

# 복강 대식세포에서 피페린의 일산화질소, 인테루킨-10과 인테루킨-12의 억제 효과

배기상 · 이주성<sup>1</sup> · 성강경<sup>1</sup> · 박성주\*

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 심계내과학교실

## Inhibitory Effects of Piperine on the Production of Nitric Oxide, Interleukin-10 and Interleukine-12 in Murine Peritoneal Macrophages

Gi Sang Bae, Ju Sung Lee<sup>1</sup>, Kang Keyng Sung<sup>1</sup>, Sung Joo Park\*

Department of Herbology, 1: Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects and cellular mechanism of piperine on murine peritoneal macrophages. To evaluate the effects of piperine, we examined the production of nitric oxide (NO), interleukin (IL)-10 and IL-12. To investigate inhibitory mechanism of piperine, we examined the MAPKs and Iκ-Bα in murine peritoneal macrophages. Piperine itself does not have any cytotoxic effect and reduced lipopolysaccharid (LPS), Poly(I:C), CpG-ODN -induced production of NO, IL-10 and IL-12 in peritoneal macrophages. Piperine inhibited the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK 1/2) not the activation of p38 and the degradation of inhibitory kappa B α (Iκ-Bα) in the LPS-stimulated murine peritoneal macrophages. In conclusion, Piperine down-regulated LPS-induced production of NO, IL-10 and IL-12, which could provide a clinical basis for anti-inflammatory properties of piperine.

Key words : piperine, toll like receptor, inflammation, interleukin

### 서 론

Piperine은 후추과 (Piperaceae)에 속한 black pepper (*Piper nigrum*) and long pepper (*Piper longum*), 후추, 필발 (*Piper longum* Linn)과 필발의 근연 식물의 주성분으로 예전부터 건위제 등으로 사용되어 왔던 알칼로이드이다<sup>1</sup>. 피페린은 항우울제, 간보호작용, 항감상선제, 면역조절자, 항암제로서 많이 알려져 있다<sup>2</sup>. 또한 피페린은 lipopolysaccharid (LPS)으로 유도한 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor-α (TNF-α)를 억제하여 항염증 작용을 하는 것도 알려져 있다<sup>3-5</sup>.

선천성 면역 체계는 병원체 침입의 1차적 방어역할을 수행한다<sup>6</sup>. 선천성 면역반응의 활성화는 림프구의 활성화에 중요한 역할을 하며 감염된 기관을 치료한다. 그러나 면역반응이 지나치게 되면 염증성 장염이나 다발성 경화증, 류머티즘과 같은 자가

면역 질환을 야기할 수 있고 나아가 endotoxin shock과 같은 극심한 면역 부작용을 야기한다<sup>7</sup>. 따라서 적정수준에서의 염증 반응과 항염 반응의 항상성은 필수적이다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발 시킨다<sup>8</sup>.

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다<sup>9</sup>. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 lipopolysaccharide (LPS)로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다<sup>9,12</sup>. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다.

또한 활성화된 대식 세포에서는 interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-10, IL-12 와 TNF-α와 같은 pro-inflammatory cytokine과 prostaglandin E2 (PGE2) 등을 생산하게 된다<sup>13,14</sup>. IL-10은 선천

\* 교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : parksj08@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6844

· 접수 : 2009/03/15 · 수정 : 2009/03/31 · 채택 : 2009/04/10

성 면역 체계에서 싸이토 카인의 분비에 중요한 역할을 하며, 음성적 피드백을 조절하는 중요한 인자이다. IL-12는 후천성 면역 체계에서 Th1세포가 대식세포를 성숙시키는데 중요한 역할을 한다. 염증 매개 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6, IL-10, IL-12와 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 밝혀낸다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다<sup>15,16</sup>.

이에 피페린이 TLR의 리간드로 유독한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 LPS (TLR4), Poly(I:C) (TLR3), CpG-ODN (TLR9)로 자극하여 NO, 전염증성 사이토카인(IL-10, IL-12)의 발현을 실험하였고, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) 및 p38에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 inhibitory kappa - B ( $\text{I}\kappa\text{-B}$ )를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

피페린은 sigma aldrich에서 구입하였다. 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 $\kappa$ -B, anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-mouse IL-10, IL-12 antibodies, 재조합 IL-10, IL-12는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

### 2. MTT 분석

복강 대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서  $2 \times 10^5$ /well의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 뒤 1 mg/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 (pH 4.7)을 첨가함으로써 용해했다. 그리고 계속해서 24시간 동안 배양하였다. formazan의 양은 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

### 3. 일산화질소 (Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알라닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한

다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설페닐아미드, 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 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100  $\mu\text{l}$ 의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100  $\mu\text{l}$ 씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터(MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

### 4. Cytokine (IL-10, IL-12) 측정

LPS (500 ng/ml), Poly(I:C) (50 mg/ml), CpG-ODN (10 mg/ml)로 복강 대식 세포를 자극하기 전 피페린을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml), Poly(I:C) (50 mg/ml), CpG-ODN (10 mg/ml)로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

### 5. Western blot analysis

복강 대식 세포를 60 mm culture dish에  $5 \times 10^6$  cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 피페린 (10 mM)으로 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml), Poly(I:C) (50 mg/ml), CpG-ODN (10 mg/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별(0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5000 rpm, 5 min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer(lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10  $\mu\text{l}$  + protease inhibitor 10  $\mu\text{l}$ )를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일량의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2 hrs blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I $\kappa$ -B를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

### 6. 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에서 구입하여 사용하였다.

### 7. 통계처리

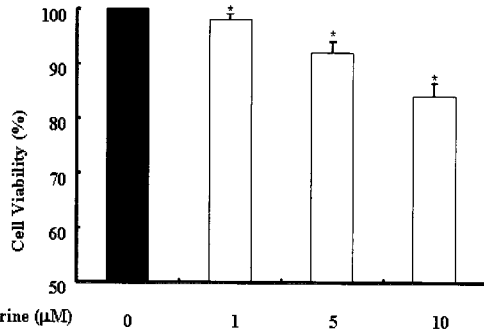
실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 피페린의 복강 대식세포에 대한 독성

피페린의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 murine peritoneal macrophage에 피페린을 농도 의존적으로 처리하여

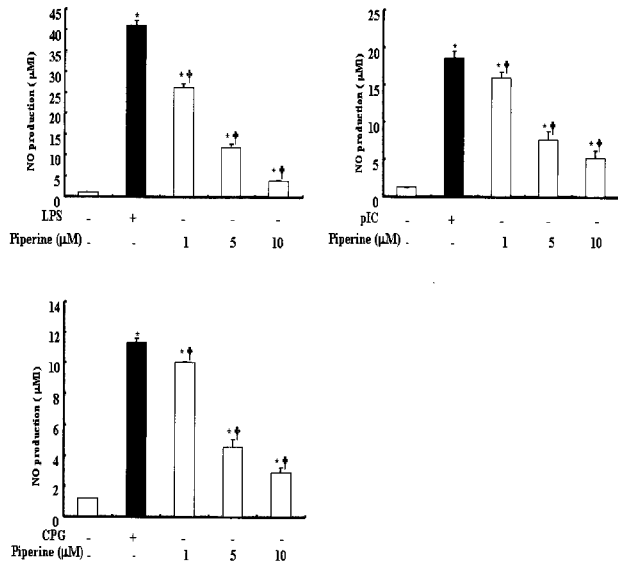
24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 피페린은 복강 대식 세포에 독성을 나타내지 않았다.



**Fig. 1. The effect of Piperine on cytotoxicity on murine peritoneal macrophages.** Murine peritoneal macrophages were incubated with piperine at indicated dose. After 24 hrs, The cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment.\*P < 0.05 vs. saline treatment.

2. 피페린이 NO 생성에 미치는 영향

피페린이 항염효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 TLR3 (Poly(I:C)), TLR4 (LPS), TLR9 (CpG-ODN)의 리간드를 복강대식세포에서 자극하여 피페린이 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 피페린을 다양한 농도로 전 처리하고 LPS, Poly(I:C), CpG-ODN로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정 한 결과 LPS, Poly(I:C), CpG-ODN로 자극한 대조군에 비해 피페린을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

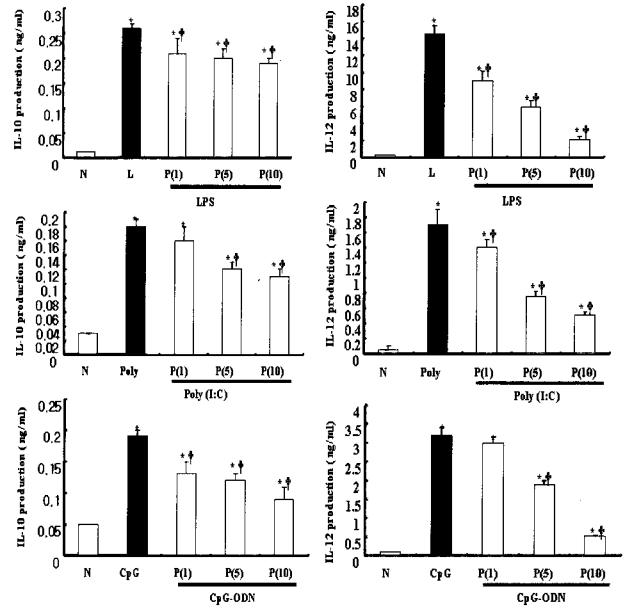


**Fig. 2. Inhibition of LPS, Poly(I:C), CpG-ODN-induced NO production by piperine.** The cells were treated with piperine at indicated concentration for 1 hr, and then incubated with or without LPS, Poly(I:C), CpG-ODN for 24 hrs. NO release was measured by the method of Griess. \*P < 0.05 vs. saline treatment; † P < 0.05 vs. stimulator(LPS/Poly(I:C)/CpG-ODN) treatment alone.

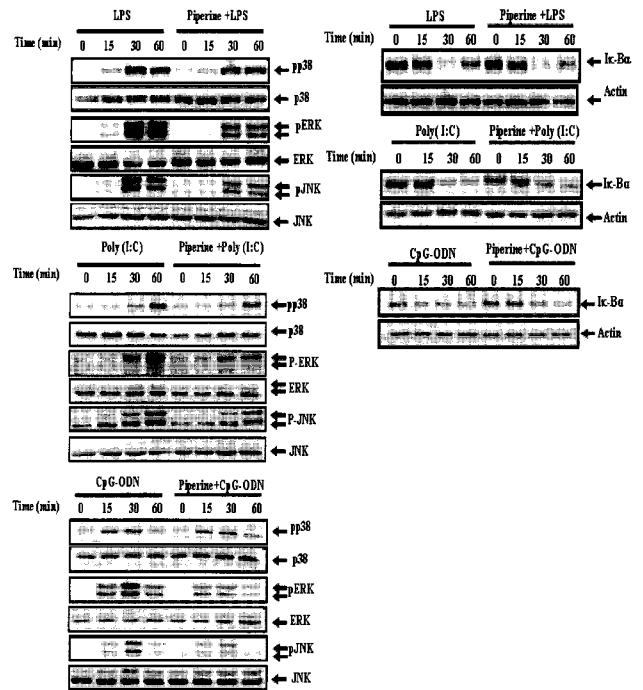
3. 피페린이 IL-10, IL-12 발현에 대한 영향

피페린이 복강 대식 세포에서 전염증성 인자들에 대한 영향

을 조사하기 위하여 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 피페린을 전처리한 후 LPS, Poly(I:C), CpG-ODN으로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-10, IL-12를 측정 한 결과 피페린이 염증성 세포활성물질들을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).



**Fig. 3. Effect of piperine on the productions of IL-10, IL-12 in murine peritoneal macrophages.** The cells were pre-treated piperine at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without LPS, Poly(I:C), CpG-ODN for 24 hrs. Detail methods were described Materials and Methods.\*P < 0.05 vs. saline treatment; † P < 0.05 vs. stimulator (LPS/Poly(I:C)/CpG-ODN) treatment alone.



**Fig. 4. Effects of Piperine on the expression of Ik-Bα degradation and MAP kinase activity in murine peritoneal macrophages.** The cells were pre-treated with piperine at indicated concentrations for 1h, and then incubated with LPS, Poly(I:C), CpG-ODN for indicated time. Detail methods were described Materials and Methods.

#### 4. 피페린에 의한 MAPKs와 Iκ-Bα의 발현

MAPKs는 세포활성물질의 생성 조절 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다<sup>21</sup>). LPS, Poly(I:C), CpG-ODN으로 자극된 복강 대식세포에서는 p38, ERK, JNK의 활성이 증가 하지만, 피페린을 전처리 했을 경우에 ERK, JNK의 활성이 억제되고 p38의 활성은 억제하지 못했다(Fig. 4). LPS는 NF-κB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 또한 NF-κB의 활성은 Iκ-Bα의 분해에 의존하게 된다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 피페린은 LPS에 의한 Iκ-Bα의 분해를 억제하지 못하고 있다.

### 고찰

피페린은 후추과에 속하는 후추와 필발의 주성분으로, 과실을 채취하여 말린 후 향신료와 구충제로 많이 사용된다. 주로 인도에서 재배되어 왔으며, 근래에는 동아시아, 아프리카에서도 재배되고 있다. 녹색 잎과 작은 꽃을 가진 것이 후추열매에서 98% 이상의 순도로 추출이 가능하다. 피페린은 약물 대사 능력조절<sup>17</sup>과 생물학적 이용도를 높이는 데 사용하고 있다<sup>18</sup>). 피페린은 rat의 부종 모델에서<sup>19</sup> 항염증작용과 면역조절자로서는 알려져 있으나<sup>2,3</sup>) 그 자세한 기전은 알려져 있지 않다. Rat의 부종 모델에서 보면 염증을 전염증성 사이토카인의 유발을 촉진했다. 하지만 이 논문에서는 피페린이 LPS, Poly(I:C), CpG-ODN으로 유도된 염증 상황에서 NO, IL-10, IL-12를 억제하고 ERK와 JNK를 경우함을 알아냈다.

Toll-like receptor (TLR)은 선천성 면역에서 중요한 역할을 하는 단백질이며 pattern recognition receptor (PRR)의 한 종류이기도 하다. 주세포가 구별 가능한 병원체를 인식하여, 신호 전달에 중요한 역할을 한다<sup>20</sup>). 이, 실험에서는 TLR의 리간드인 TLR3 (Poly(I:C)), TLR4 (LPS), TLR9 (CpG-ODN)를 이용하여 피페린이 면역 작용에 있어서 신호 전달 기전을 알아보았다.

병원체 침입 후 TLR을 통해 인식이 되면 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다<sup>21,22</sup>). 피페린은 이 논문에서 염증성 사이토카인인 IL-10, IL-12를 억제하였다.

TLR의 ligand 자극에 의하여 현저하게 영향받는 대식세포 신호전달 분자로는 serine/threonine kinase로써 세포밖 신호를 핵내로 전달하게 하는 MAPK 있다. LPS에 의하여 활성화되는 MAP kinase로는 ERK 1/2, p38, JNK 1/2등이 있고 LPS에 의해 분비된 TNF-α에 의해서 NF-κB 유전자가 전사를 위한 활성화가 되어서 nitrile 및 superoxide anion 등의 free radicals이 생성된다<sup>23-26</sup>). 피페린은 Iκ-Bα의 분해와 p38의 인산화를 억제하지 못했지만, ERK 1/2와 JNK 1/2를 억제 하였다.

이러한 실험 결과들로 보아 피페린이 대식세포에서 ERK 1/2와 JNK 1/2를 억제하여 전염증성 cytokine 들의 발현을 억제 하며, NO의 생산을 억제하였다고 생각된다. 피페린의 이와 같은 작용은 소화기 염증 등에 효과적일 것이라고 생각되어진다.

### 결론

복강 대식 세포를 LPS, Poly(I:C), CpG-ODN으로 자극하여 염증상태를 유발하였다. 피페린은 염증 작용에서 농도 의존적으로 NO, IL-10과 IL-12 생산을 현저하게 억제하였고 자체적인 세포 독성은 없었다. 피페린의 항염증 작용의 기전을 알아보기 위해 MAPKs를 조사하여본 결과 피페린 처리시 ERK 1/2, JNK의 인산화는 억제되었지만, p38의 인산화와 IκB-α의 분해를 억제하지 못했다. 이와 같은 결과로 보아 피페린은 ERK와 JNK의 인산화를 억제함으로써 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제하여서, 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

### 감사의 글

이 연구는 Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2006-331-20084) 에 의해 수행되었습니다.

### 참고문헌

1. Singh, Y.N. Kava as over review. J. Ethnopharmacol. 37: 18-45, 1992.
2. Srinivasan, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47(8):735-748, 2007.
3. Pradeep, C.R., Kuttan, G. Effect of Piperine on the Inhibition of Nitric Oxide (NO) and TNF-α Production. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 25(3):337-346, 2003.
4. Kumar, S., Singhal, V., Roshan, R., Sharma, A. Rembhokar GW. Ghosh B. Piperine inhibits TNF-α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-κB and IκB kinase activation. Eur. J. Pharmacol. 575(1-3):177-186, 2007.
5. Pradeep, C.R., Kuttan, G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-κB (NF-κB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int. Immunopharmacol. 4(14):1795-1803, 2004.
6. Charles, A. Janeway, Jr. Ruslan Medzhitov. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216, 2002.
7. Lopez-Bojorques, L.N., Dehesa, A.Z., Reyes-Teran, G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. Arch. Med. Res. 35: 465-479, 2004.
8. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell 78: 915-918, 1994.
9. 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.* 28: 217-226, 2000.
10. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406: 301-309, 2000.
  11. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. 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.* 35: 21-28, 2000.
  12. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 69: 625-635, 2001.
  13. Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 176(6):3635-3641, 2006.
  14. Hirohashi, N., Morrison, D.C. Low-dose lipopolysaccharid (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun* 64(3):1011, 1996.
  15. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I. and Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* 11: 1995-2000, 2003.
  16. Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2):93-103, 2004.
  17. Atal, C.K., Dubey, R.K., Singh, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(1):258-262, 1985.
  18. Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 64(4):353-356, 1998.
  19. Mujumdar, A.M., Dhuley, J.N., Deshmukh, V.K., Raman, P.H., Naik, S.R. Anti-inflammatory activity of piperine. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 43(3):95-100, 1999.
  20. Hansson, G.K., Edwards, K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(6):1085-1087, 2005.
  21. 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.* 366: 376-382, 2002.
  22. Binetruy, B., Smeal, T., Kariu, M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351: 122-127, 1991.
  23. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 211-218, 1999.
  24. Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H., Kim, K.H. 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.* 84: 49-62, 2004.
  25. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase. TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by suchinone effects on I $\kappa$ -Ba phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J. Pharmacol.* 139: 11-20, 2003.
  26. Meng, F., Lowell, C.A. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 185(9):1661, 1997.