

Isoliquiritigenin의 toll-like receptor agonists에 의해서 유도된 NF-κB 활성화와 cyclooxygenase-2 발현 억제

박세정¹ · 양승주² · 윤형선^{1,3*}

¹순천향대학교 의료과학대학 의료과학과, ²건양대학교 임상병리학과, ³순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과

NF-κB Activation and Cyclooxygenase-2 Expression Induced by Toll-Like Receptor Agonists can be Suppressed by Isoliquiritigenin

Se-Jeong Park¹, Seung-Ju Yang², and Hyung-Sun Youn^{1,3*}

¹Department of Medical Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University

²Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University

³Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University

Abstract Toll-like receptors(TLRs) are pattern recognition receptors(PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns(PAMPs) and regulate the activation of innate immunity. All TLR signaling pathways culminate in the activation of NF-κB, leading to the induction of inflammatory gene products such as COX-2. Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) has been used for centuries as an herbal medicine. Isoliquiritigenin(ILG), a simple chalcone-type flavonoid, is an active component present in licorice and has been used to treat many chronic diseases. However, the mechanism as to how ILG mediates health effects is still largely unknown. In the present report, we present biochemical evidence that ILG inhibits the NF-κB activation induced by TLR agonists and the overexpression of downstream signaling components of TLRs, MyD88, IKKβ, and p65. ILG also inhibits TLR agonists-induced COX-2 expression. These results suggest that anti-inflammatory effects of ILG are caused by modulation of the immune responses regulated by TLR signaling pathways.

Key words: toll-like receptors, isoliquiritigenin, NF-κB, COX-2, LPS

서론

오래전부터 의약품으로 사용되는 많은 식물들 중에는 항암, 항염증 효과를 가지고 있다고 알려져 있는 많은 기능성 소재들이 포함되어 있다. 그러한 식물들 중의 하나가 감초(licorice, *Glycyrrhiza uralensis*)이다. 약방의 감초라는 말이 있듯이, 감초는 한약재에 널리 사용되어 왔다. 감초는 오랫동안 음식, 음료수, 담배 등의 맛을 내는 성분으로 사용되었으며, 또한 위궤양(gastric ulcers), 십이지장 궤양(duodenal ulcers), 후두염(sore throats), 감기(coughs), 기관지염(bronchitis), 관절염(arthritis), 부신병(adrenal insufficiency), 그리고 알러지(allergies) 등의 치료에 사용되었다(1-4). 감초는 의학적으로 효과를 가지고 있는 glycyrrhizin, glabridin, 그리고 isoliquiritigenin과 같은 성분들을 포함하고 있다고 많은 연구에 의해서 알려졌다(5-7). 그 중에서도 chalcone 구조를 가지고 있는 flavonoid 중의 하나인 isoliquiritigenin(ILG)(Fig. 1)은 vasorelaxant (8), anti-platelet aggregation(9) 그리고 anti-allergic activity(10)를 가지고 있다. 또한 ILG는 RAW 264.7 cells에서 LPS(TLR4 ago-

nist)에 의해서 유도된 inducible nitric oxide(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있다(2).

Toll-like receptors(TLRs)는 pathogen-associated molecular patterns(PAMPs)을 인식하는 pattern recognition receptors(PRR)이며, 선천성 면역(innate immunity) 반응을 유도하고, 뒤이어 후천성 면역(acquired immunity) 반응을 유도하는 중요한 역할을 한다(11-14). 현재까지 최소한 열세 개의 TLRs가 포유동물 세포 안에서 발견되었으며, 각각의 TLRs는 병원체들이 가지고 있는 각각의 독특한 구조를 인식한다(11). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, 그리고 TLR6는 세포막에 존재하며 박테리아의 구성 성분들을 인식하는 반면에, TLR3, TLR7, TLR8, 그리고 TLR9은 endosome과 같은 세포질에 있는 성분들의 막에 존재하며 바이러스 핵산들을 인식한다(Fig. 2)(15). TLR9은 또한 박테리아 핵산을 인식한다. TLRs에 agonists가 붙으면 MyD88(myeloid differential factor 88) 또는 TRIF(Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN-β)를 통

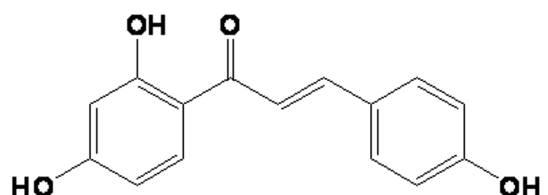


Fig. 1. The structure of isoliquiritigenin.

*Corresponding author: Hyung-Sun Youn Department of Biomedical Laboratory Science College of Medical Sciences Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea

Tel: 82-41-530-3086

Fax: 82-41-530-3085

E-mail: hyoun@sch.ac.kr

Received January 12, 2009; revised February 1, 2009;

accepted February 3, 2009

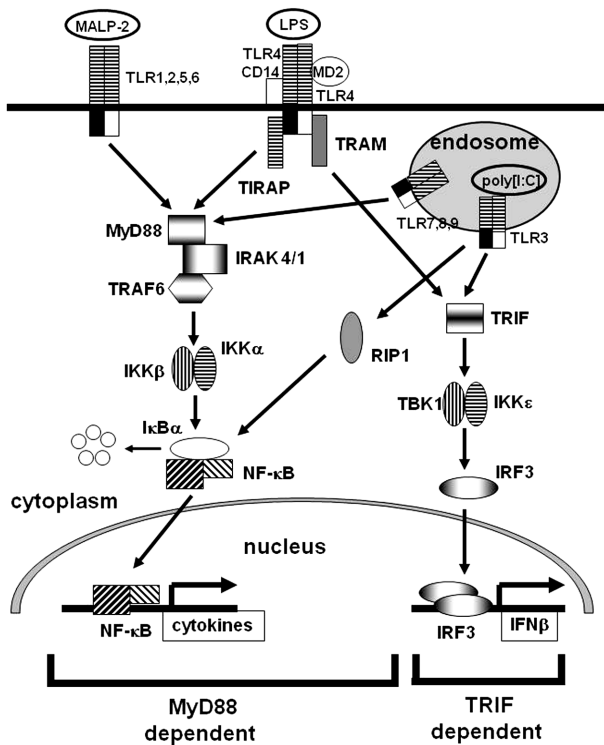


Fig. 2. Toll-like receptor signaling pathways. TLRs have two major downstream signaling pathways; MyD88- and TRIF-dependent pathways leading to the activation of NF- κ B and IRF3. LPS, lipopolysaccharide; MyD88, myeloid differential factor 88; TRIF, TIR domain-containing adapter inducing IFN β ; IFN, interferon; TIRAP, TIR domain-containing adapter protein; TRAM, TRIF-related adapter molecule; I κ B α , inhibitor of kappa B alpha; IKK, I κ B kinase; IRAK, IL-1 receptor-associate kinase; TBK1, TANK-binding kinase 1; RIP1, receptor interacting protein 1; IRF3, IFN-regulatory factor 3; NF- κ B, nuclear factor κ B.

한 신호 전달 체계를 통하여 전사 요소 nuclear factor κ B(NF- κ B)를 활성화시킨다(11). NF- κ B의 활성화는 결국 cytokine이나 (COX-2)와 같은 염증을 유발하는 유전체들을 유도한다(11).

오늘날 염증을 치료하기 위한 많은 약들이 개발되었다. 특히 COX에 의한 통증을 완화시키기 위해서 Non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)들이 개발되었다. NSAIDs의 대표적인 약물로는 aspirin, ibuprofen과 naproxen 등이 있다(16). 하지만 NSAIDs에 의한 gastric problems 때문에 오늘날 많은 연구자들은 염증 치료를 위해서 자연에서 얻어진 물질에 보다 높은 관심을 가지기 시작하였다(17). 항염증 효과를 가지고 있는 음식들은 대부분이 색깔을 가지고 있는 과일과 채소, 생선 기름(fish oil), 견과류(nuts), 씨앗(seeds), 허브(herbs), 그리고 향신료(spices) 등이 있다(18).

이번 연구에서는 자연에 존재하는 물질의 항염증 효능을 알아보기 위해서 한약제로 널리 사용되고 있는 감초 안에 포함되어 있는 천연물질을 선택하였다. 특히 ILG가 면역시스템 조절을 위해서 중요한 역할을 하는 TLRs 신호전달체계를 어떻게 조절하여 항염증 효과를 가지고 있는지 알아보았다. ILG는 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 COX-2를 억제하였으며, 이러한 결과들은 우리가 매일 먹는 식품들이 어떻게 여러 병원균들로부터 유도되는 염증반응이나 만성적인 질병들을 조절할 수 있는지를 보여주는 중요한 결과라 할 수 있겠다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 isoliquiritigenin은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. MALP-2(Macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa), LPS(lipopolysaccharide) 그리고 poly[I:C](polyriboinosinic polyribocytidylic acid)는 Alexis Biochemical(San Diego, CA, USA), List Biological Lab(San Jose, CA, USA) 그리고 Amersham Biosciences(Piscataway, NJ, USA) 회사로부터 각각 구입하였다. COX-2와 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 회사로부터 구입하였다.

세포 배양

RAW 264.7 cells(a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)과 293T cells(human embryonic kidney)은 10%(v/v) FBS, 100 units/mL Penicillin, 100 mg/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였으며, 세포들은 5% CO₂/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

트랜스펙션(transfection)과 발광효소 유전자 분석(luciferase reporter gene assay)

NF- κ B발광 plasmid, heat shock protein(HSP) 70- β -galactosidase plasmid 등 transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 준비되었다.

NF- κ B발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다(19, 20). 발광효소 plasmid와 HSP70- β -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약(Qiagen)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광 효소의 활성화는 luciferase assay system(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는 β -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

면역압(immunoblotting)방법

Western blotting은 선행연구의 방법에 의하여 분석하였다(21, 22). 단백질 추출물들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었으며, Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking하였다. Membrane 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL western blot detection 시약(Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 단백질을 규명하였다.

데이터 분석

각각의 데이터 값은 세 개가 한벌의 실험으로 얻어졌으며, mean \pm standard error mean(SEM)으로 표현되었다.

결과 및 고찰

ILG의 TLR agonists에 의해 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2 발현의 억제

먼저 우리는 감초에 포함되어 있는 phytochemicals 중의 하나

인 ILG가 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2 발현을 억제하는지를 알아보았다. ILG는 MALP-2(TLR2 and TLR6 agonist), poly[I:C](TLR3 agonist) 그리고 LPS(TLR4 agonist)에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제하였다(Fig. 3). 다음 실험으로 발광효소 유전자 분석과 western blotting 방법을 사용하여 NF- κ B 활성화에 의해서 조절되는 유전자인 COX-2 발현이 ILG에 의해서 억제되는지 알아보았다. ILG는 MALP-2, poly[I:C] 그리고 LPS에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제시켰다(Fig. 4). 이러한 결과는 ILG가 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 신호 전달체계를 억제한다는 것을 의미한다.

ILG의 TLRs downstream 분자에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화 억제

마지막으로 우리는 ILG가 TLRs의 downstream 분자에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제하는지 알아보았다. ILG는 MyD88, IKK β 또는 p65에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시켰다(Fig. 5).

많은 식물들에는 항염증 효과를 가지고 있는 phytochemical들이 포함되어 있다. 이러한 phytochemicals 중에 Michael addition에 의해서 sulfhydryl 그룹에 반응할 수 있는 α,β -unsaturated carbonyl 그룹을 가지고 있는 폴리페놀이나 sesquiterpene lactone 등이 많이 있다(23, 24). 많은 α,β -unsaturated carbonyl 그룹을 가지고 있는 phytochemicals은 IKK에 있는 cysteine의 sulfhydryl(-SH) 그룹에 붙어서 IKK 인산화 효소의 효과를 억제시키는 것으로 알

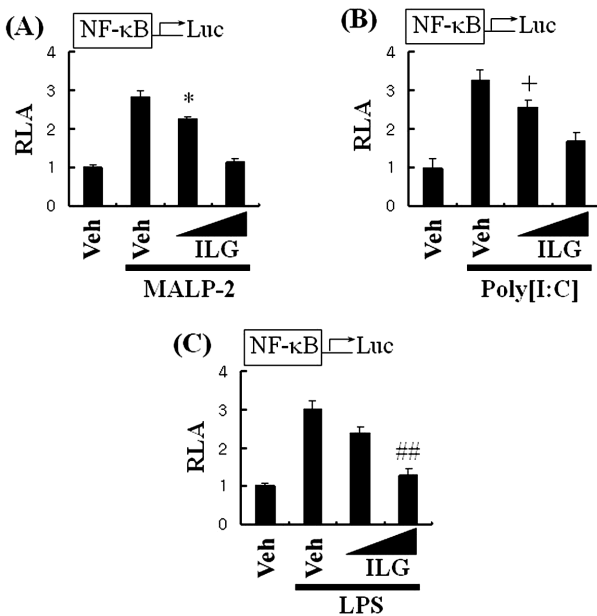


Fig. 3. Isoliquiritigenin suppressed the NF- κ B activation induced by MALP-2, poly[I:C] or LPS. A-C) RAW264.7 cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter plasmid and pre-treated with isoliquiritigenin (50, 100 μ M) for 1 hr and then treated with MALP-2 (10 μ g/mL) (A), poly[I:C] (10 mg/mL) or (B), LPS (10 ng/mL) (C) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM (n = 3). *, Significantly different from MALP-2 alone, $p < 0.05$. +, Significantly different from poly[I:C] alone, $p < 0.05$. ##, Significantly different from LPS alone, $p < 0.01$. Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin.

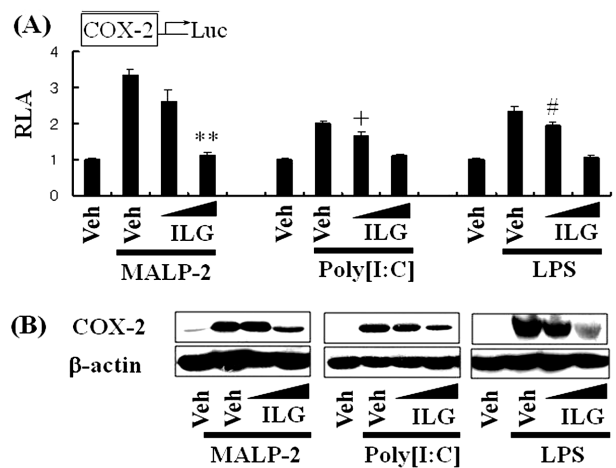


Fig. 4. Isoliquiritigenin suppressed the COX-2 expression induced by MALP-2, poly[I:C] or LPS. A) RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pre-treated with isoliquiritigenin (50, 100 μ M) for 1 hr and then treated with MALP-2 (10 ng/mL), poly[I:C] (10 μ g/mL) or LPS (10 ng/mL) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM (n = 3). **, Significantly different from MALP-2 alone, $p < 0.01$. +, Significantly different from poly[I:C] alone, $p < 0.05$. #, Significantly different from LPS alone, $p < 0.05$. B) RAW264.7 cells were pretreated with isoliquiritigenin (50, 100 μ M) for 1 hr and then further stimulated with MALP-2 (10 μ g/mL), poly[I:C] (10 mg/mL) or LPS (10 ng/mL) for 8 hrs. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin.

려져 있다(25). Sesquiterpene lactone 중의 하나인 helenalin은 p65 안에 있는 두 개의 cysteine(Cys38, Cys120)에 붙어서 전사요소 NF- κ B의 DNA 결합을 억제시키는 것으로 알려져 있다(26, 27). 또한 선행 연구에 의하면 α,β -unsaturated carbonyl 그룹을 가지고 있는 curcumin, helenalin, 그리고 cinnamaldehyde는 LPS(TLR4 agonist)에 의해서 유도된 TLR4의 동종 이합체의 형성을 억제하여 NF- κ B 활성화나 COX-2 발현을 억제시키는 것을 알아내었다(19, 28). ILG 또한 α,β -unsaturated carbonyl 그룹을 가지고 있다(Fig. 1). 이러한 구조는 ILG가 IKK나 TLR의 cysteine의 thiol 그룹에 붙어서 NF- κ B 활성화나 COX-2 발현을 억제시킬 것이라는 것을 예측할 수 있다. 앞으로 kinase assay나 이합체 형성 실험을 통해서 ILG가 어떻게 NF- κ B 활성화나 COX-2 발현을 억제하는지 정확한 분자학적인 타겟이 밝혀질 것이다.

Kumar 등(29)은 ILG가 I κ B kinase를 억제하여서 NF- κ B 활성화를 억제한다고 보고하였다. 또한 Kim 등(2)은 ILG가 RAW 264.7 cells 안에서 NF- κ B 활성화의 억제를 통하여 LPS에 의해서 유도된 iNOS와 COX-2를 억제한다고 보고하였다. 하지만 이번 실험에서는 앞선 두 그룹에서 발견하지 못한 다른 중요한 결과를 발견하였다. TLRs는 커다랗게 두 개(MyD88과 TRIF-dependent)의 신호전달 체계를 통하여 NF- κ B를 활성화한다(Fig. 2). MyD88-dependent pathway는 IKK β 를 통한 canonical pathway를 통하여 NF- κ B를 활성화시키지만, TRIF-dependent pathway는 IKK β 대신에 RIP-1을 통하여 NF- κ B를 활성화시킨다고 알려져 있다. MALP-2(TLR2와 TLR6 agonist)와 LPS(TLR4 agonist)는 I κ B kinase를 통하여 NF- κ B를 활성화 하지만, poly[I:C](TLR3

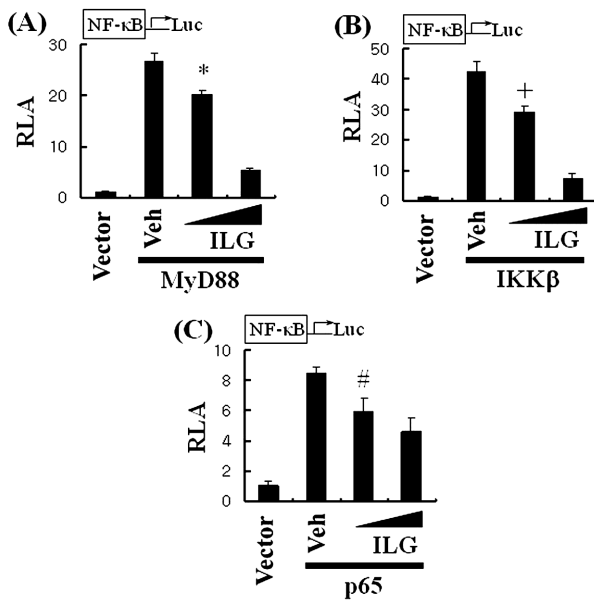


Fig. 5. Isoliquiritigenin inhibits the activation of NF-κB induced by the overexpression of MyD88, IKKβ, or p65. A-C) 293T cells were co-transfected with NF-κB-luciferase reporter plasmid and an expression plasmid for MyD88, IKKβ, or p65. pcDNA was used as a vector control for MyD88, IKKβ and p65. After 3 hrs, cells were treated with isoliquiritigenin (50, 100 μM) for 18 hrs. Relative luciferase activity (RLA) was determined by normalization with β-galactosidase activity. Values are mean±SEM (n = 3). *, Significantly different from MyD88 plus vehicle, $p < 0.05$. +, Significantly different from IKKβ plus vehicle, $p < 0.01$. #, Significantly different from p65 plus vehicle, $p < 0.05$. Veh, vehicle; ILG, isoliquiritigenin.

agonist)는 IκB kinase를 통하지 않고 NF-κB를 활성화한다(11, 30). 실험결과에 의하면, ILG가 MALP-2와 LPS에 의해서 유도된 NF-κB를 억제하는 것은 IKKβ의 억제에 기인한다고 할 수 있겠지만, ILG가 poly[I:C]에 의해서 유도된 NF-κB를 억제하는 것은 ILG가 IKKβ 아닌 다른 곳을 분자학적인 타겟으로 하고 있다는 것을 제시한다고 할 수 있다. 기존의 연구들은 ILG가 IKKβ를 타겟으로 삼아 MyD88-dependent pathway를 통한 NF-κB 활성화를 억제시킨다는 것을 밝혀내었지만, 우리 연구에서는 ILG가 MyD88-dependent pathway 뿐만 아니라 TRIF-dependent pathway를 통한 NF-κB 활성화도 억제시킨다는 것을 알아내었다. 그러므로 앞으로의 연구에서 ILG가 어떻게 TRIF-dependent pathway를 통한 TLRs 신호전달체계를 조절하는지 정확한 분자학적인 타겟이 밝혀질 것으로 기대한다.

우리는 이번 연구를 통해서 감초 추출물인 ILG가 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 NF-κB 활성화와 COX-2 발현을 억제시키는 것을 밝혀내었다. 이러한 발견은 한약제로 오랫동안 사용되어온 감초가 TLRs에 의해서 조절되는 염증 반응이나 또는 뒤 이어 발생하는 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 중요한 가능성을 제시해 준다고 할 수 있겠다.

요약

선천성 면역 반응을 위해 중요한 역할을 하는 TLRs가 외부 병원성 물질에 자극을 받게 되면 NF-κB를 활성화시키며, 그 결과로 염증을 유도하는 COX와 같은 유전자를 발현한다. 이번 연구

에서, 옛날부터 지금까지 전통적인 약제로써 질병 치료에 다양하게 쓰이고 있는 감초의 뿌리에서 추출한 성분 중의 하나인 ILG가 NF-κB활성과 COX 발현을 어떻게 조절하여 항염증 효과를 가지고 있는지 알아보았다. ILG는 TLR agonists인 MALP-2, Poly[I:C], 그리고 LPS에 의해 유도된 NF-κB 활성화와 COX-2 발현을 억제시켰다. 또한 ILG는 리간드(ligand)에 독립적인 TLRs signaling downstream molecules인 MyD88, IKKβ, 그리고 p65에 의해서 유도된 NF-κB 활성을 억제시켰다. 이러한 결과는 한약제로서 많이 이용되는 감초가 단지 한약의 쓴맛을 줄이기 위함이 아니라 TLRs 신호전달 체계를 조절하여 항염증 효과를 가지고 있다는 것을 보여주는 것이라 할 수 있겠다.

문헌

- Fintelmann V. Modern phytotherapy and its uses in gastrointestinal conditions. *Planta Med.* 57: S48-S52 (1991)
- Kim JY, Park SJ, Yun KJ, Cho YW, Park HJ, Lee KT. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 584: 175-184 (2008)
- Kamei J, Saitoh A, Asano T, Nakamura R, Ichiki H, Iiduka A, Kubo M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of the antitussive principles of *Glycyrrhizae radix* (licorice), a main component of the Kampo preparation Bakumondo-to (Mai-men-dong-tang). *Eur. J. Pharmacol.* 507: 163-168 (2005)
- Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W, Theoharides TC. The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma. *J. Herb. Pharmacother.* 3: 41-54 (2003)
- Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia* 74: 624-629 (2003)
- Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigm. Cell Res.* 11: 355-361 (1998)
- Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJ. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci.* 74: 935-968 (2004)
- Yu SM, Kuo SC. Vasorelaxant effect of isoliquiritigenin, a novel soluble guanylate cyclase activator, in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1587-1594 (1995)
- Tawata M, Aida K, Noguchi T, Ozaki Y, Kume S, Sasaki H, Chin M, Onaya T. Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur. J. Pharmacol.* 212: 87-92 (1992)
- Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 1439-1442 (1992)
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17: 1-14 (2005)
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145 (2001)
- O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol.* 25: 687-693 (2004)
- Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: Differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol. Interv.* 3: 466-477 (2003)
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 1143: 1-20 (2008)
- Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol. Rep.* 13: 559-583 (2005)
- Naesdal J, Brown K. NSAID-associated adverse effects and acid control aids to prevent them: A review of current treatment options. *Drug Safety* 29: 119-132 (2006)
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.

- Nat. Rev. Cancer 3: 768-780 (2003)
19. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* 72: 62-69 (2006)
 20. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175: 3339-3346 (2005)
 21. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* 72: 850-859 (2006)
 22. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 350: 866-871 (2006)
 23. Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3404-3409 (2001)
 24. Siedle B, Garcia-Pineros AJ, Murillo R, Schulte-Monting J, Castro V, Rungeler P, Klaas CA, Da Costa FB, Kisiel W, Merfort I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *J. Med. Chem.* 47: 6042-6054 (2004)
 25. Na HK, Surh YJ. Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: a novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection. *Mol. Carcinogen.* 45: 368-380 (2006)
 26. Rungeler P, Castro V, Mora G, Goren N, Vichnewski W, Pahl HL, Merfort I, Schmidt TJ. Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: A proposed molecular mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2343-2352 (1999)
 27. Garcia-Pineros AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J. Biol. Chem.* 276: 39713-39720 (2001)
 28. Youn HS, Lee JK, Choi YJ, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH, Lee JY. Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization. *Biochem. Pharmacol.* 75: 494-502 (2008)
 29. Kumar S, Sharma A, Madan B, Singhal V, Ghosh B. Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 73: 1602-1612 (2007)
 30. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappaB activation. *Nat. Immunol.* 5: 503-507 (2004)