

길경의 Lipopolysaccharide에 의한 RAW 264.7 세포의 NF- κ B 활성화 및 급성폐손상 저해 작용에 대한 연구

동의대학교 한의과대학 해부학교실, ¹생화학교실 및 한의학연구소

이 준 혁 · 최 영 현¹ · 최 병 태

The Aqueous Extract from *Platycodi radix* Attenuates Lipopolysaccharide-Induced NF- κ B Activation in RAW 264.7 Cell and Acute Lung Injury in Rats

Jun-Hyuk Lee, Yung-Hyun Choi¹ and Byung-Tae Choi

Departments of Anatomy and ¹Biochemistry, Research Institute of Oriental Medicine,
College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Korea

We examined the effects of the aqueous extract from *Platycodi radix* (AEPR), a traditional drug for respiratory inflammation, on the process of lipopolysaccharide (LPS)-induced nuclear factor (NF)- κ Bp65 activation in RAW 264.7 cell and animal model for acute lung injury. Immunoblot analysis showed that the level of NF- κ Bp65 was rapidly up-regulated and inhibitory (I)- κ B α was down-regulated by LPS challenge. While AEPR inhibited an increase of NF- κ Bp65 and degradation of I- κ B α in RAW 264.7 cell, an increase of tumor necrosis factor (TNF)- α activation was observed. The total cells and protein content of the bronchoalveolar lavage fluid by LPS challenge markedly decreased in the AEPR pretreated rats. AEPR pretreatment caused also a decline in neutrophils infiltration into interstitium of the lung. The immunoreaction of NF- κ Bp65, I- κ B α , inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- α was strongly localized at the alveolar and interstitial macrophages, but weak reaction also detected in neutrophils. The decrease of these immunoreactive cells in number were observed in AEPR pretreated rats.

It may be concluded that AEPR attenuates the progress of LPS-induced inflammation by reduction of NF- κ Bp65 activation and neutrophil influx to lung. AEPR would be useful as a therapeutic agent for endotoxin-induced lung disease.

Key Words: *Platycodi radix*, Lipopolysaccharide, Lung, Inflammation, NF- κ Bp65

서 론

염증은 필수적인 숙주방어체계로 lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1을 비롯한 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다.¹⁾ 이 중 LPS는 그램음성균 외막을 구성하는 리포다당질로 다양한 pro-inflammatory cytokines 유도하고 전신적인 fever 및 septic shock에 주된 역할을 한다.^{2,3)}

LPS 자극하에서 염증성 cytokines은 주로 대식세포(macrophages)에서 분비되며, nuclear factor (NF)- κ B는 이들의 primary transcription factor로 알려져 있다.^{4,5)} 정상적인 환경에서 NF- κ B는 모든 유핵세포의 세포질에 p50, p65와 저해인자인 inhibitory(I)- κ B의 결합체로 존재하나 염증성 자극이 주어지면 수분 내에 I- κ B의 인산화 및 분해에 의해 p50과 p65가 핵 속으로 이동하고 염증 유전자의 프로모터에 결합하여 유전자를 활성화시킨다.⁶⁾

NF- κ B에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF- α 등으로, 이들 유전자의 산물은 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키므로 I- κ B 분해 및 NF- κ B활성의 저해는 염증성 반응에 있어 매우 중요한 의미를 가지고 있어 항염증제 개발에서 주요한 표지인자로 여겨지고 있다.⁷⁻¹⁰⁾

길경(桔梗)은 초롱꽃목 초롱꽃과의 도라지 뿌리 껍질을 벗기거나 그대로 말린 것이며, 한방에서는 거담, 해소, 기관지염, 호흡곤란, 편두선염 등 주처방이 염증성 질환 특히 호흡기 질환에 많이 사용되고 있다. 길경에 대한 연구는 이들의 주요 성분인 saponin, 즉 platycodins에 대한 연구가 있으나 생산국 및 생산지와 같은 채집장소에 따른 효능 차이를 보이고 있다.^{11,12)} 따라서 본 실험에서는 길경이 호흡기 질환에서 가장 중요한 작용을 하는 대식세포계에서 NF- κ B활성을 조사하고, 급성폐손상 동물모델에서 항염증작용에 대해 살펴 보았다.

재료 및 방법

1) 길경 수용액의 추출

길경(*Platycodi radix*)은 동의대학교 한의과대학 부속한방병원에서 공급받았으며 100 g의 약재를 증류수 1,000 ml에 넣어 3시간 동안 끓이고, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 0.45 μ m 여과지로 부유성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하였다.

2) 세포 배양 및 길경과 LPS의 처리

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum이 첨가된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, Gibco BRL, USA)을 사용하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 길경은 3 mg/ml의 농도로 성장배지에 희석하여 12시간 동안 전 처리하였으며, LPS는 500 ng/ml로 2시간 동안 처리하였다.

3) SDS-PAGE 및 Immunoblotting

배양세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻은 후, lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS, 0.5% Triton X-100, 1 μ M PMSF, 50 mM NaF, 50 mM Tris pH7.4)로 lysis시켜 원심분리하여 protein extract를 얻었다. Bradford 방법을 이용하여 protein을 정량한 후, 동량의 Laemmlis sample buffer를 가하여 100°C에서 3분간 가열하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel상의 protein을 nitrocellulose membrane으로 transfer하여 skim milk로 blocking하고, Santa Cruz Biotechnology Inc.의 anti-NF- κ Bp65, anti-TNF- α , I- κ B α 와 이에 대한 secondary antibody를 처리하였다. Enhanced chemiluminescence 방법을 이용하여 X-ray film에 감광시켜 특정 protein 변화를 분석하였다.

4) 실험 동물 및 LPS에 의한 급성폐손상

8주된 건강한 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 Taconic & SamYuk Co.로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 길경처리군과 LPS (6 mg/Kg)처리군은 24시간, 8시간, 3시간전에 경구로 길경추출물

(100 mg/Kg) 또는 PBS를 투여한 후 LPS를 복강투여 하였으며 대조군은 동량의 PBS를 처리하였다. LPS 복강투여 후 3시간, 6시간 후에 실험에 사용하였다.

5) 기관지폐포세척의 총세포수 및 단백질양

Ether로 가볍게 마취한 후 후두 및 기관을 노출시킨 후 좌측기관지를 절찰하고 정맥도자를 기관지로 삽입하여 생리식염수 5 ml로 기관지세척을 3회 실시하여 각 세척액을 혼합하였다. 회수한 폐포 세척액을 거즈를 통과시켜 점액을 거른 후 폐포 세척액 내 총세포수를hematocytometer로 측정하고, 총 단백질을 Bradford 방법으로 측정하였다.

6) 조직병리학적 검색

절찰한 좌측 폐를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4°C 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6µm 연속절편을 제작하였다. 폐의 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff's염색을 실시하였다.

7) 면역조직화학적 검색

면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95°C 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 NF-κBp65, I-κBα, iNOS, TNF-α 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200 : 1로 희석하여 4°C 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab., PK-6101)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차 항체대신 10% BSA/PBS을 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

결과 및 고찰

1) 길경에 의한 RAW 264.7세포의 NF-κBp65 발현 억제와 I-κBα 및 TNF-α의 발현 증가

RAW 264.7세포에 LPS를 처리한 결과 NF-κB p65의 발현 증가가 관찰되었으나, 이러한 증가는 길경의 전처리에 의해서 거의 완벽하게 억제되었다. 또한 LPS에 의해 급속도로 분해되는 것으로 알려진 I-κBα의 경우, 길경 단독처리 세포에서 많은 증가를 보였으며, 길경을 전처리하고 LPS를 처리한 세포에서는 LPS 단독의 경우에 비해 분해가 적게 일어나는 것으로 관찰되었다(Fig. 1A and B).

NF-κBp65의 경우, 자극이 없을 시에는 세포질에 존재하다 LPS 등과 같은 염증성 자극에 의해 활성화되면 핵 속으로 이동하여 여러 염증관련 인자들의 발현을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

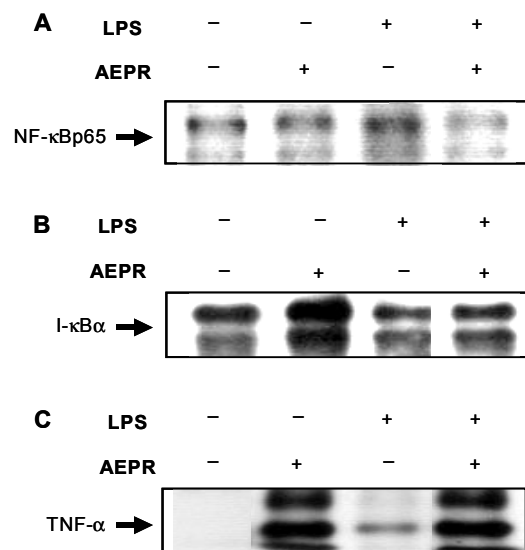


Fig. 1. Inhibitory effect of AEPR on the induction of NF-κBp65 (A), the degradation of I-κBα (B) and induction of TNF-α (C) in RAW 264.7. Cells were pretreated with 3 mg/ml of AEPR before LPS challenge (500 ng/ml), and then exposed to LPS for 90 minutes. Samples were subjected to SDS-PAGE followed by the immunoblot analysis using an anti- NF-κBp65, I-κBα and TNF-α antibodies.

그러므로 LPS처리에 의한 NF-κBp65발현 증가는 세포 내 염증 기전 활성화의 중추적 역할을 담당하는 이 단백질의 특성상 염증의 지속 및 전파와 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 NF-κBp65의 세포 내 억제 조절자인 I-κBa의 증가가 길경의 단독처리에 의해 급격히 증가하는 것으로 보므로, 길경의 항염증작용이 이러한 경로를 통해 일어날 수도 있다는 가능성을 제시하고 있다.

TNF-α는 여러 가지 자극에 의해 활성화되는 신호전달경로에 의해 생성되며, 그 경로 중 대표적인 것이 NF-κB경로이다.¹⁰⁾ 본 실험에서는 길경 단독처리에 의해 LPS처리 시보다 더 많은 양의 TNF-α가 관찰되어지므로 앞서 NF-κBp65 발현억제 및 I-κBa의 발현증가라는 결과와는 상이함을 알 수 있었다(Fig. 1C). 그러므로 길경의 처리에 의한 TNF-α의 급격한 증가는 이 단백질의 주 생성경로인 NF-κB 경로를 이용하지 않을 것으로 추측된다.

TNF-α는 이를 수용하는 수용체의 종류에 의해 상이한 세포 내 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. TNF-α 수용체 type I (TNFR1)은 그 하위 신호전달분자의 종류에 따라 anti-inflammation/apoptosis와 anti-apoptosis/inflammation의 두 경로를 활성화시키며, TNF-α 수용체 type II (TNFR2)는 anti-apoptosis/inflammation을 활성화시키는 것으로 알려져 있다.^{13,14)} 이러한 연구결과들을 바탕으로 길경의 처리에 의해 TNF-α의 증가가 유도된다는 본 연구의 결과는 길경에 의해 증가된 TNF-α가 암세포의 apoptosis를 유발할 가능성을 제시해 준다.

2) 급성폐손상 동물모델에서 길경의 항염증 작용

기관지폐포 세척액 내 총세포수는 하부 기도와 폐포의 염증 정도를 잘 반영하므로 이를 통한 병리학적인 진단은 염증을 비롯한 질환진행 정도 및 치료에 많은 도움을 준다. 본 실험에서 LPS 복강 투여 후 기관지폐포 세척액 내 총세포수 및 단백질량은 대조군에 비해 현저히 증가하나 길경을 처리한 군에서는 LPS단독처리군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2 and 3).

병리조직학적으로 보면 대조군에서 전체적으로

균일한 정상 폐포구조를 보인 반면 LPS처리군 폐에서는 염증성 반응을 보였다. 폐포벽과 폐포 내의 호중구와 대식세포 등의 염증성 세포 침윤에 의한 병변이 국소적으로 관찰되는데 특히 호중구 침윤이 현저하였다(Fig. 4). NF-κBp65, I-κBa, iNOS 및 TNF-α에 대한 면역반응은 주로 폐포와 기관지 및 모세혈관 주위 간질조직내 대식세포에 강한 반응을 나타내나 호중구에도 약한 반응이 관찰되었다. 이러한 면역반응을 나타내는 세포수가 LPS처리군에 비해 길경처리군에서는 감소하였다(Fig. 5 and 6).

LPS자극에 의한 염증에 작용하는 proinflammatory cytokine으로서 TNF-α, IL-1α, IL-1β는

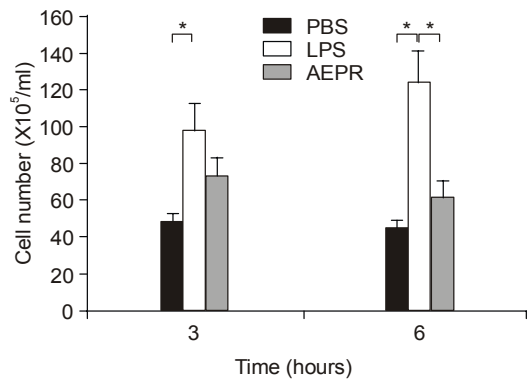


Fig. 2. Total cell of bronchoalveolar lavage in rats treated with intraperitoneal LPS challenge (6 mg/Kg). *p<0.005.

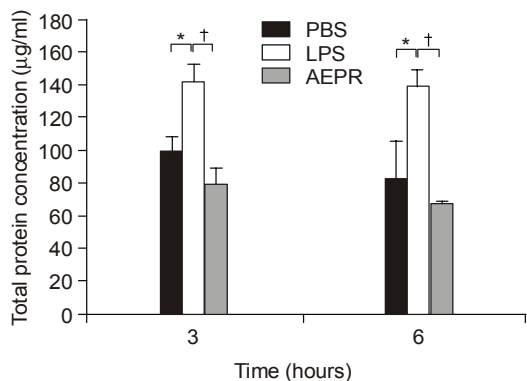


Fig. 3. Total protein content of bronchoalveolar lavage in rats treated with intraperitoneal LPS challenge (6 mg/Kg). *p<0.05, † p<0.005.

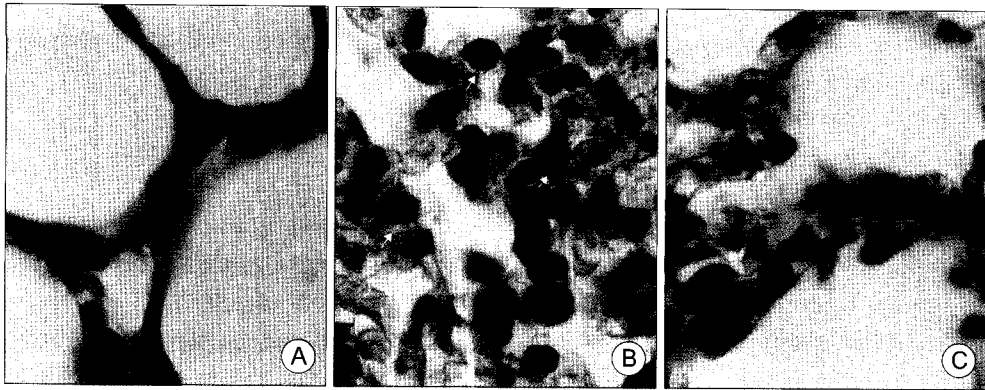
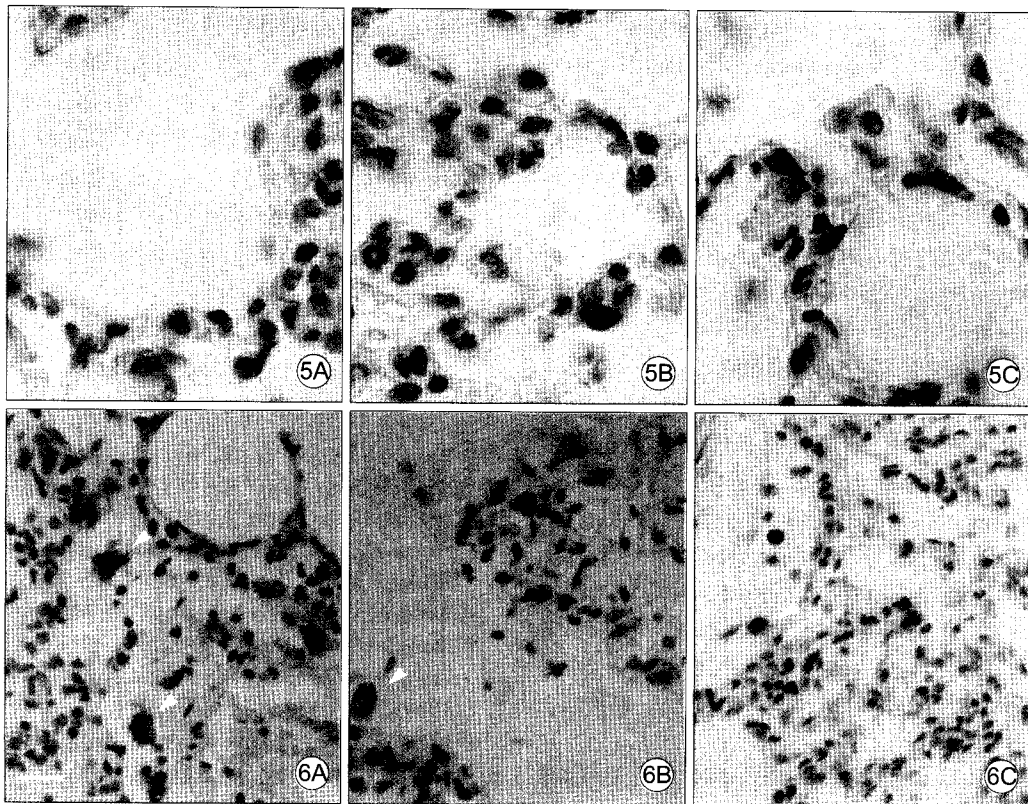


Fig. 4. The PAS reaction in the lung of normal (A), LPS (6 mg/Kg) alone (B) and AEPR (100 mg/Kg) pretreated rats (C) at 6 hours after LPS challenge. Note severe infiltration of neutrophils (arrows) into interstitium in the LPS challenged rats and a decline of neutrophils count in the AEPR pretreated rats. Scale bar = 20 μ m.



Figs. 5-6. Immunohistochemical localization of NF- κ Bp65 (Fig. 5) and I- κ B α (Fig. 6) in the lung of normal (A), LPS (6 mg/Kg) alone (B) and AEPR (100 mg/Kg) pretreated rats (C) at 6 hours after LPS challenge. The strong immunoreaction were mainly observed in the interstitial macrophage (arrowheads), but weak reaction also detected in the neutrophils (arrows). AEPR pretreated rats showed a decrease of immunoreactive cells in number compared with LPS alone treated rats. Scale bar = 20 μ m.

NF- κ B의존성이나 이들은 폐조직에서 NF- κ B발현에 앞서며 대식세포에서 이들 cytokine이 주로 형성되므로 LPS 자극에 의한 cytokine의 주된 발현자이다.^{15,16} 또한 LPS 자극 시 잔류 대식세포, 단핵구의 폐로 유입된 호중구가 주된 기능을 하는데 폐손상이 강할수록 호중구 유입이 증가하며 시간 경과에 따라 동원된 호중구가 TNF- α 의 주된 기원이 된다.¹⁷⁻¹⁹

LPS에 의한 급성폐손상의 특징인 폐조직의 호중구 침윤, 미세혈관계내의 호중구 격리 등은 개체 방어강화에 중요한 역할을 하나 동시에 활성화된 호중구는 급성폐손상의 중심적 역할을 한다.^{20,21} 따라서 급성폐손상에서 inflammatory cytokine과 활성화된 호중구 유입은 병리학적으로 매우 중요하다.^{15,22} 비록 호중구에 대한 다양한 chemotactic factors가 밝혀져 있지만 NF- κ B는 neutrophilic chemotactic cytokines 유전자 발현에 작용하며 강한 호중구 유입은 NF- κ B활성과 연관성이 있다.^{15,23,24}

따라서 다양한 anti-neutrophilic chemotactic chemokines은 폐손상 예방에 좋은 전략으로 여겨진다.^{25,26} 즉 폐포대식세포의 NF- κ B 활성화 저해시키는 약제를 염증반응이전 보다 이른 시기에 투여하면 연속된 염증성 증폭반응을 막을 수 있으며 뒤에 투과하더라도 급격한 호중구 유입에 의한 폐손상을 저해할 수 있을 것이다.

복강 내 LPS 주입은 기관지에 대한 직접적 주입에 비해 수 시간 내 현저한 호중구 침윤은 보이지 않으나 폐포강 내 또는 간질사이에 침윤된 염증세포를 포함한 전신적인 염증을 나타낸다.^{25,26} 본 연구에서 길경처리에 의한 폐포세척액의 세포수 감소와 총단백질 감소는 병리조직학적으로 폐포강 내에 침윤된 호중구, 대식세포를 비롯한 염증세포 감소로 볼 수 있으며 이러한 결과는 병리조직학적 및 면역조직화학적 관찰과도 일치하고 있다.

NF- κ B활성과 호중구 침윤에 대한 특정 signal에 대한 관계는 매우 복잡하나 길경에 의한 대식세포에서 I- κ B α degradation 저하는 폐조직의 NF- κ B 활성화 등에 영향을 미쳐 호중구에 의한 급성폐손상을 막을 것으로 보여진다. 뿐만 아니라 최근에는 암세포의 생존 및 증식에도 NF- κ B가 깊이 관

여한다는 보고가 나오고 있으므로, 길경에 의한 I- κ B α 의 발현증가는 암세포의 성장과 증식을 억제할 가능성도 있을 것으로 추측된다.

결 론

호흡기 염증성 질환에 널리 쓰이고 있는 한약재인 길경의 염증저해효과를 LPS유발에 의한 RAW 264.7 세포의 NF- κ Bp65활성 및 급성폐손상모델에서 살펴보았다. Immunoblot 결과 LPS에 의해 증가된 NF- κ Bp65와 감소한 I- κ B α 는 길경 추출물에 의해 저해되었으나 TNF- α 는 LPS처리군과 유사하게 증가하였다. 급성폐손상 동물모델을 이용한 기관지폐포 세척액에 대한 총세포수 및 단백질량은 길경추출물 전처리에 의해 저해되었다. 폐에 대한 조직병리학적 관찰로 보아 LPS에 의해 증가된 폐내 호중구 유입이 줄어들었으며 특히 폐포 및 간질 대식세포에 강한 반응을 나타내는 NF- κ Bp65, I- κ B α , iNOS and TNF- α 면역반응 세포 수도 함께 감소하였다. 이상의 결과로 보아 길경은 LPS에 의한 NF- κ Bp65활성감소와 호중구를 매개로 한 급성폐손상에 효과를 나타내어 내독성에 의한 염증성 질환 특히 폐질환에 유용한 생약재로 여겨진다.

참고 문헌

- 1) Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5): L1037-L1050.
- 2) Nathan CF, Xie F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728.
- 3) Bellezzo JM, Britton RS, Bacon BR, Fox ES. LPS-mediated NF-kappa beta activation in rat Kupffer cells can be induced independently of CD14. *Am J Physiol* 1996; 270: G956-G961.
- 4) Hong K, Chu A, Ludviksson BR, Berg EL, Ehrhardt RO. IL-12, independently of IFN-gamma, plays a crucial role in the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disorder. *J Immunol* 1999; 162: 7480-7491.
- 5) Rothwarf DM, Karin M. The NF- κ B activation pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999; 5: RE1.
- 6) Nichols TC, Fischer TH, Deliargyris EN, Baldwin AS

- Jr. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol* 2001; 6(1): 20-29.
- 7) Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 2002; 16(6): 1053-1068.
 - 8) Matsumura M, Kakishita H, Suzuki M, Banba N, Hattori Y. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2001; 69(9): 1067-1077.
 - 9) Yan X, Wu Xiao C, Sun M, Tsang BK, Gibb W. Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. *Biol Reprod* 2002; 66(6): 1667-1671.
 - 10) Nathens AB, Bitar R, Marshall JC, Watson RW, Dackiw AP, Fan J, Hiscott J, Rotstein OD. Antioxidants increase lipopolysaccharide-stimulated TNF alpha release in murine macrophages: role for altered TNF alpha mRNA stability. *Shock* 2001; 16(5): 361-367.
 - 11) Kim YP, Lee EB, Kim SY, Li D, Ban HS, Lim SS, Shin KH, Ohuchi K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med* 2001; 67(4): 362-364.
 - 12) Saeiki T, Koike K, Nikaido T. A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Planta Med* 1999; 65(5): 428-431.
 - 13) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11(9): 372-377.
 - 14) McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47(4): 619-635.
 - 15) Blackwell TS, Lancaster LH, Blackwell TR, Venkatakrishnan A, Christman JW. Differential NF-kappaB activation after intratracheal endotoxin. *Am J Physiol* 1999; 277: L823-830.
 - 16) Branch DR, Guilbert LJ. Autocrine regulation of macrophage proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *Exp Hematol* 1996; 24(6): 675-681.
 - 17) Rinaldo JE, Christman JW. Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11(4): 621-632.
 - 18) Issekutz AC, Morzycki W, Sadowska J. Rabbit alveolar macrophages stimulated with endotoxin and lung fragments from endotoxemic rabbits produce a leukocyte infiltration-inducing factor that lacks IL-1, TNF alpha, or chemotactic activity. *Exp Lung Res* 1991; 17(4): 803-819.
 - 19) Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw AP, Watson RW, Rotstein OD. Pyrrolidone dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 608-616.
 - 20) Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(5): 913-927.
 - 21) Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(6): 1364-1370.
 - 22) Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, del Castillo J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 1991; 138(6): 1485-1496.
 - 23) Blackwell TS, Blackwell TR, Christman JW. Impaired activation of nuclear factor-kappaB in endotoxin-tolerant rats is associated with down-regulation of chemokine gene expression and inhibition of neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 1997; 158: 5934-5940.
 - 24) Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9.
 - 25) Blackwell TS, Holden EP, Blackwell TR, DeLarco JE, Christman JW. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophilic alveolitis in rats: Association with nuclear factor kappa B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 464-472.
 - 26) Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 384-391.