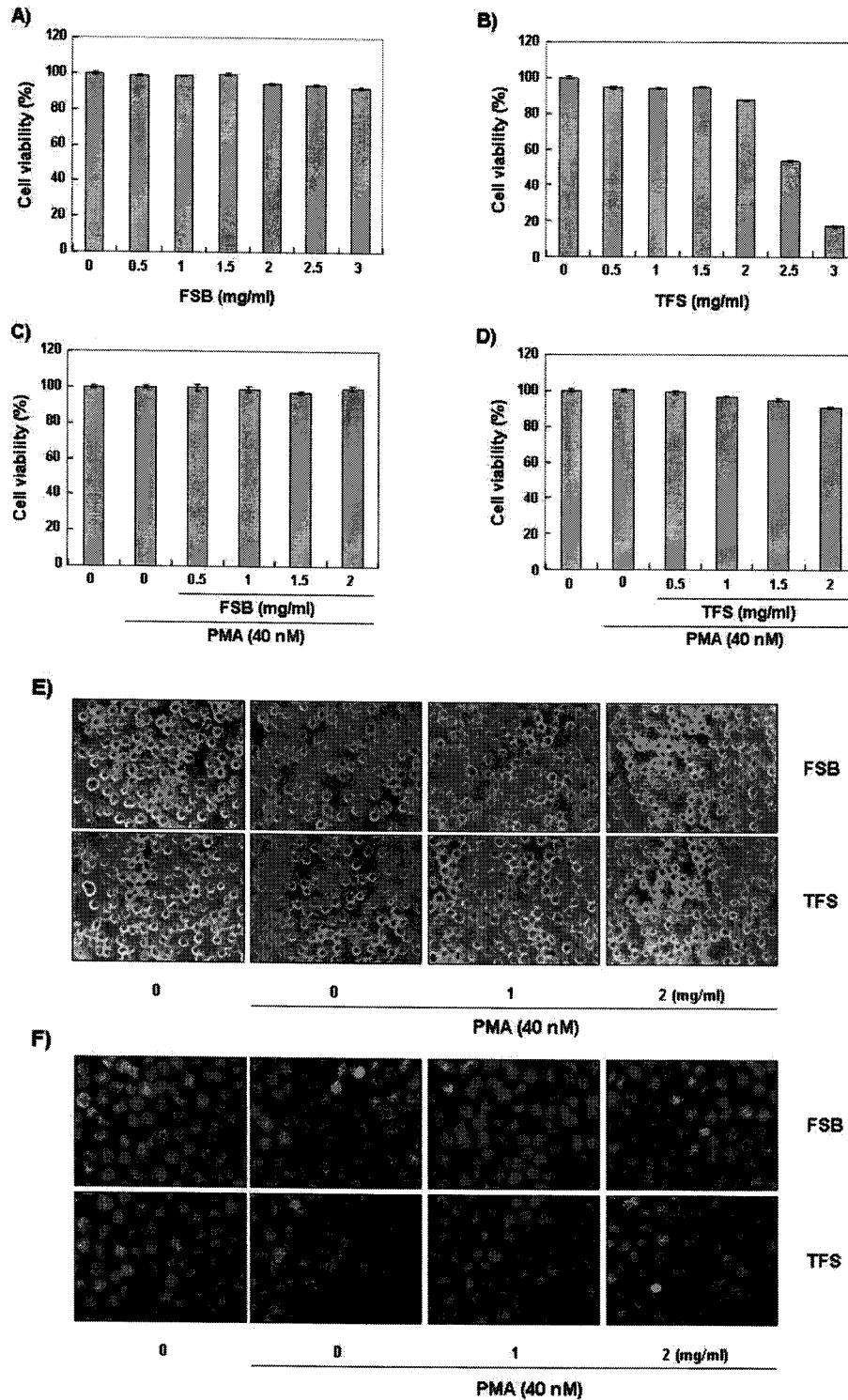


Fig. 1. Effect of fermented soybeans by *Bacillus subtilis* (FSB), three-step fermented soybeans (TFS) and PMA on the cell proliferation in U937 cells. The cells were incubated with indicated concentrations of FSB and TFS (A and B) or 2 mg/ml of FSB and TFS for 6 hr after 1 hr pretreatment with 40 nM of PMA (C and D). The rate of cell proliferation was measured by the metabolic-byte-based MTT assay. The data shown are means±SD of three independent experiments. (E) The cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, ×200. (F) The cells were stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, ×400.

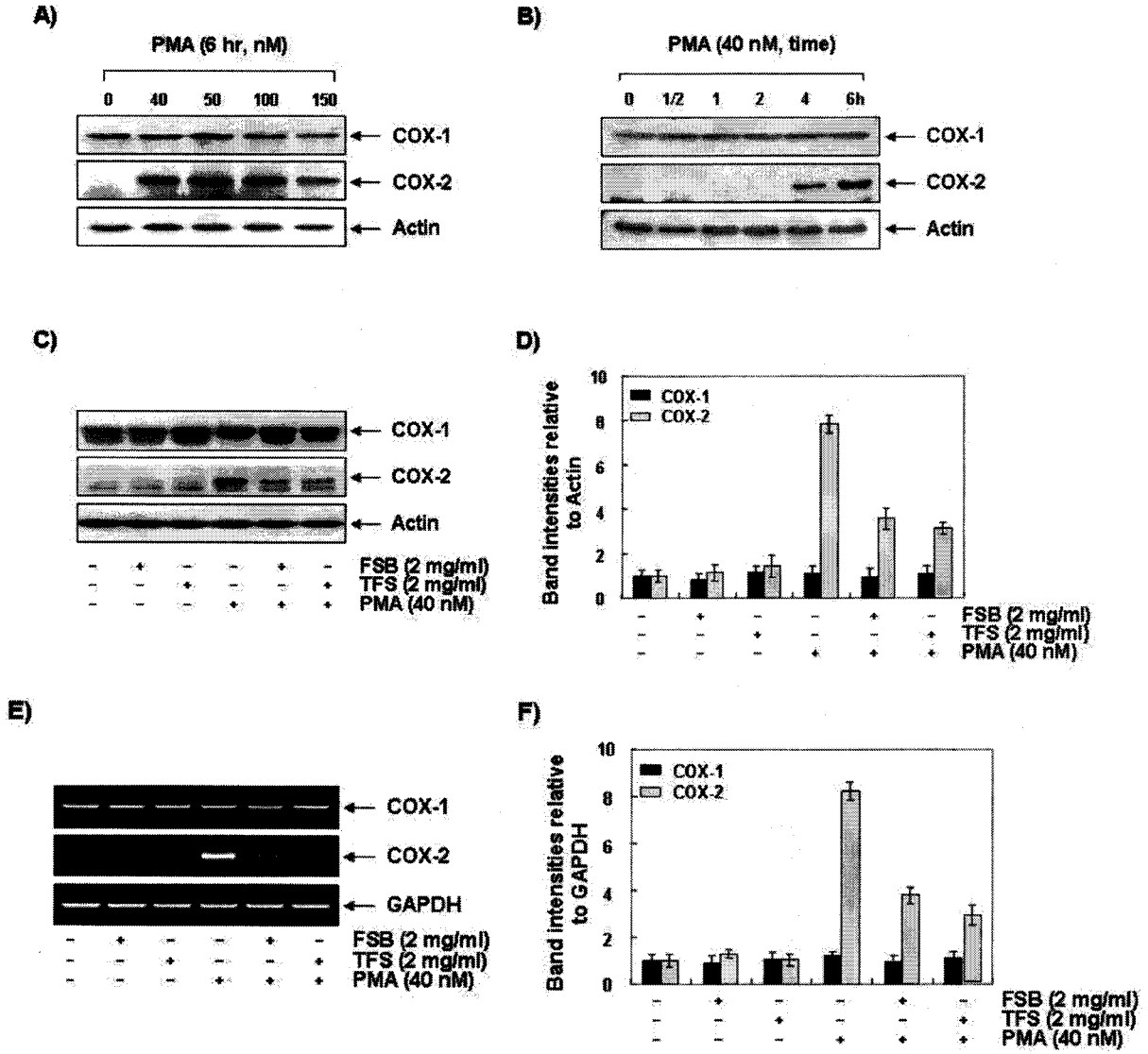


Fig. 2. Effects of FSB, TFS and PMA treatment on the levels of COXs proteins and mRNA expressions in U937 cells. (A and B) The cells were incubated with various concentrations PMA for 6 hr or incubated with 40 nM PMA for indicated times. (C) Cells were incubated with 2 mg/ml of FSB and TFS for 6 hr after 1 hr pretreatment with 40 nM of PMA. Cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. (D) Protein levels of COX-1 and COX-2 were normalized by actin protein. (E) The cells were incubated with 2 mg/ml of FSB and TFS for 6 hr after 1 hr pretreatment with 40 nM of PMA, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. (F) mRNA levels of COX-1 and COX-2 were normalized by GAPDH mRNA.

**FSB 및 TFS의 PMA에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성의 억제**

염증성 질환을 포함한 다양한 생체반응에서 PGE<sub>2</sub>는 세포 분열이나 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병의 유발과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으며[8,9,19,28], PMA는 전사 조절인자들의 발현을 통하여 PGE<sub>2</sub>의 생성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다[10,20,29]. 따라서 U937 세포에서 PMA에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성 증가에 미치는 FSB 및 TFS의 영향을

조사한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 PMA 처리에 의해서 PGE<sub>2</sub>의 생성이 현저하게 증가하는 것을 알 수 있었고, 또한 FSB 및 TFS의 선처리에 의하여 PGE<sub>2</sub>의 생성이 매우 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제에 미치는 영향은 FSB에 비하여 TFS 처리군에서 더욱 효과적이었다. 이상의 결과를 살펴볼 때 FSB 및 TFS는 모두 COX-2의 활성 저해로 인한 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제작용이 있음을 알 수 있었다.

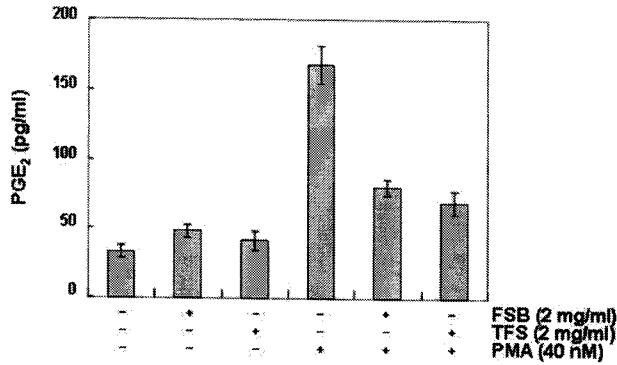


Fig. 3. Effects of FSB and TFS on the PMA-induced PGE<sub>2</sub> production in U937 cells. The cells were pretreated with 2 mg/ml of FSB and TFS for 1 hr followed by incubation with PMA (40 nM) for 6 hr. The PGE<sub>2</sub> accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. The data shown are means±SD of three independent experiments.

요 약

이상의 연구 결과에 의하면 U937 세포에서 FSB 및 TFS 모두 2 mg/ml의 농도에서 6시간까지는 세포증식에 아무런 영향을 미치지 못하였고 PMA 처리에 의해서도 세포증식은 변화가 없었으며, 세포의 형태 및 핵의 형태도 PMA와 FSB 및 TFS의 처리에 의해서 아무런 변화가 나타나지 않았다. 그러나 COX-2의 발현의 정도는 PMA 처리에 의해서 증가하였고, 이렇게 증가한 COX-2는 FSB 및 TFS의 선처리에 의해서 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 또한 COX-2에 의해 생성되어 염증반응을 유발하며 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 PGE<sub>2</sub>의 경우도 PMA 처리에 의하여 증가하였으며 FSB 및 TFS 처리에 의해서 강하게 억제되었다. 특히 FSB에 비하여 TFS를 선처리하였을 경우 PMA에 의하여 과발현된 COX-2 및 PGE<sub>2</sub> 생성의 억제정도가 더 강하게 나타났다. 이러한 결과는 FSB 및 TFS의 항염증기전 해석을 위한 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(105113-03-2-SB010)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

1. Balzary, R. W. and T. M. Cocks. 2006. Lipopolysaccharide induces epithelium- and prostaglandin E(2)-dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of

cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 806-812.

2. Basta, S., S. Knoetig, A. Summerfield and K. C. McCullough. 2001. Lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate 13-acetate both impair monocyte differentiation, relating cellular function to virus susceptibility. *Immunology* **103**, 488-497.

3. Brown, J. R. and R. N. DuBois. 2004. Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4266s-4269s.

4. Brunelle, M., E. A. Sartin, L. G. Wolfe, J. Sirois and M. Dore. 2006. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet. Pathol.* **43**, 656-666.

5. Chen, P., Y. Cai, Z. G. Yang, R. Zhou, G. S. Zhang, F. Domann and X. Fang. 2006. Involvement of PKC, p38 MAPK and AP-2 in IL-1β-induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *Respirology* **11**, 18-23.

6. Dempke, W., C. Rie, A. Grothey and H. J. Schmoll. 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 411-417.

7. FitzGerald, G. A. 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 879-890.

8. Giercksky, K. E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15**, 821-833.

9. Herschman, H. R. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1299**, 125-40.

10. Heuze-Vourc'h, N., M. Liu, H. Dalwadi, F. E. Baratelli, L. Zhu, L. Goodglick, M. Pold, S. Sharma, R. D. Ramirez, J. W. Shay, J. D. Minna, R. M. Strieter and S. M. Dubinett. 2005. IL-20, an anti-angiogenic cytokine that inhibits COX-2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 470-475.

11. Jiang, Y. J., B. Lu, P. C. Choy and G. M. Hatch. 2003. Regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenase-1 and -2 expression by PMA, TNFα, LPS and M-CSF in human monocytes and macrophages. *Mol. Cell Biochem.* **246**, 31-38.

12. Jin, D. Z., L. L. Yin, X. Q. Ji and X. Z. Zhu. 2006. Cryptotanshinone inhibits cyclooxygenase-2 enzyme activity but not its expression. *Eur. J. Pharmacol.* **549**, 166-172.

13. Johnson, A. C. 1996. Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J. Biol. Chem.* **271**, 3033-3038.

14. Johnson, K. R., K. P. Becker, M. M. Facchinetti, Y. A. Hannun and L. M. Obeid. 2005. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J. Biol. Chem.* **277**, 35257-35262.

15. Ke, J., X. Long, Y. Liu, Y. F. Zhang, J. Li, W. Fang and Q. G. Meng. 2007. Role of NF-κB in TNF-α-induced COX-2 expression in synovial fibroblasts from human TMJ. *J. Dent. Res.* **86**, 363-367.

16. Kim, S. O., K. S. Chun, J. K. Kundu and Y. J. Surh. 2004. Inhibitory effects of [6]-gingerol on PMA-induced COX-2 expression and activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in mouse skin. *Biofactors* **21**, 27-31.
18. Koki, A., N. K. Khan, B. M. Woerner, A. J. Dannenberg, L. Olson, K. Seibert, D. Edwards, M. Hardy, P. Isakson and J. L. Masferrer. 2002. Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **507**, 177-184.
19. Lee, E., M. K. Choi, Y. J. Lee, J. L. Ku, K. H. Kim, J. S. Choi and S. J. Lim. 2006.  $\alpha$ -tocopheryl succinate, in contrast to  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E2 production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis* **27**, 2308-2315.
20. Lee, J. O., M. H. Park, Y. H. Choi, Y. L. Ha and C. H. Ryu. 2007. New fermentation technique for complete digestion of soybean protein. *J. Microbiol. Biotechn.* **17**, 1904-1907.
21. Nieminen, R., S. Leinonen, A. Lahti, K. Vuolteenaho, U. Jalonen, H. Kankaanranta, M. B. Goldring and E. Moilanen. 2005. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators Inflamm.* **5**, 249-255.
22. Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.
23. Parekh, D. B., W. Ziegler and P. J. Parker. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 496-503.
24. Renò, F. and M. Cannas. 2005. Effect of prostaglandin E2 on PMA-induced macrophage differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **75**, 13-24.
25. Sawaoka, H., S. Tsuji, M. Tsujii, E. S. Gunawan, Y. Sasaki, S. Kawano and M. Hori. 1999. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Lab. Invest.* **79**, 1469-1477.
26. Seo, Y. J., M. S. Kwon, E. J. Shim, J. Y. Lee and H. W. Suh. 2006. The effects of phorbol 12-myristate 13-acetate, cholera toxin, prostaglandin E2 and norepinephrine on inducible nitric oxide synthase activation induced by lipopolysaccharide in C6 cells. *Pharmacology* **78**, 178-184.
27. Soloff, M. S., D. L. Cook, Y. J. Jr, Jeng and G. D. Anderson. 2004. In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of COX-2 and IL-8 in cultured human myometrial cells. *Endocrinology* **145**, 1248-1254.
28. Thun, M. J., S. J. Henley and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 252-266.
29. Tong, M., Y. Ding and H. H. Tai. 2006. Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* **27**, 2170-2179.
30. Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**, 135-142.