Journal of Life Science 2009 Vol. 19. No. 7. 949~955 ©JLS / ISSN 1225-9918

B형 트리코테센 곰팡이 독소 데옥시니발레놀에 의한 인체 장관 상피세포 염증성 인터루킨 8 유도에서의 PKR과 EGR-1의 상호 역할 규명

박성환 · 양현 · 최혜진 · 박영민 · 안순철 · 김관회 · 이수형[1] · 안정훈[2] · 정덕화[3] · 문유석*

부산대학교 의학전문대학원 의과학과 및 의학연구소, [1]농촌진흥청 농산물안전성부, [2]한국과학영재학교, [3]경상대학교 식품공학과

Received April 8, 2009 / Accepted May 25, 2009

Role of PKR and EGR-1 in Induction of Interleukin-8 by Type B Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol in the Human Intestinal Epithelial Cells. Seong-Hwan Park, Hyun Yang, Hye-Jin Choi, Yeong-Min Park, Soon Cheol Ahn, Kwan Hoi Kim, Soo Hyung Lee[1], Jung Hoon Ahn[2], Duk-Hwa Chung[3] and Yuseok Moon*. *Department of Medical Sciences, Medical Research Institute, Pusan National University School of Medicine. Yangsan, Kyungnam, Korea, [1]Microbial Safety Division, Department of Crop Life Safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, Korea, [2]Korea Science Academy, Busan, Korea, [3]Division of Applied Life Science, Graduate School of Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam, Korea* - Mucosal epithelia sense external stress signals and transmit them to the intracellular cascade responses. Ribotoxic stress-producing chemicals such as deoxynivalenol (DON) or other trichothecene mycotoxins have been linked with gastrointestinal inflammatory diseases by *Fusarium*-contamination. The purpose of this study was to test the hypothesis that DON evokes the epithelial sentinel signals of RNA-dependent protein kinase (PKR) and early growth response gene 1 (EGR-1), which together contribute to the pro-inflammatory cytokine interleukin 8 (IL-8) in human intestinal epithelial cells. PKR suppression by the dominant negative PKR expression attenuated DON-stimulated interleukin-8 production. Moreover, IL-8 transcriptional activation by DON was also reduced by PKR inhibition in the human intestinal epithelial cells. Treatment with the PKR inhibitor also suppressed EGR-1 promoter activity, mRNA and protein induction, although mitogen-activated protein (MAP) kinases such as extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) 1/2, p38, c-Jun N-terminal Kinase (JNK) were little affected or even enhanced in presence of a PKR inhibitor. These patterns were also compared in the EGR-1-suppressed cells, which showed much more suppressed production of IL-8. All things taken into consideration, DON-activated sentinel signals of EGR-1 via PKR mediated interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells, which provide insight into the possible general mechanism associated with mucosal inflammation as an intestinal toxic insult by ribotoxic trichothecene mycotoxins.

Key words : Ribotoxic stress, deoxynivalenol, gastrointestinal inflammation, interleukin-8.

서 론

티리코테센 곰팡이독소는 세스터페노이드계 천연물로서 데옥시니발레놀을 대표로하는 진균 대사산물이다. 특히 이들은 리보솜에 결합하여 단백질합성을 억제하는 것으로 알려져 있다[35]. 이러한 리보솜 독소들은 특히 28S 리보솜 RNA peptidlytransferase 활성부위에 결합하여 MAP kinase와 같은 세포내 스트레스 신호도 유발한다[30]. 특히 이들 독소들은 화본과 작물 등에 식물병원균인 *Fusarium graminearum* 이나 *F. culmorum* 에 의해 생산되며, 옥수수, 보리 맥류 등에 심각한 식품위생 상의 문제로 인식되고 있다[21,26,32].

일반적으로 데옥시니발레놀의 저농도 노출 시 체중감고, 거식현상이 나타나고, 실험동물에서, 구토와 백혈구감소 등을 발견할 수 있다[28]. 특히 세포주기가 빠른 상피세포나 염증 면역세포 등이 쉽게 손상을 받으며, 역학적으로 장염 등의 소화기계이상과 데옥시니발레놀 식품 오염의 상관성이 알려져 있다[5,18,27]. 트리코테센 독소중 데옥시니발레놀(DON)은 비교적 독성이 약하나 구토 및 장관염증 독성은 매우 강한 편이다[27,28]. 특히 DON은 상피장벽을 손상하고, 상피세포 분화, 양분 흡수 등의 저해요인으로 작용한다. 특히 염증 유발에 있어 상피세포와 포식구에서의 염증성 사이토카인 분비 능력과 많은 관련성이 알려져 있다[2,7,23,39].

신체는 외부 물리적, 생물학적, 화학적인 환경 스트레스에 대하여 감지 신호를 잘 발달 시켜왔으며, 특히 급격한 급성자극은 초기에 활성화되는 신호 예를 들어 상피세포에서의 MAP kinase 신호나 early growth response gene 1 (EGR-1) 등에 의해 세포 내 대응 반응에 관련된 생리작용을 활성화시킨다[6,37]. 일반적으로 EGR-1은 세포내외의 급성자극에 의해 초기에 유도되는 단백질로서 knox24, zif268, Tis8라고

*Corresponding author
Tel : +82-51-240-7711, Fax : +82-51-243-2259
E-mail : moon@pusan.ac.kr

도 하는 Cys2-His2-형의 zinc-finger 전사인자이다. 특히 이는 염증, 세포분화, 성장 조직 재생, 발달 등의 단계에도 관여하는 다기능성 단백질이다[15,25]. 소화기내 점막손상은 다양한 형태의 염증성 자극을 유발하는데 특히 사이토카인 및 세포성장 인자, 전사인자 등에 의해 조절 되며 이 과정에서 MAP kinase signaling cascade 및 그 하위 표적신호들이 잘 연구 되어 왔다[8,33,37]. MAP kinase 또한 사이토카인 생성에도 관여하는 EGR-1 단백질의 발현도 조절한다.

이중나선 RNA (dsRNA) 의존형 단백질 kinase R (RNA-dependent protein kinase, PKR)은 조직에서 흔하게 발현되는 serine/threonine계 인산화 효소로서 인터페론, dsRNA, 스트레스신호 등에 의해 활성화 된다[3,34,36]. 특히 이는 세포의 증식, 분화, 세포사멸 및 전사조절 등에 중요한 역할을 한다. 진핵 전사개시인자 2의 subunit (eIF2 alpha)은 PKR의 주요한 기질이 된다. PKR에 의한 eIF2 alpha의 Ser51 에서의 인산화는 단백질 합성을 억제하며, 세포성장의 억제를 유도한다. 특히 단백질 합성 저해제에 의하여 PKR 또한 활성화되며 데옥시니발레놀 또한 이에 의하여 스트레스 신호와 포식구에서 사이토카인의 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다[11,19,29].

본 연구는 장관 상피세포에서 리보솜 독소 데옥시니발레놀에 의한 스트레스 신호로서의 PKR의 활성화와 그 하부 신호로서의 주요 전사인자인 EGR-1의 유전자 발현이 염증성 사이토카인 인터루킨 8의 유전자 조절에 핵심적인 역할을 하는 것을 밝히고자 한다. 이를 통해 진균 독소인 데옥시니발레놀의 점막 상피 조직에서의 병리기전을 세포모델을 통하여 밝히며 향후 진균 독소에 의한 장염 유발 등의 손상 및 회복, 치료에 대한 분자적인 기전으로 향후 제공하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양, 유전자 및 시약

HCT-8 및 intestine-407 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하여 Royal Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지에 5% CO_2 humidified incubator at 37도에서 배양하였다. 세포수와 생존활성(viability)은 tryphan blue (Sigma)을 이용해서 hemacytometer 상에서 측정하였다. 화합물 노출 실험 중에는 혈청이 없는 배지를 이용하였다. 저해제 등은 Calbiochem (EMD biosciences, Inc. La Jolla, CA, USA)에서 구매하였다.

Western analysis

Cell lysate는 RIPA buffer (1x PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 mg/ml phenyl methane sulphonyl fluoride (PMSF), 1 mM, sodium orthovanadate, 단백질 저해제 칵테일)로 준비하고 2-3초의 초음파 분쇄 후 lysate 단백질은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용해서 정량하였다. 각각 50 mg 단백질을 소형 전기영동기를 이용해서 분리한 후 단백질을 Polyvinylidene Fluoride (PVDF) membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 이동하였다. 블롯은 1시간 동안 5% skim milk Tris-buffered saline Tween 0.05% (TBST) 로 blocking 후 각각의 일차항체로 2시간 상온에서 반응 후 3회 TBST로 세척 후 horseradish-conjugated secondary antibody로 1시간 상온 반응 후 3회 세척 후 ECL Chemiluminescent substrate (Amersham Pharmacia Biotech)로 발색 현상하였다. 각 일차항체는 토끼 polyclonal anti-human Actin antibody (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 토끼 polyclonal anti-p-MAPKs, anti-EGR-1 항체(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다.

Transient / stable transfection

세포는 Trans-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI, USA)를 이용해서 제조자 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. Luciferase reporter gene의 transfection을 위해서 각 well 당 1.5 mg firefly luciferase reporter plasmid와 0.15 mg renilla luciferase, pRL-null vector (Promega, Madison, WI, USA)를 4.5 ml Trans-LT1 reagent에 혼합 하여 6 well culture plate에 처리 하였다. Transfection후 24시간 뒤 세포는 화합물에 24시간 노출하였다. Firefly와 대조구인 renilla luciferase를 동시에 transfection 하는 Dual-luciferase reporter assay system (Promega)을 이용해서 정량하였다. 모든 transfection 효율은 50내지 60% 정도를 유지하였고 이 효율은 pMX enhanced GFP vector를 이용해서 transfection 후 동시에 확인하였다. pSilence 벡터에 GTTACTACCTCTTATCCA 타겟으로 하는 shRNA를 삽입하여 제조하였다. 대조구 벡터와 pSiEGR1을 세포주에 transfection 하여 stable cell lines을 추가로 만들기 위하여 48시간 뒤 1,000 mg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad. CA, USA)로서 선별을 가하였다. 선별은 콜로니가 형성 될 때까지 하며 안정된 발현 세포주는 500 mg/ml G418의 일반배양액에서 유지한다.

Luciferase assay

세포는 차가운 PBS로 세척 후 수동 분해 버퍼(Promega)로 분해물을 준비하였다. 12,000 g에서 4 분간 원심분리 후 상층 효소액을 assay에 이용하였다. 상층액은 이후 실험을 위해서 -80°C에 보관하였다. Luciferase activity는 dual-mode luminometer (Model TD-20/20, Turner Designs Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용해서 측정하였다. Firefly luciferase activity은 *renilla* luciferase activity에 대해서 일반화 하였고 활성은 다음의 상대치로 표시하였다(*firefly* luciferase activity / *re-*

*nilla*luciferase activity).

ELISA

세포 배양액으로부터 IL-8의 농도를 측정하기 위하여 ELISA법을 이용하였다. 24 well plate에 세포를 배양하여 각각의 시료를 처리한 후 배양액을 회수하고 OptEIA 인체 IL-8 ELISA set (BD biosciences)을 이용하여 세포로부터 분비된 IL8을 측정하였다. 완충액으로 항체를 희석하여 96 well plate에 하룻밤 동안 정치시켜 항체를 흡착 시켰다. 이어서 세척용 완충액으로 3회 세척한 후 3% bovine serum albumin (BSA) 용액으로 빈자리를 봉쇄하였다. 여기에 세포 배양액과 항체-효소 접합체를 2시간 동안 순서대로 가하여 반응 시킨 다음 기질인 TMB와 과산화수소액을 가하여 30분간 발색시켰다. 이어서 6 N 염산액으로 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA는 RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 통해서 분리하였다. 추출된 RNA (100 ng)을 역전사효소를 이용해서 cDNA로 전환하였다. 유전자 증폭은 HOT START ExTaq DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 이용하여 *Mycycler* Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에서 아래의 조건에서 시행하였다. 즉, 94도에서 2분 및 denaturation (98도, 10초), annealing (59도, 30초), elongation (72도, 45초)에서 25회를 실시하였다. PCR product는 1.2% (w/v) agarose 젤에서 확인하였다.

통계처리

데이타는 Sigma Stat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA)를 이용해서 분석하였다. 두 그룹의 데이터 비교는 Student's *t* test를 하였고, multiple groups 비교는 ANOVA를 실시한다.

결과 및 고찰

DON에 의한 IL8의 생성과 PKR저해의 영향

DON을 일반 대조구 세포와 dominant negative PKR (dnPKR) 발현 세포주에 처리 시 IL-8 ELISA assay 결과에서 일반 대조구 세포에서는 대조구세포주에는 IL-8의 생산이 DON 250 ng/ml, 500 ng/ml을 처리 했을 때 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었고, 반면 dnPKR 세포주에서는 IL-8의 발현이 DON 처리 했을 때 생산이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1A). 그리고 IL-8 promoter assay 결과에서는 대조구 세포주 DON (0, 250 ng/ml, 500 ng/ml)을 처리했을 때 IL-8 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고

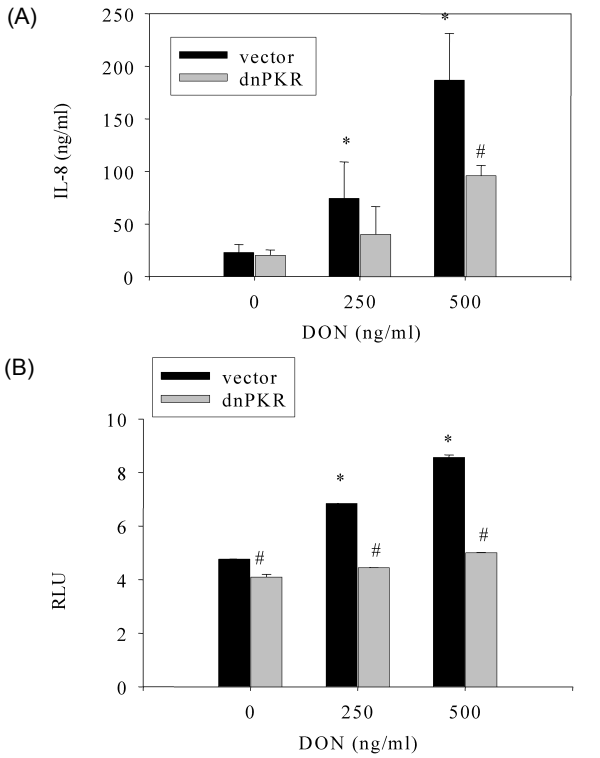

Fig. 1. Analysis of IL-8 secretion and expression. (A) HCT-8 cells were treated with DON for 12 hr and culture supernatant was analyzed for the human IL-8 secretion using ELISA. (B) Cells were co-transfected with IL-8 promoter luciferase plasmid plus pRL-null vector for 18 hr and then treated with each combination of chemicals for another 9 hr. Data are mean SD (n=4). Group with asterisk are significantly different ($p<0.05$) from the vehicle control group by *Student*'s t test. Bars with # letters are significantly different from control cells ($p<0.05$). Results are representative of three experiments.

dnPKR cell line에서는 IL8 프로모터 활성이 억제 되었다 (Fig. 1B). 또한 최근의 본 연구실의 연구 결과에서 DON에 의한 IL-8의 생성이 상피세포에서 초기전사인자의 하나인 EGR-1이 매우 핵심적인 역할을 하는 것을 규명하였으며[24], 특히 본 연구에서 PKR에 의해 또한 EGR-1의 생성이 조절되는지를 확인하기 위하여 PKR 저해제(Calbiochem 카탈로그 번호, 527450)를 처리시 500 ng/ml DON에 의한 EGR-1의 전사활성화가 급격하게 억제되었다(Fig. 2). 따라서, PKR 신호 전달 체계는 IL-8의 전사 활성뿐 만 아니라 IL-8의 발현에 중요한 EGR-1의 조절에도 기여하고 있다.

DON에 의한 IL-8 유전자 발현에 있어서의 PKR/EGR-1의 상호작용의 역할

다양한 보고에서 세포 내 스트레스 감지 신호 전달 체계로서 매우 중요한 MAP kinase가 리보솜 독소자극에 의한 사이토카인 생성에서 매우 중요한 역할을 하는 것이 보고 되고

PKR 저해제를 처리한 세포와 처리를 하지 않은 세포 사이의 발현양의 차이를 확연히 보이지만, pSiEGR1 발현 세포주에서는 발현양의 차이가 없음을 확인하였다. 결론적으로 EGR-1은 리보솜 독소에 의한 IL-8유도에서 매우 핵심적인 역할을 하였으며, 또한 IL-8의 유도현상에는 부분적으로 PKR 신호가 관여되며, PKR 에 의해 조절 받는 하부 신호에는 EGR-1이 또한 핵심적인 역할을 한다.

본 연구에서 알 수 있듯이 EGR-1이 IL-8의 생성에서 매우 주요한 역할을 하며 또한 점막상피에서 조직 재생 회복에도 핵심적인 역할을 한다[8]. EGR-1의 장관 조직 염증 손상 후 재생에서 면역 염증구를 유도하는 데 주요한 기능을 하며 특히 EGR-1에 의한 사이토 카인 조절 능력이 보고 되며 이를 증명하고 있다[9,10,12,22]. 사실상 리보솜 독성 반응에서의 염증 사이토카인 유도에는 많이 알려진 ERK1/2, JNK과 p38 MAP kinase 신호의 조합이 또한 주요한 역할을 할 것으로 사료 된다[14,16](Fig. 5). 예를 들어 ribotoxin인 UVB light와 palytoxinare은 peptidyl transferase 활성를 저해하고 ribosomal RNA 에 손상을 가하며 이는 특히 ERK1/2 신호의 변화를 수반하고 Palytoxin은 JNK와 p38 kinase를 활성화 한다[13]. 최근의 연구에서는 소포체 포함의 독성 반응이 염증성 장질환과의 관련성이 보고되고 있다[4,31]. 또한 EGR-1은 NF-kappaB 발현 등의 염증성 전사인자에도 영향을 미친다[1,20,38]. NF-kappa B이외에도 IL-8생산에서 주요한 AP-1도 EGR-1에 의해 항진되는 신호이다[17]. 따라서 EGR-1이 염증성 전사인자들과의 상호 협조를 통하여 IL-8의 유전자를 조절할 수 있다. 향후 DON에 의해 항진되는 염증성 사이토카인의 발현에 있어 좀 더 명확한 EGR-1에 의해 조절되는 기전적인 분석연구가 요구 된다.

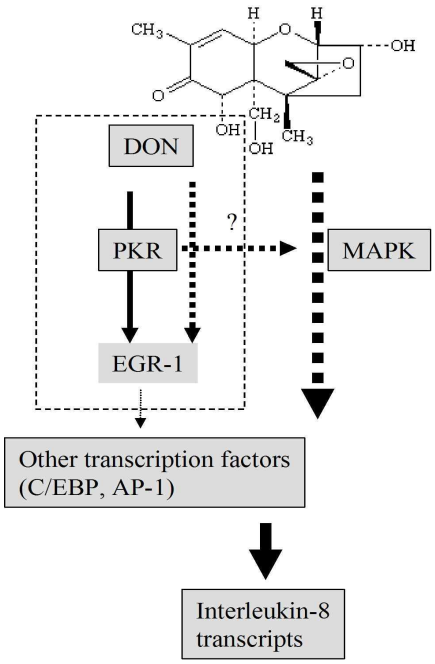

Fig. 5. Schematic diagram for functionality of PKR-EGR-1 in DON-mediated IL-8 expression in the human intestinal epithelial cells.

요 약

점막 상피는 외부 인자를 감지하는 최전선의 인식부위로서 외부스트레스 자극을 하부의 반응 신호로 전달하는 주요 세포이다. 리보솜독성 반응을 유발하는 데옥시니발레놀(DON) 및 그 관련 곰팡이 독소는 푸자륨 곰팡이 오염에 의한 식중독성 소화기 염증성 질환과의 연관성이 알려 져 있다. 본 연구의 목적은 DON이 상피세포 감지 신호 전달 분자로서 PKR과 EGR-1이 관련 되고 이들이 상피세포에서의 염증성 사이토카인 인터루킨 8의 생성에 관련 된다는 가정 하에서 연구를 수행 하였다. PKR 발현의 세포내 작용 억제는 DON에 의해 유도되는 인터루킨 8의 생성을 감소시켰다. 또한 DON에 의한 IL-8 전사 활성화는 PKR 억제에 의하여 장관 상피세포에서 감소하였다. PKR 저해제의 처리는 EGR-1 promoter 활성, mRNA, 단백질 유도 등을 감소를 유발하였으며 MAP kinase (ERK1/2, p38, JNK)는 변화가 적거나 오히려 PKR 저해제의 전처리에 의하여 항진 되었다. 결론적으로 DON에 의해 자극된 감지신호인 EGR-1은 자체적으로 또는 PKR 신호를 경유하여 인터루킨8의 생산을 항진하는데 주요한 기능을 하였다. 이를 통하여 향후 리보솜 독성 반응과 관련된 소화기 염증유발의 주요한 기전을 제공하고 있다.

감사의 글

본 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Ahmed, M. M., S. F. Sells, K. Venkatasubbarao, S. M. Fruitwala, S. Muthukkumar, C. Harp, M. Mohiuddin, and V. M. Rangnekar. 1997. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 33056-33061.
2. Azcona-Olivera, J. I., Y. Ouyang, J. Murtha, F. S. Chu, and J. J. Pestka. 1995. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 109-120.
3. Bennett, R. L., W. L. Blalock, D. M. Abtahi, Y. Pan, S. A. Moyer, and W. S. May. 2006. RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection. *Blood* **108**, 821-829.
4. Bertolotti, A., X. Wang, I. Novoa, R. Jungreis, K. Schlessinger, J. H. Cho, A. B. West, and D. Ron. 2001.

Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **107**, 585-593.
5. Bhat, R. V., S. R. Beedu, Y. Ramakrishna, and K. L. Munshi. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet* **1**, 35-37.
6. Braddock, M. 2001. The transcription factor Egr-1: a potential drug in wound healing and tissue repair. *Ann. Med.* **33**, 313-318.
7. Chung, Y. J., G. H. Yang, Z. Islam, and J. J. Pestka. 2003. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-2 and complement 3A receptor by the trichothecenes deoxynivalenol and satratoxin G. *Toxicology* **186**, 51-65.
8. Dieckgraefe, B. K. and D. M. Weems. 1999. Epithelial injury induces egr-1 and fos expression by a pathway involving protein kinase C and ERK. *Am. J. Physiol.* **276**, G322-330.
9. Fitzgerald, K. A. and L. A. O'Neill. 1999. Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Egr-1. *J. Immunol.* **162**, 4920-4927.
10. Giri, R. K., S. K. Selvaraj, and V. K. Kalra. 2003. Amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in THP-1 monocytes is blocked by small inhibitory RNA duplexes for early growth response-1 messenger RNA. *J. Immunol.* **170**, 5281-5294.
11. Gray, J. S., H. K. Bae, J. C. Li, A. S. Lau, and J. J. Pestka. 2008. Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates induction of interleukin-8 expression by deoxynivalenol, Shiga toxin 1, and ricin in monocytes. *Toxicol. Sci.* **105**, 322-330.
12. Grotegut, S., D. von Schweinitz, G. Christofori, and F. Lehembre. 2006. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *Embo. J.* **25**, 3534-3545.
13. Iordanov, M. S., R. J. Choi, O. P. Ryabinina, T. H. Dinh, R. K. Bright, and B. E. Magun. 2002. The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5380-5394.
14. Islam, Z., J. S. Gray, and J. J. Pestka. 2006. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates IL-8 induction by the ribotoxin deoxynivalenol in human monocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **213**, 235-244.
15. Khachigian, L. M. and T. Collins. 1997. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ. Res.* **81,** 457-461.
16. Korcheva, V., J. Wong, C. Corless, M. Iordanov, and B. Magun. 2005. Administration of ricin induces a severe inflammatory response via nonredundant stimulation of ERK, JNK, and P38 MAPK and provides a mouse model of hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Pathol.* **166**, 323-339.
17. Levkovitz, Y. and J. M. Baraban. 2002. A dominant negative Egr inhibitor blocks nerve growth factor-induced neurite outgrowth by suppressing c-Jun activation: role of an Egr/c-Jun complex. *J. Neurosci.* **22**, 3845-3854.
18. Li, F. Q., Y. W. Li, X. Y. Luo, and T. Yoshizawa. 2002. Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. *Food Addit. Contam.* **19**, 163-167.
19. Li, M., J. R. Harkema, C. F. Cuff, and J. J. Pestka. 2007. Deoxynivalenol exacerbates viral bronchopneumonia induced by respiratory reovirus infection. *Toxicol. Sci.* **95**, 412-426.
20. Milbrandt, J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* **238**, 797-799.
21. Mirocha, C. J., S. V. Pathre, B. Schauerhamer, and C. M. Christensen. 1976. Natural occurrence of Fusarium toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 553-556.
22. Mishra, J. P., S. Mishra, K. Gee, and A. Kumar. 2005. Differential involvement of calmodulin-dependent protein kinase II-activated AP-1 and c-Jun N-terminal kinase-activated EGR-1 signaling pathways in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced CD44 expression in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 26825-26837.
23. Moon, Y. and J. J. Pestka. 2002. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicol. Sci.* **69**, 373-382.
24. Moon, Y., H. Yang, and S. H. Lee. 2007. Modulation of early growth response gene 1 and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 256-262.
25. Murphy, L. O., J. P. MacKeigan, and J. Blenis. 2004. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol. Cell Biol.* **24**, 144-153.
26. Peraica, M. and A. M. Domijan. 2001. Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **52**, 23-35.
27. Pestka, J. J. and A. T. Smolinski. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **8**, 39-69.
28. Rotter, B. A., D. B. Prelusky, and J. J. Pestka. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* **48**, 1-34.
29. Shi, Y. and J. J. Pestka. 2008. Mechanisms for suppression of interleukin-6 expression in peritoneal macrophages from docosahexaenoic acid-fed mice. *J. Nutr. Biochem.* [Epub ahead of print].
30. Shifrin, V. I. and P. Anderson. 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 13985-13992.
31. Shkoda, A., P. A. Ruiz, H. Daniel, S. C. Kim, G. Rogler, R. B. Sartor, and D. Haller. 2007. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* **132**, 190-207.
32. Sudakin, D. L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol. Lett.* **143**, 97-107.

33. Szabo, S., X. Deng, T. Khomenko, M. Yoshida, M. R. Jadus, Z. Sandor, Z. Gombos, and H. Matsumoto. 2001. Gene expression and gene therapy in experimental duodenal ulceration. *J. Physiol. Paris* **95**, 325-335.
34. Tam, C. L., M. Hofbauer, and C. A. Towle. 2007. Requirement for protein kinase R in interleukin-1alpha-stimulated effects in cartilage. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1636-1641.
35. Ueno, Y. 1970. Toxicity and action mechanism of mycotoxin. *Nippon Saikingaku Zasshi* **25**, 420.
36. Vijay-Kumar, M., J. R. Gentsch, W. J. Kaiser, N. Borregaard, M. K. Offermann, A. S. Neish, and A. T. Gewirtz. 2005. Protein kinase R mediates intestinal epithelial gene remodeling in response to double-stranded RNA and live rotavirus. *J. Immunol.* **174**, 6322-6331.
37. Wong, W. M., R. J. Playford, and N. A. Wright. 2000. Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy? *Gut* **46,** 286-292.
38. Yan, S. F., Y. S. Zou, Y. Gao, C. Zhai,N. Mackman, S. L. Lee, J. Milbrandt, D. Pinsky, W. Kisiel, and D. Stern. 1998. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8298-8303.
39. Zhou, H. R., J. R. Harkema, D. Yan, and J. J. Pestka. 1999. Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *J. Toxicol. Environ. Health A* **57**, 115-136.
40. Zhou, H. R., Q. Jia, and J. J. Pestka. 2005. Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kinase Hck. *Toxicol. Sci.* **85**, 916-926.