

내독소로 유도되는 Nuclear Factor Kappa B 활성화에 미치는 Src Family Kinase의 조절기전

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

김희재 · 이해원 · 이희수 · 하종식 · 이지희

= Abstract =

The Regulatory Mechanism of Src Family Kinase in Lipopolysaccharide (LPS) induced NF- κ B Activation Pathway

Hee-Jae Kim · Heywon Lee · Hui Su Lee · Jong Sik Ha · Ji Hee Lee

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Objectives : Src family tyrosine kinases (TK) have been found to be involved in LPS induction of signal cascades. Furthermore Lipopolysaccharide (LPS) or Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) activate nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) by inducing serine or tyrosine phosphorylation of the inhibitory subunit of NF- κ B (I κ B- α). In this study, it is our purpose to search the role of Src TK in LPS induced activation of NF- κ B and NF- κ B dependent induced inflammatory factors.

Methods : Nuclear extracts were prepared from RAW 264.7 cells pretreated with damnacanthal or PP1 and then stimulate with LPS. After that, we figured out the effects of inhibition of Src family kinases on LPS-induced activation of NF- κ B by EMSA. We investigated effects of damnacanthal of PP1 on the production of NO by Griess assay and LPS-induced serine phosphorylation and degradation of I κ B- α by Western blots in LPS-stimulated RAW263.7 cells.

Results : Inhibition of Src TK with damnacanthal or PP1 blocked LPS-induced NF- κ B activation at the range of nanomolar concentrations. Substantial inhibition in LPS-induced production of NO was also observed in cells treated with damnacanthal or PP1. These kinase inhibitors blocked LPS-induced the serine phosphorylation, and the degradation of I κ B- α .

Conclusion : we investigated the role of Src TK in NF- κ B activation and production of nitric oxide (NO) in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages and the underlying mechanism by which Src TK play a role in LPS-induction of the possible pathways leading to NF- κ B activation. Src kinase specific inhibitors, damnacanthal and PP1 blocked LPS induced activating NF- κ B and producing Nitric Oxide in RAW 264.7 macrophages. Moreover, Damnacanthal and PP1 inhibited LPS induced serine phosphorylation and degradation of I κ B- α .

KEY WORDS : Src tyrosine kinase · NF κ B · Macrophage.

서 론

Src family tyrosine kinases(TK)가 내독소로 인해 유도되는 NF- κ B 활성화 신호전달체계에 연관되어 있음이 보고된 바 있다¹⁾²⁾. 또한 내독소(LPS)나 TNF α 와 같은 여러 자극제는 I κ B- α 의 serine기 또는 tyrosine 기의 인산화를 통하여 NF- κ B를 활성화 시킨다고 알려진 바 있다³⁾. 따라서 본 연구에서는 RAW264.7 대식세포를 내독소(LPS)에 노출시킨 후 Src TK가 NF- κ B활성과 염증인자의 생성에 있어서 어떤 역할을 하는지에 대하여 조사하였고 내독소 투여로 인한 NF- κ B활성에 있어서 Src TK의 기본적인 작용기전에 대해 조사하였다. Damnacanthal이나 PP1은 Src TK 특이적 억제제로 알려져 있다⁴⁾⁵⁾. 본 연구에서는 Src TK의 특이적 억제제인 damnacanthal이나 PP1을 사용하였고, RAW 264.7 대식세포에서 Src TK 특이 억제제의 전처치는 내독소로 유도되는 NF- κ B활성을 차단시켰다. 또한 내독소 투여로 증가된 NO 생성은 damnacanthal이나 PP1에 의하여 억제되었다. 이런 TK kinase 억제제는 내독소로 유도되는 serine기 인산화와 I κ B- α 분해를 억제시켰다.

대상 및 방법

1. 세포주와 세포배양

생쥐의 대식세포, RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였고, 10% Fetal Bovine Serum(FBS)과 1,000unit/ml penicillin-streptomycin이 보충된 DMEM 배양액으로 유지하였다. Channerlyzer가 부착된 전기 계수기를 이용하여 컴퓨터 프로그램을 기초로 세포의 수와 순도 및 부피를 측정하였다.

RAW 264.7 세포(5×10^6)를 5ml 배양액에 분산한 후 6 well 배양판에 주입하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양한 후, damnacanthal(Biomol)이나 PP1(Biomol) 그리고 내독소(LPS, Escherichia coli lipopolysaccharide, O55 ; B5, Sigma) 10 μ g/ml를 처리하고, 흡착한 세포에서 NF- κ B 활성을 측정하였다. RAW 264.7 세포(6.5×10^6)를 5ml 배양액에 분산한 후 60mm 배양접시에 주입하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 약물들과 LPS(10 μ g/ml)를 처리한 후 흡착

된 세포에서 Western blot을 수행하였다⁶⁾.

RAW 264.7 세포(1×10^6)를 10% FBS, 2mM glutamine, 1000units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 이 포함된 1ml MEM 배양액에 분산한 후 24 well 배양판 에 주입하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2 시간 배양한 후 약물들과 내독소(10 μ g/ml)를 처리하고 24시간 후에 흡착한 세포에서 NO production을 측정하였다.

2. 핵단백 추출 및 젤지연분석

핵 추출은 Sun 등(Sun et al., 1994)의 방법을 변형하여 실시하였다. Src TK 특이억제제 [Damnacanthal (1.7~170nM), PP1(1,100nM)]의 2시간 처리가 끝나면, 세포를 모으고 hypotonic buffer A(100mM HEPES, pH7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM dithiothreitol, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluid, 0.1mM EDTA, 1% Nonidet p-40)로 재부유시키고 얼음에서 10분간 방치하고 10초간 vortex한다.

핵은 12,000g로 30초 동안 원심분리 하고 Buffer B(20mM HEPES, pH7.9, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM PMSF, 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.42M NaCl)로 재부유한 후 얼음에서 30분간 방치시켰다. 핵 단백질이 포함된 상층액은 10,000g에서 2분간 원심분리하여 핵 단백질을 추출하여 -70°C에서 보관하였다.

이렇게 추출한 각 세포의 핵 추출물 5 μ g(4 μ l)과 비특이성 억제제인 poly dI-dC, 그리고 ³²P-표지된 소식자(40,000cpm)를 binding buffer(4mM HEPES pH7.9, 1mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 2% glycerol, 20mM NaCl)에 혼합하고 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 단백질-DNA 혼합체를 분리하기 위해 반응액을 non-denaturing 5% poly-acrylamide gel에서 전기 영동하였고 겔을 건조시켜 자가방사기록(autoradiography)하여 젤지연분석(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)하였다⁷⁾. 모든 자가방사기록의 방사성 활성도는 농도계(BIO-RAD laboratories-Scgrate)를 이용하여 측정되었고 대조군에 대한 비(fold)로 계산하였다.

소식자로 사용된 oligonucleotide는 [α -³²P]dATP (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 표지된 NF- κ B consensus sequence 5' -CCTGTGCTCCGGGA-ATTTCCTGGCC-3'를 지닌 double-stranded oligonucleotides이다. 표지된 소식자는 G25 spin column을

이용하여 정제한 후, 특이 활성도가 40,000cpm/ μ l가 되도록 TE 완충용액으로 희석한 후, 4°C에서 보관하였다.

3. Nitrite assay in cultured cell

NO의 생성은 24시간 배양한 세포의 상층액에서 nitrite를 측정함으로써 평가하였다. 보관해 둔 sample 50 μ l에 Greiss reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid)를 100 μ l 첨가한 후 microplate reader를 사용하여 optical density를 550nm(OD₅₅₀)에서 측정하였다. Nitrite 농도는 미리 준비해 두었던 sodium nitrite의 표준화 곡선(OD₅₅₀)과 비교하여 계산하였다.

4. Western blot 분석

10% SDS-Polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 분리된 단백질은 nitrocellulose 막에 전이하였다. 전이된 단백질을 5% bovine serum albumin(BSA)로 비특이적 반응을 제거하고, 일차항체인 anti-phospho I κ B α , anti-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 상온에서 1시간 반응시켜 면역합성체를 만들고 이차 항체로 상온에서 30분~1시간 반응시킨 다음 chemiluminescence(BCL) reagent 처리 후 이차 항체에 의한 발광 반응을 x-ray film에 노출시킨 후 현상하여 탐지하였다.

5. 통계분석

모든 실험 결과의 측정치는 평균 \pm 표준오차로 나타냈다. 측정치의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 Student's T-test를 이용하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Damnacanthal과 PP1이 RAW264.7세포에서 NF- κ B활성화에 미치는 영향.

내독소로 유도되는 NF- κ B 활성화에 있어서 Src TK의 역할을 조사하기 위해 Src kinase 억제제인 damnacanthal과 PP1을 RAW264.7 대식세포에 2시간 전처리한 후 내독소를 각각 처리하였다. 내독소를 4시간 처리한 후 DNA-binding activity를 조사한 결과 damnacanthal (1.7~170nM) 또는 PP1 (1~500nM)을 처리한 세포군에서 내독소로 유도된 NF- κ B의 DNA binding activity가 차단됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. Damnacanthal과 PP1이 내독소로 유도되는 NO 생성에 미치는 영향

Nitric oxide(NO)는 내독소에 노출되었을 때 대식세포에 의해 유도되는 주요 염증 매개자이다⁸⁾⁹⁾. 그리고 그것의 유전자 발현은 NF- κ B 활성화에 의존적이다¹⁰⁾. 그래서 damnacanthal이나 PP1이 NF- κ B 활성화에 따른 NO 생성을 어느정도 감소시키는지에 대하여 조사하였다.

내독소를 생체 외에서 처리한 결과 24시간 배양한 RAW 264.7 세포에서 NO 생성이 33배 증가하였다(Fig. 2). Damnacanthal (0.34~17 μ M) 또는 PP1 (0.5~10 μ M)을

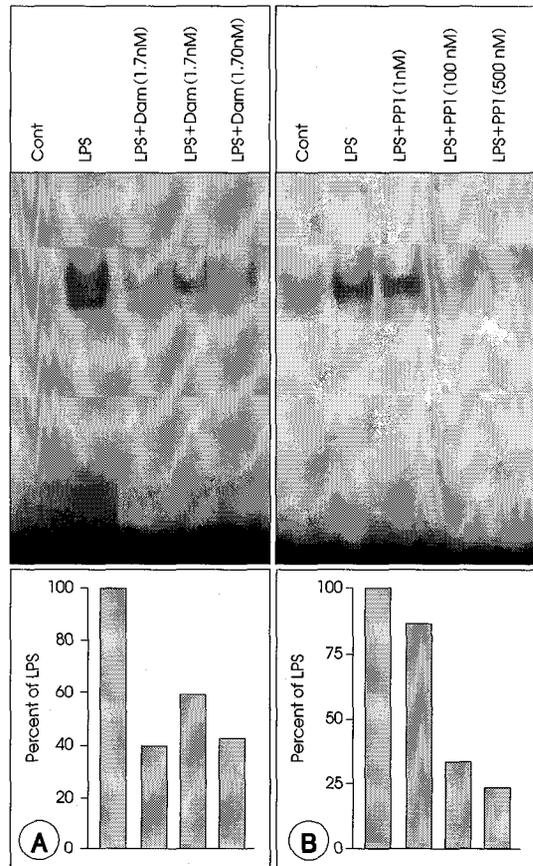


Fig. 1. EMSA illustrating the effects of inhibitors of Src family kinases on LPS-induced activation of NF- κ B. Nuclear extracts were prepared from RAW 264.7 cells pretreated for 2h with damnacanthal (1.7–170nM, A) or PP1 (1–500nM, B) and then stimulate with LPS (10 μ g/ml) for additional 4h. The results of EMSA are shown (upper panels) and quantized by densitometric analysis as a percentage of the response to stimulant alone minus control (lower panels). Data are representative of at least 3 experiments.

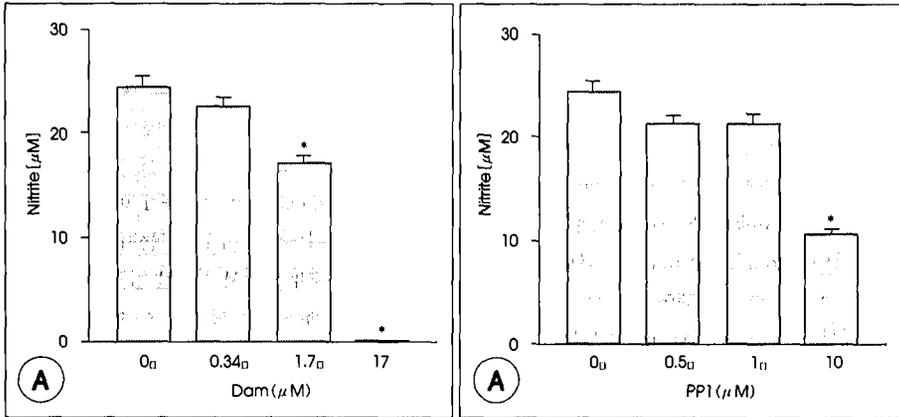


Fig. 2. Effects damnacanthol of PP1 on the production of NO by LPS-stimulated RAW263.7 cells. RAW 264.7 cells (10^6 cells/ml) were stimulated with LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of damnacanthols (0.34 – $17 \mu\text{M}$) or PP1 (0.5 – $10 \mu\text{M}$). After 24h, supernatants were assayed for nitric using the Griess assay. Values are means \pm standard errors of 4 separate experiments. * : Indicates a significant decrease ($p \leq 0.05$) compared to LPS alone.

2시간 전처리 한 세포군에서는 농도 의존적으로 내독소에 의해 유도된 NO 생성을 감소시키는 것으로 보였고, 17 μM damnacanthol은 100% 억제, 10 μM PP1은 70% 억제하는 결과를 관찰할 수 있었다. 이와는 대조적으로 이들 kinase 억제제는 안정서 NO의 생성에 어떠한 영향도 끼치지 않았다(data not shown).

3. Damnacanthol과 PP1이 serine기 인산화 및 $I\kappa B-\alpha$ 에 미치는 영향

내독소로 유도되는 NF- κB 활성화과정은 $I\kappa B-\alpha$ 의 serine 기 인산화, $I\kappa B-\alpha$ 분해로 결국 자유형 NF- κB 의 subunit이 핵으로 전위로 이루어 진다¹¹⁾¹²⁾. 따라서 본 연구에서는 내독소로 유도되어지는 $I\kappa B-\alpha$ 의 serine 기 인산화 및 $I\kappa B-\alpha$ 분해과정에 Src family TK가 연관되어 있는지 확인하기 위해서 RAW 264.7 세포에 damnacanthol이나 PP1을 전처리하고, 내독소를 투여하고 지정된 시간에 세포를 lysate 하였다. $I\kappa B-\alpha$ 의 serine 기 인산화와 $I\kappa B-\alpha$ 의 단백질 수준을 조사하기 위해 anti-phospho- $I\kappa B-\alpha$ (serine 32)¹³⁾¹⁴⁾ 그리고 anti- $I\kappa B-\alpha$ Ab를 사용하여 Western blot으로 분석하였다. Fig. 3에서 보여주는 것과 같이 내독소 자극 5분 후 $I\kappa B-\alpha$ serine기 인산화가 증가하는 경향을 보였고 내독소 투여 10분 후에는 $I\kappa B-\alpha$ serine의 인산화가 일어나지 않았다. Damnacanthol이나 PP1은 내독소 자극 5분 후에 유도되는 $I\kappa B-\alpha$ 인산화를 차단시켰다. $I\kappa B-\alpha$

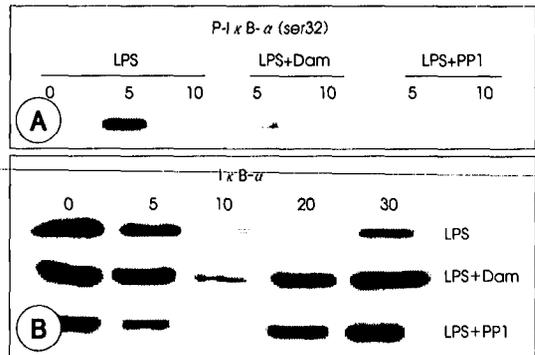


Fig. 3. Effect of damnacanthol or PP1 on LPS-induced serine phosphorylation (A) and degradation (B) of $I\kappa B-\alpha$. RAW 264.7 cell were preincubated for 2h with damnacanthol (17nM) or PP1 (500nM) before treatment with LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) for an additional indicated time. Cell lysates were analyzed by anti-phospho- $I\kappa B-\alpha$ (serine 32), and anti- $I\kappa B-\alpha$ western blotting. Data are representative of at least 3 experiments.

의 분해는 내독소 자극 10분과 20분 후에 뚜렷이 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 내독소 처리후 30분 후에 새롭게 합성된 단백질은 내독소 처리 60분까지 증가하는 것을 보였다(data 생략). Damnacanthol이나 PP1을 전처리한 세포에 내독소로 자극한 결과 내독소 처리 후 20분에 관찰되었던 $I\kappa B-\alpha$ 의 분해를 완전히 차단시켰다. 이러한 Damnacanthol이나 PP1의 차단효과는 내독소 처리후 30분에도 지속되었다.

고 찰

본 연구에서는 NO 생성과 NF- κ B 활성화에 있어서 내독소의 신호전달 체계에 Src TK의 역할을 밝히고자 하였다. PTK 억제제가 RAW 264.7 대식세포에서 내독소로 유도된 NF- κ B 활성화와 NO 생성을 억제시킨다는 사실은(Kang et al., 2003) 대식세포에서 내독소의 signaling에 PTK가 중요한 역할을 한다고 제시하고 있다.¹⁵⁾¹⁶⁾

따라서 NF- κ B 활성화를 초래하는 신호전달체계에 어떠한 PTK가 연관되어 있는지 확인하기 위해 Src TK의 선택적 억제제인 damnacanthal과 PP1을 사용하여 RAW 264.7 대식세포에서 내독소로 유도되는 NF- κ B 활성화 및 NO 생성과 I κ B- α 의 인산화에 미치는 영향을 측정하였다.

본 연구의 실험 결과 Damnacanthal(170nM) 이나 PP1(100nM)이 RAW264.7 대식세포에서 내독소로 유도되는 NF- κ B 활성을 대조군과 비교하여 각각 42%와 70% 감소시켰다. 저농도(nM 수준)에서 나타난 NF- κ B 억제효과는 이들 Src TK 억제제가 Src TK를 매우 선택적으로 억제함으로써 NF- κ B 활성화를 차단시킴을 시사하고 있다. 저농도에서 Src TK 억제제는 내독소에 의한 NO 생성의 억제 효과는 미약하였으나, 고농도의 Src TK 억제제(17 μ M damnacanthal과 10 μ M PP1)을 처리시 NO 생성이 뚜렷이 억제하였다.

이 결과는 PP1(5~15 μ M)이 RAW 264.7 세포에서 내독소와 IFN- γ 에 의해 유도되는 iNOS와 TNF 생성을 차단시킨다고 보고한 Olicek 등의 실험결과 범위와 같은 것으로 Src TK가 NF- κ B활성과 NF- κ B 의존적인 NO 생성을 초래하는 내독소 signaling cascade 에 포함된다는 것을 시사한다. 또한 이런 Src TK 억제제가 I κ B- α 의 serine 인산화를 통해 일어나는 NF- κ B 활성화에 있어 serine 인산화, I κ B- α 분해를 확인할 수 있었다.

IKK α , IKK β , cytokine inducible kinases는 I κ B- α 의 serine 32, 36을 인산화 시키는 kinase로 이미 확인된 바 있다(Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1997). 따라서 위의 결과로 보아 Src TK가 IKK α 나 IKK β 같은 serine kinase를 활성화 시키는데 중요한 역할을 하고 I κ B- α 의 serine 기 인산화는 LPS를 포함한 전염 증성¹⁷⁾¹⁸⁾ 반응하여 I κ B- α 를 통한 NF- κ B 활성을 초

래한다는 사실을 알 수 있었다.

본 연구 결과는 Src TK의 활성이 내독소로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 I κ B- α 의 serine 인산화에 중요한 역할을 한다는 사실을 보여주는 것이다.

Damnacanthal은 Lck TK의 가장 강력하고 선택적인 억제제라고 알려져 있다¹⁹⁾. 또한 PP1은 c-Src, Lyn 그리고 Lck를 비롯하여 Fyn, Hck를 nonomolar 농도에서 선택적으로 억제시킬 수 있다고 보고되었다²⁰⁾. 따라서 내독소로 유도된 NF- κ B 활성화와 I κ B- α 의 serine 과 tyrosine 인산화에 있어서 이들 c-SRC TK의 역할 가능성을 제시 할 수 있다.

요 약

목 적 :

Src family tyrosine kinases(TK)가 내독소로 인해 유도되는 NF- κ B 활성화와 신호전달체계에 연관되어 있음이 보고된 바 있다. 또한 내독소(LPS)나 TNF α 와 같은 여러 자극제는 I κ B- α 의 serine기 또는 tyrosine 기의 인산화를 통하여 NF- κ B를 활성화 시킨다고 알려진 바 있다. 이에 본 연구에서는 RAW 264.7 대식세포에 내독소 투여 시 유도되는 NF- κ B활성화 및 NF- κ B 의존성 염증성인자 생성에 대한 Src TK의 역할에 대해 규명하고자 한다.

방 법 :

American Type Culture Collection에서 구입한 생쥐의 대식세포, RAW264.7를 내독소(LPS)에 노출시킨 후 damnacanthal나 PP1을 처리하여, EMSA, Nitrite assay, Western blot을 통하여 Src TK가 NF- κ B활성과 염증인자의 생성에 있어서 어떤 역할을 하는지에 대하여 조사하였고 내독소 투여로 인한 NF- κ B활성에 있어서 Src TK의 기본적인 작용기전에 대해 조사하였다.

결 과 :

Damnacanthal이나 PP1은 Src TK 특이적 억제제로 알려져 있는데, 본 연구에서는 Src TK의 특이적 억제제인 damnacanthal 이나 PP1을 사용하였고, RAW 264.7 대식세포에서 Src TK 특이 억제제의 전처치는 내독소로 유도되는 NF- κ B활성을 차단시켰다. 또한 내독소 투여로 증가된 NO 생성은 damnacanthal이나 PP1에 의하여 억제되었다. 이런 TK kinase 억제제는 내독소로 유도되는 serine 기 인산화와 I κ B- α 분해를 억제시켰다.

결론:

Src kinase 특이적 억제제인 damnacanthal 그리고 PP1이 RAW 264.7세포에서 내독소로 유도되는 NF- κ B 활성화와 Nitric Oxide 생성을 차단시켰다. 또한, Damnacanthal이나 PP1은 내독소로 유도된 serine기 인산화와 I κ B- α 의 분해를 억제시켰다.

References

- 1) Abu-Amer Y, Ross F, McHugh K, Livolsi A, Peyron JF, Teitelbaum S : Tumor necrosis factor-alpha activation of transcription factor-kappaB in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 29417-29423
- 2) Yousef AA, F Patrick R, Kevin P, McHugh, Antonia Li et al : Tumor Necrosis Factor- α activation of nuclear transcription Factor- κ B in Marrow Macrophages in mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of I κ B- α . *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 29417-29423
- 3) Sonia Schoonbroodt and Jacques Pitte : Oxidative stress interference with the nuclear factor- κ B activation pathways. *Biochem Pharm* 2000 ; 60 : 1075-1083
- 4) Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traencker EB, et al : Discovery of a novel, potent, and src family selective tyrosine inhibitor. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 695-701
- 5) Orlicek SL, Hanke JH and English BK : The src family-selective tyrosine kinase inhibitor PP1 blocks LPS and IFN- γ mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Shock* 1999 ; 12 : 350-354
- 6) Kang JL, Pack IS, Hong SM, Lee HS, Castranova V : Silica induces nuclear factor- κ B activation through tyrosine phosphorylation of I κ B- α in RAW264.7 macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000 ; 169 : 59-65
- 7) Kang JL, Lee HS, Pack IS, Hur KC, Castranova V : Phosphoinositide 3-kinase activity leads to NF- κ B activation through interacting with tyrosine-phosphorylated I κ B- α and contributing to tyrosine phosphorylation of p65 NF- κ B. *Mol Cell Biochem* 2003 ; 248 : 17-24
- 8) Yoza BK, Hu JYQ, McCall CE : Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1 and NF- κ B activation, but not NF- κ B nuclear translocation. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 18306-18309
- 9) Kang JL, Lee HW, Lee HS, Pack IS, Chong Y, et al : Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 164 : 2206-2212
- 10) Baldwin AS Jr. : The NF- κ B and I κ B proteins : New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996 ; 14 : 649-683
- 11) DiDonato JA, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, et al. : Mapping of the inducible I kappa B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 1295-1304
- 12) Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW : Signal-induced segragation of I kappa B alpha requires site-specified ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ; 92 : 11259-11263
- 13) Frank S, John K : Structures of Src-family tyrosine kinases. *Struc Biol* 1997 ; 7 : 777-785
- 14) Joseph D, Frank M, Carodad R, Jian W, Helena S, et al : Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 1295-1304
- 15) Kang JL, Lee HW, Lee HS, Pack IS, Castranova V, Koh Y : Time course for inhibition of lipopolysaccharide-induced lung injury by genistein--relationship to alteration in nuclear factor- κ B activity and inflammatory agents. *Crit Care Med* 2003 ; 31 : 517-524
- 16) Kang JL, Lee HW, Kim HJ, Castranova V, Lim CM, Koh Y : Genistein inhibits lipopolysaccharide induction of the pathway leading to NF- κ B activation and production of interleukin-1 and nitric oxide. *J Exp Pharmacol Ther* 2003 ; in press
- 17) Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al : Manning A and Rao A IKK-1 and IKK-2 : Cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappa B activation[see comments]. *Science* 1997 ; 278 : 860-866
- 18) Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M : Identification and characterization of an I kappa B kinase. *Cell* 1997 ; 90 : 373-383
- 19) Faltynek CR, Schroeder J, Mauvais P, Miller D, Wang S, et al : Damnacanthal is a highly potent, selective inhibitor of p56 lck tyrosine kinase activity. *Biochem* 1995 ; 34 : 12404-12410
- 20) Natarajan K, Sunil KM, Madan MC, Bharat B : Protein Tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of nuclear translocation of p65 and subsequent gene expression. *Arc Biochem Biophys* 1998 ; 352 : 59-70