

縮寫表

AP-1	activator protein-1
ATF-2	activating transcription factor-2
BSA	bovine serum albumin
CBP	CREB-binding protein
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
COX	cyclooxygenase
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulphoxide
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
GM-CSF	granulocyte/monocyte colony stimulating factor
IFN	interferon
IKK	I κ B kinase
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JNK/SAPK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase/stress-activated kinase
LDH	lactate dehydrogenase
L-NAME	<i>N</i> -nitro-L-arginine methyl ester

LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	nitric oxide
NOS	nitric-oxide synthase
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	protein kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RHD	Rel homology domain
SDS-PAG	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBP	TATA box binding protein
TBST	Tris-buffered saline/Tween 20
TNF- α	tumor necrosis factor- α

中文摘要

本論文探討在巨噬細胞株 RAW 264.7 中 CCY1a-C1 抑制 lipopolysaccharide (LPS) 引發一氧化氮生成之作用機轉。當巨噬細胞受到外來刺激時，會產生誘導型一氧化氮合成酶來製造大量的一氧化氮。這是巨噬細胞產生細胞毒性以及發炎反應的重要機轉。我們發現 benzyloxybenzaldehyde 類新合成的化合物 CCY1a-C1 能夠抑制由 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞所引發的一氧化氮生成 (IC_{50} 值 $7.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$)。而且它並不會引起細胞毒性以及影響一氧化氮合成的酵素活性。進一步來探討 CCY1a-C1 的作用機轉，發現 CCY1a-C1 抑制了 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 蛋白以及 mRNA 的表現 (IC_{50} 值分別為 $3.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 及 $7.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$)。CCY1a-C1 不會加速 mRNA 的分解。將含有一段 iNOS promoter-luciferase 的結構轉染至細胞中，顯示 CCY1a-C1 會減少 iNOS promoter 活性。在 NF- κ B 路徑中 CCY1a-C1 能夠抑制 NF- κ B promoter 活性，抑制 I κ B- β 的分解，對於 I κ B- α 分解沒有影響，也不影響 I κ B- α 的磷酸化。CCY1a-C1 會減少 NF- κ B 與 DNA 結合，以及 p65 的核轉移作用。對於 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、cAMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) 和 cAMP response element binding protein (CREB) 路徑沒有影響。這些結果顯示 CCY1a-C1 抑制 LPS 刺激巨噬細胞株 RAW 264.7 生成一氧化氮的機轉，為經由抑制轉錄因子 NF- κ B 的活化。其抑制 NF- κ B 的活性可能來自於抑制 I κ B- β 的分解，以及 p65 的轉移作用而減少 NF- κ B promoter 活性，與 p38 MAPK、cAMP/PKA 和 CREB 的路徑則無關。

Abstract

In this study, the mechanism of inhibition by a novel synthetic benzyloxybenzaldehyde CCY1a-C1 on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated nitric oxide (NO) production in macrophage-like cell line RAW 264.7 cells was examined. In general, a large amount of NO was generated by inducible nitric oxide synthase (iNOS), which was expressed in activated macrophages. NO plays important role in the cytotoxicity and inflammation caused by macrophages. CCY1a-C1 inhibited the LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells with the IC_{50} value of $7.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$. This inhibitory effect was not due to the cytotoxicity or the suppression of iNOS enzyme activity by CCY1a-C1. To explore the mechanism of inhibition of NO generation by CCY1a-C1, the expression of the *iNOS* gene was examined. CCY1a-C1 decreased the expression of iNOS protein (IC_{50} $3.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$) and iNOS mRNA (IC_{50} $7.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$) based on the analysis by Western blot and Northern blot, respectively. CCY1a-C1 did not enhance the degradation of iNOS mRNA. In cells transiently transfected with an iNOS promoter-luciferase reporter construct, CCY1a-C1 decreased the LPS-induced iNOS promoter activity. CCY1a-C1 attenuated on the degradation of I κ B- β , but not I κ B- α . CCY1a-C1 also attenuated DNA binding activity, or transcriptional activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and p65 translocation. However, CCY1a-C1 had no effect on the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cAMP response element binding protein (CREB), and did not change the cellular cAMP level. These results indicate that the

inhibition of NO generation by CCY1a-C1 in RAW 264.7 cells in response to LPS is probably resulted from the decrease in iNOS transcriptional expression via the suppression of NF- κ B activation by reducing the degradation of I κ B- β , but not I κ B- α , and the p65 translocation. The p38 MAPK, cAMP/PKA and CREB pathways are probably not involved.

第一章 緒 論

一、前言

人體的免疫系統，依照功能可分為兩大部份：先天性免疫和後天性免疫。先天性免疫為對抗病原的第一道防線。它是經由非特異性作用，來達到防禦多種不同感染性病原的功能。這點和後天免疫的專一性免疫反應不同。當病原菌入侵人體，會引起非特異性的抵抗。這種防禦系統包含了兩道防線。第一道防線是人體的物理和化學屏障（例如皮膚、黏膜、胃酸、溶菌酵素）以及生物因子（如抗菌物質）等。第二道防線則包含了發炎細胞的吞噬作用 (phagocytosis) 以及發炎反應。這些非特異性防禦系統，能侷限入侵的細菌防止擴散，進而達到消滅病原菌的功能。吞噬細胞 (phagocytes) 可分為兩大類：一類為固定於網狀內皮系統 (reticuloendothelial system) 的巨噬細胞 (macrophages)，第二類為遊走於血液和組織間的多形核白血球細胞 (polymorphonuclear leukocytes 或 PMN leukocytes) 如嗜中性球 (neutrophils)、嗜鹼性球 (basophils) 及嗜酸性球 (eosinophils)，以及各種單核白血球 (mononuclear leukocytes) 細胞。這些吞噬細胞的細胞質中含有許多分泌顆粒 (secretory granules)，內含分解酵素，可分解吞噬的病菌。有些顆粒並含有殺菌蛋白 (bactericidal proteins) 如 lactoferrin。有些發炎細胞可以製造出超氧自由基 (superoxide radical)，並產生過氧化物 (peroxide) 來毒殺微生物。這些發炎細胞在預防病菌的感染上扮演著重要的角色。若是缺乏或者功能不全，則會造成慢性或再發性的病菌感染發生。

二、巨噬細胞

存在血液中的單核球細胞 (monocytes) 可藉著 cytoplasmic extensions 的方式，穿越長距離而到達器官組織而成巨大的巨噬細胞。位於組織中的巨噬細胞則被稱為 histiocytes。這些 histiocytes (直徑 15-18 μm) 比血液中的單核球細胞具有更多的細胞質液泡。巨噬細胞的細胞核為 bilobate kidney 形狀。它的細胞質中含有內質網、Golgi complex、粒腺體、游離態和結合態的 ribosomes、以及液泡 (如 lysosomes, dense bodies, myelin figures, microbodies)。在造血組織中，巨噬細胞的生長與分化，需要一些 cytokines 的參與，如 granulocyte/monocyte colony stimulating factor (GM-CSF)、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 等。分化成熟後的單核球細胞會進入血流中。而離開血管進入身體的不同組織會有不同的稱呼，如在皮膚的 Langerhans cells，肝臟的 Kupffer cells，骨骼的 osteocalst，中樞神經系統的 microglia，以及 alveolar macrophage, splenic macrophage 和 peritoneal macrophage (圖 1-1)。

巨噬細胞具有四大功能分別為：(1) 吞噬作用— 吞噬入侵的病毒、細菌、原生動物、異物或變質的細胞，它的吞噬作用大於多形核白血球細胞。(2) 辨識作用— 處理和呈現外來抗原給 T 細胞 (T lymphocytes)。(3) 攻擊作用— 有活化 T 細胞的功能。可分泌 cytokines 來刺激 T 細胞生長和分裂，以形成一大群活化的 (sensitized) T 細胞。(4) 修復作用— 當組織受到傷害時，巨噬細胞會分泌蛋白酶 (proteinase) 以及生長因子來分解並修復組織。巨噬細胞靠著細胞表面的 receptor 來辨識病原菌。其中包含了 macrophage mannose receptor、macrophage scavenger receptor 及 CD14。Macrophage mannose receptor 利用其結構上的 cysteine rich domain 與病原

菌的 mannosylated antigens 結合，將它帶往次級淋巴器官處。Macrophage scavenger receptors 可與帶電荷的 ligand 結合，並且會修飾細胞內的蛋白質與低密度脂蛋白 (low density lipoprotein) (圖 1-2)。CD14 可與細菌的 lipopolysaccharide (LPS) (圖 1-3) 結合。當這些細胞表面的 receptor 辨識到病原菌時，巨噬細胞會產生吞噬作用，將病原菌包圍起來形成 phagosome。然後 phagosome 會與細胞內的 lysosomes 融合在一起形成 phagolysosome。存在 lysosomes 內的抗微生物蛋白質及酵素會將病原菌分解 (圖 1-4)。巨噬細胞受到不同的刺激 (內生性或細胞外來) 會造成不同的活化作用 (圖 1-5)。細胞在進行吞噬作用時，也會伴隨製造出含氮或含氧的毒性物質，如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、超氧自由基 (superoxide radical)、peroxynitrite、過氧化氫 (H_2O_2)、氫氧自由基 (hydroxyl radical) 及 HOCl 等，來幫助消滅病原菌。另外巨噬細胞也分泌細胞激素及發炎媒介物 (mediators)，可增大血管通透性及誘發嗜中性白血球的趨化反應 (chemotaxis)。導致嗜中性白血球和血漿蛋白如抗體 (antibody) 及補體 (complement) 等滲出血管到達受感染的地方。

三、一氧化氮及一氧化氮合成酶

一氧化氮是一個作用短暫的含氮自由基。許多不同的細胞會釋出一氧化氮。一氧化氮和它的代謝物在調節許多生理功能及病理狀態中扮演著重要的角色，例如產生宿主的防禦系統 (抗微生物及抗腫瘤的功能)、神經的傳導 (Meffert et al., 1994)、神經毒性、血管擴張作用 (Moncada et al., 1991; Nathan, 1992)。在內皮細胞所產生的一氧化氮又稱為 endothelium-derived relaxing factor，具有調節血管擴張的作用。一氧化氮是利用 L-arginine 經由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS)

(Palmer et al., 1988) 的作用產生，並伴隨著生成 citrulline (圖 1-6)。一氧化氮合成酶可分為三類，即神經型 (neuronal) 一氧化氮合成酶 (nNOS, type I NOS, NOS-I 或 NOS-1)、內皮細胞 (endothelial) 一氧化氮合成酶 (eNOS, type II NOS, NOS-II 或 NOS-2)、誘發型 (inducible) 一氧化氮合成酶 (iNOS, type III NOS, NOS-III 或 NOS-3) (Nathan, 1992; Marletta, 1993)。它們是從不同的基因被表現出來，坐位在不同的 chromosomal location (表 1-1)，也有著不同的調節作用。一氧化氮合成酶的酵素活性需要五個共同因子，即 flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) 以及 heme，來參與反應 (圖 1-7) (Marletta, 1994; Nathan and Xie, 1994)。此共同因子會與一氧化氮合成酶形成複合物並調節一氧化氮的生成。一氧化氮合成酶會形成 dimeric 的活性形態。Heme 和 BH₄ 與一氧化氮合成酶 dimerization 有關 (Baek et al., 1993)。Dimeric 形態的一氧化氮合成酶會與兩個 CaM 結合。CaM 的結合作用會增加電子由 NADPH 轉移到 flavins 的速率 (Hiki et al., 1991; Hecker et al., 1992)。神經型一氧化氮合成酶存在於神經組織中，而內皮細胞一氧化氮合成酶存在於血管內皮細胞。神經型一氧化氮合成酶及內皮細胞一氧化氮合成酶在細胞中是近乎恆定的表現，其酵素活性受細胞內鈣離子濃度的調節。當刺激細胞使細胞內的鈣離子濃度增加時，可活化此酵素活性。此兩類一氧化氮合成酶，一般認為與維持細胞的正常功能有關。神經型一氧化氮合成酶及內皮細胞一氧化氮合成酶它們在結構上與誘發型一氧化氮合成酶不同。主要差異在 FMN-binding subdomain 的中間多了一段 40-50 個氨基酸。而這段氨基酸會形成 autoinhibitory loop (Salerno et al., 1997)，具有造成 CaM 的去穩定化作用 (destabilizing)，使得與鈣的結合減少，並且也會抑制電子由 FMN

傳遞到 heme 的作用 (Nishida and Ortiz de Montellano, 1999; Daff et al., 1999)。而 iNOS 在正常狀態下是不存在於大多數種類的細胞中。當細胞受到葛蘭氏陰性細菌的 LPS 或 cytokines 刺激，會誘發細胞表現出 iNOS (Fang, 1997)。iNOS 為持續活化的酵素，其活性並不受細胞內鈣離子濃度的調控。當細胞持續增加 iNOS 的表現，並製造出大量的一氧化氮時，會引起細胞毒性及低血壓休克等現象 (Beutler, 1989; Nathan, 1997)。故一般認為，此類一氧化氮合成酶與發炎症狀的產生有關 (Laskin and Pendino, 1995; MacMicking et al., 1997a)。因此抑制 iNOS 生成一氧化氮，可作為開發抗發炎藥物的一個重要的治療標的。

四、生成 iNOS 調節的機轉

誘發 iNOS 生成的調節作用，是藉由細胞與細胞之間的接觸（經由附著和共同刺激分子）、cytokines、免疫複合物、微生物及病毒產物（蛋白質、脂質、多醣體）、polyamines、non-ferritin-bound iron、oxygen tension、及環境的 pH 值所影響 (Bogdan, 2000; Fritsche et al., 2001)。調控 iNOS 基因表現可以作用在不同層次上，包含在轉錄、後轉錄、轉譯、後轉譯的步驟上 (Vodovotz et al., 1993; Rao, 2000)。Cytokines 經由合成 iNOS mRNA 及蛋白的穩定性來調控 iNOS 的表現 (Rodriguez-Pascual et al., 2000)。其中活化 iNOS 基因 promoter，為最重要的調控模式。iNOS 的起始轉錄位置為上游的 400 base pair (bp) 區域上。可利用 iNOS 基因的 5'-flanking region 來研究經由轉錄調節 iNOS 基因表現 (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993)。人類 iNOS 基因具有 26 個 exons 及 25 個 introns (Geller et al., 1993) (表 1-1)。iNOS 基因上含有數個 consensus sequences (可特異

與轉錄因子結合的固定序列) 可經由 cytokine 或 LPS 誘發基因表現。consensus sequences 及 *trans*-acting factors 能調控人類或老鼠 iNOS 基因的轉錄。在老鼠的 iNOS promoter 上包含著兩段轉錄調節區域，分別為 enhancer 及 basal promoter。在 iNOS promoter 上的轉錄因子包含有 NF- κ B、activator protein-1 (AP-1)、signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 α 、interferon regulatory factor-1 (IRF-1)、nuclear factor interleukin-6 (NF-IL-6 or C/EBP β) 及 high-mobility group-I (Y) protein、CREB 與 C/EBP (MacMicking et al., 1997b; Kleinert et al., 1998; Dlaska and Weiss, 1999; Pellacani et al., 2001; Ganster et al., 2001)。在 iNOS promoter 上有許多轉錄因子的結合位置，包含有 κ B sites 座落於 enhancer 和 basal promoter 上、兩個並排的 interferon-stimulated response elements、座落於 enhancer 和 basal promoter 上的 octamer element、 γ -interferon-activated site 位於 enhancer 上 (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993; Kamijo et al., 1994; Martin et al., 1994)。總結來說在 promoter 上有三個 NF-IL-6 結合位置、一個 TNF response element (TNF-RE)、一個 NF- κ B site、一個 Oct site、C/EBP、CRE 和 GAS。在遠端的 enhancer 區域上則含有另一個 NF- κ B site 和數個 interferon regulatory factor binding element (IRF-Es)。體內的 iNOS 轉錄作用也有 biophasic effect 來控制著一氧化氮生成。當巨噬細胞受到 cytokines 刺激時，細胞會活化 NF- κ B (positive feedback 正回饋作用) 來增高一氧化氮的濃度，當一氧化氮濃度過高時則產生相反作用適時的調整使一氧化氮降低 (Umansky et al., 1998; Connelly et al., 2001)。

五、I κ B kinase (IKK)/NF- κ B 途徑

當巨噬細胞上的 receptor 受到適當的刺激後，會活化細胞內的訊息傳遞，以增加 cytokines 的基因表現 (Ghosh et al., 1998; Zhang and Ghosh, 2001)。此過程會誘導轉錄因子 NF- κ B 的活化 (Rothwarf and Karin, 1999)。已知 NF- κ B 可以調節 cytokines 如 IL-1、IL-2、IL-6 及 IL-12、TNF- α 、lymphotoxin α (LT α) 及 LT β 、和 GM-CSF；chemokines 如 IL-8、macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)、MCP-1、RANTES 和 eotaxin；黏著分子 (adhesion molecules) 如 intercellular adhesion molecule (ICAM)、vascular cell adhesion molecule (VCAM)、E-selectin；acute phase proteins 如 SAA；誘發型酵素如 iNOS 和 cyclooxygenase-2 (COX-2) 基因表現。

NF- κ B 家族有五個成員，分別為 Rel (c-Rel)、RelA (p65)、RelB、NF- κ B1 (p50) 和 NF- κ B2 (p52) (reviewed Ghosh et al., 1998) (圖 1-8)。而 p105 與 p100 為 p50 及 p52 的前驅物，經過 C-端磷酸化和在 C-端的 I κ B-like 部分進行 ubiquitin 依存性分解後產生 p50 及 p52 的 (Palombella et al., 1994; Orian et al., 1995)。NF- κ B 以 homo- 或 heterodimers 形式存在。NF- κ B 具有高度一致性含 300 個氨基酸長的 N-端 Rel homology domain (RHD)，能夠轉移至細胞核中與 DNA 結合、行 dimerization 作用和結合抑制性蛋白 (inhibitor of κ B: I κ B) (Ghosh et al., 1998)。在未刺激的細胞中大多數的 NF- κ B dimer 會與 I κ B 結合存在細胞質中。I κ B 家族的成員有 I κ B- α 、I κ B- β 、I κ B- ϵ 、I κ B- γ 、Bcl-3 (圖 1-8)。I κ B 具有六個或更多的 ankyrin repeat，這些序列為與 NF- κ B 產生結合所需，並藉由 RHD 與 NF- κ B 結合 (Ghosh et al., 1998)。I κ B 抑制 NF- κ B 的活性主要來自於其結構上的 C-端，而 N-端則含有調節功能的 domain

(Baldwin, 1996)。在未受刺激的細胞中，I κ B 會遮蔽掉 NF- κ B 的 nuclear localization signal (NLS)，形成不活化的 NF- κ B/I κ B 複合物，而停留在細胞質內 (Malek et al., 2001; Tam and Sen, 2001)。當 I κ B 磷酸化並被分解後，就無法遮蔽 NF- κ B 的 NLS，而使自由態的 NF- κ B dimers 進入到細胞核內，活化 NF- κ B 所調節的基因表現。另外在 NF- κ B 活化的過程中，除了會快速造成 I κ B- α 的分解之外，也會快速合成新的 I κ B- α 。因 I κ B- α 含有 leucine-rich nuclear-export signal (NES)，所以新合成的 I κ B- α 能夠由細胞核回到細胞質中 (Arenzana-Seisdedos et al., 1997)，並帶回與 DNA 結合的 NF- κ B (Sun et al., 1993; Chiao et al., 1994)。而 I κ B- β 產生分解的敏感性較 I κ B- α 低。此現象可能是在 NF- κ B 活化的過程中，有一種內生性 GTP binding accessory protein (κ B-Ras) 會選擇性的結合在 I κ B- β 的 specific insert domain 上 (Fenwick et al., 2000)。使得能夠磷酸化 I κ B 的酵素 I κ B kinase (IKK) (Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998) 無法進行酵素作用，因而阻斷了 NF- κ B 的訊息傳導。新合成的 I κ B- β 也能與 promoter 位置上的 NF- κ B 結合，但它不能夠帶走 NF- κ B，因而使得 NF- κ B 的反應持續。近來有另一種論述認為 I κ B- α 只會遮蔽 p65 上的 NLS 而 p50 的 NLS 仍然顯露，因此 NF- κ B/I κ B- α 複合物能進入細胞核中，但同時存在於 p65 和 I κ B α N-端結構上的 NES 會馬上將複合物帶回細胞質中，因而造成 NF- κ B/I κ B α 複合物會持續的往返穿梭於細胞核與細胞質之間 (Johnson et al., 1999; Huang et al., 2000) (圖 1-9)。而在 I κ B- β 中並沒有發現 NES 的結構 (Malek et al., 2001)。I κ B- β 可以同時遮蔽掉 NF- κ B dimer 上的 NLS 而使 NF- κ B-I κ B- β 複合物停留在細胞質中 (Tam and Sen, 2001)。因此含有 I κ B- β 的複合物因為抑制了 NLS 而無法正常的穿梭於細胞質與細胞核中 (圖 1-9)，但 NF- κ B-I κ B ϵ 複合物也具有

穿梭於細胞核與細胞質中的活性 (Lee and Hannink, 2002)。

IKK 是一個大的複合物，由 IKK α 、IKK β 、及 IKK γ dimer 形成一個 tetramer (DiDonato et al., 1995; Miller and Zandi, 2001)。其中 IKK α 和 IKK β 為 catalytic subunit，而 IKK γ (或稱 NF- κ B essential modulator, NEMO) 為 regulatory subunit (Karin, 1999a; Israel, 2000)。當細胞受到 TNF- α 、IL-1、double-stranded RNA 或 endotoxin 刺激時會活化 IKK γ 。在 IKK 的 catalytic subunit 中，IKK β 與 I κ B 的磷酸化比較有關係 (Li et al., 1999b; Li et al., 1999c)，而 IKK α 被認為並不是這條路徑所需要的 (Hu et al., 1999)。IKK 會在 I κ B 分子 N-端上的兩個 serine 進行磷酸化作用，在 I κ B α 則是發生在 S32 與 S36 (DiDonato et al., 1996)。這個磷酸化作用會造成 I κ B 的 polyubiquitination，並在中 26S proteasome 進行分解 (DiDonato et al., 1996)。有報告顯示 I κ B- α 的分解作用也可能發生在細胞核中。因 β -transkucin repeat-containing protein (β -TrCP)，一種含 WD repeat 和 F box 的蛋白可以認到磷酸化的 I κ B- α ，被發現存在細胞核中 (Davis et al., 2002) (圖 1-9)。當加入 Skp1-Cul-Roc ubiquitin ligase complex 可進行 ubiquitination 的作用 (Ben-Neriah, 2002)。也有報告顯示當 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞株時，會誘發一個新發現的 IKK 稱為 IKK-i (又稱為 IKK ϵ) 的產生 (Shimada et al., 1999)。因此過量表現 IKK-i 也會活化 NF- κ B。IKK 複合物大部分存在於細胞質中，有少部分的 IKK α 存在細胞核內。除了 IKK-i 外，另外還有一個 IKK 的相似物稱為 TBK1 (又稱 T2K 或 NAK) (Peters and Maniatis, 2001)。TBK1 被認為能夠調節 NF- κ B 活化可能與 I κ B 的分解無關 (Bonnard et al., 2000)。Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) 家族中的 NF- κ B-inducing kinase (NIK) 以及 MEKK1 也會活化 NF- κ B。NIK 會磷

酸化並活化 IKK α (Malinin et al., 1997)。而 MEKK1 則會優先磷酸化 IKK β (Nakano, 1998)。因此活化 NF- κ B 可有兩條路徑，分別為 IKK β /NF- κ B 路徑和 NIK/IKK α /NF- κ B 路徑 (圖 1-10)。

六、調節 NF- κ B 在細胞核內的活性

對於調控 NF- κ B 的活性最主要還是來自於細胞質當中的抑制性蛋白的離開，以及 NF- κ B 的核轉移作用。p65 以及 c-Rel 的 transactivation 活性為調控 NF- κ B 活性的第二個層次。許多研究證實 p65 會被磷酸化而產生活性，而 p65 的磷酸化發生在 C-端的 transactivation domains (TA) 以及 N-端的 RHD (Schmitz et al., 2001) (圖 1-11)。例如 PKA 能結合在細胞質中未活化的 NF- κ B，使位於 p65 N-端 RHD 上的 S276 磷酸化而增加轉錄的活性 (Zhong et al., 1997)。IKK β 能夠使 p65 C-端 TA domain 上的 S529 和 S536 磷酸化 (Sakurai et al., 1999)。而 casein kinase II (CK II) 會使 S529 磷酸化 (Wang et al., 2000)。另外其它研究顯示 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) (Hoeflich et al., 2000)、TBK1 (Bonnard et al., 2000)、IKK α (Li et al., 1999a; Sizemore et al., 2002)、protein kinase (PKC)- ζ (Leitges et al., 2001) 為控制 NF- κ B 轉錄活性的重要因子。推測它們的作用與 p65 的磷酸化作用有關，而與 IKK 活化和 I κ B 的分解無關 (圖 1-12)。另外 Ras 經由 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 途徑以及其他相關的酵素來增加 p65 的轉錄活性 (Norris and Baldwin, 1999)。Ras 和 PKC- ζ 會磷酸化 p65 的 RHD 而活化轉錄作用 (Anrather et al., 1999)。另外 p65 的磷酸化狀態不只受到這些酵素活化之外，還有其它的酵素或磷酸水解酶 (phosphatase) 也會影響到 p65 的磷酸化。例如

在未刺激的黑素細胞 melanocyte 中 p65 會與 protein phosphatase 2A (PP2A) 結合，當受到 IL-1 刺激時會進行 p65 去磷酸化作用 (dephosphorylation) (Yang et al., 2001)。

p65 的活性功能也會受到可逆的乙醯化 (acetylation) 作用來調控。細胞過量表現 histone deacetylase 1 (HDAC1) 和 HDAC2 會降低 p65 的轉錄活性，進而抑制了與 NF- κ B 相關的基因表現 (Ashburner et al., 2001)。推測 cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300 與 HDAC3 可經由 histone 的乙醯化或去乙醯化來調節 NF- κ B 相關的基因表現。當 p65 被乙醯化時，I κ B- α 與它的結合作用力會變弱。而經過 HDAC3 對 p65 產生去乙醯化後，則會增加結合能力，使得 NF- κ B 複合物被帶回細胞質中 (Chen et al., 2001) (圖 1-12)。細胞中 CBP 蛋白的 N-端 (氨基酸 1-450) 與 p300 具有高度的同源性 (homologous)，它會與 p65 的 C-端 (氨基酸 286-551) 結合 (Parry and Mackman, 1997)。CBP/p300 藉由兩個位置與 p65 結合，一個在 CBP/p300 的 N-端與未磷酸化的 p65 C-端結合，另一段 domain 與磷酸化的 p65 S276 結合 (Mutin et al., 1999)。CBP 的表現能夠增加 p65 相關的基因表現 (Gerristen et al., 1997)。推測在 NF- κ B 依存的轉錄作用中需要 CBP/p300 的參與。Basal complex 含有 TATA box binding protein (TBP) 它可以結合在 promoter 的 TATA box 上。p50/65 與 CBP 和 basal complex 所形成的複合物為轉錄所必須 (圖 1-13)。

七、 p38 MAPK 途徑

在 LPS 刺激細胞內訊息傳導路徑誘發 iNOS 表現的過程中，有許多訊

息傳遞因子的參與。整個訊息的傳導，從細胞膜經過細胞質，一直傳到細胞核中。因此上游的訊息因子控制著 iNOS 的基因表現。當 LPS 與 LPS binding protein 和 CD14 結合後，會活化 tyrosine 磷酸化。在 LPS 刺激單核球細胞時，src 家族中的 p53/56^{lyn}、p58/64^{c-fgr} 會被活化 (Henricson et al., 1995; Shapira et al., 1994)。LPS 刺激也會活化 phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC) 和 phosphatidylcholine-PLC (PC-PLC) 導致下游 PKC (PKC- β 和 - ζ) 的活化 (圖 1-14)，以及活化 MAPK 路徑。MAPK 屬於 serine/threonine protein kinases 的一族。許多細胞外的刺激會活化 MAPK 路徑。MAPK 家族的成員包括 extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Nishida and Gotoh, 1993)，以及兩種 stress-activated protein kinase，分別為 c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) (Derijard et al., 1994) 和 p38 MAPK (Han et al., 1994)。在巨噬細胞中，LPS 會活化 ERK1 和 2 (p44/p42 MAPK)、p38 MAPK 及 JNK (Hambleton et al., 1996; Schumann et al., 1996)。三種 MAPK 都能磷酸化並活化下游的轉錄因子。ERKs 會作用到 c-Myc、Elk-1、Ets-2；JNKs 會磷酸化 c-Jun、Elk-1、activating transcription factor (ATF)-2；而 p38 MAPK 除了會活化 ATF-2 (Chen et al., 1998)、Elk-1 (Raingeaud et al., 1996)、CHOP (Wang and Ron, 1996)、MEF2C (Han et al., 1996)、Sap1a (Janknecht and Hunter, 1997)、CREB 之外，也會經由活化下游的 MNK1/2、MAPKAPK2 (MK2)、MSK1、PRAK，來磷酸化轉錄因子，促使基因的表達。在 iNOS promoter region 上含有轉錄因子 NF- κ B、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)、cAMP response element (CRE)、Oct-1、activator protein-1 (AP-1)、GAS、及 IRE 的結合位置 (圖 1-15)。這些都是 p38 MAPK 的受質或是它所作用的下流酵素 (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993; Taylor and Geller,

2000)。有報告顯示 LPS 所引起 NF- κ B DNA protein binding 與 iNOS 表現以及一氧化氮的釋放，與 p38 MAPK 活化有關，而非活化 p44/42 MAPK (Chen and Wang, 1999)。若抑制了 p38 MAPK 路徑，則會減少 TBP 結合到 TATA box 上 (Carter et al., 1999)。推測 p38 MAPK 會影響到 basal transcriptional complex，而降低了 NF- κ B 的活性。

八、cAMP 和 CREB 途徑

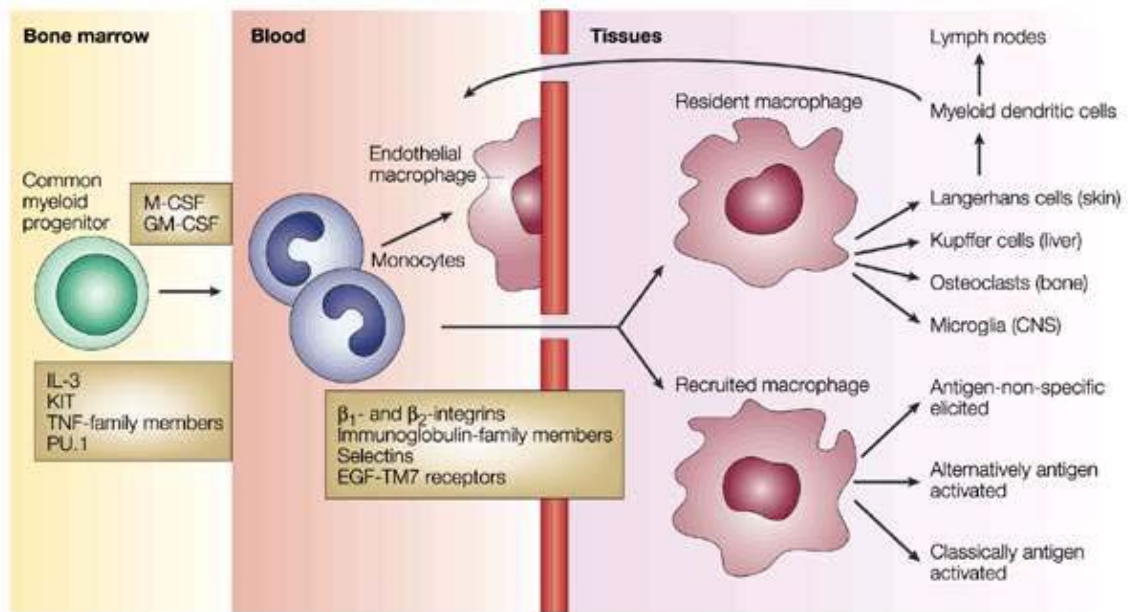
增加細胞內 cAMP 的量可以調節基因的表現，是細胞內重要的訊息傳導機轉。cAMP 能夠調節 NF- κ B 的活化與 iNOS 的轉錄作用，是經由 PKA 來磷酸化共同活化因子 CREB (Walton and Rehfuss, 1990)。當 PKA 磷酸化 CREB 時會增加 CREB homodimers 結合到 CRE 位置的親和力，並且也會促使它與 CBP 結合。NF- κ B 與 DNA 結合時，需要與其它的共同活化因子參與產生 transactivating activity。CBP 的功能為將許多轉錄因子與轉錄基質連結起來。CBP 會與 TFIIB 轉錄因子結合，而後再與 TBP 結合 (Kwok et al., 1994; Lee et al., 1996) (圖 1-16)。p65 與 CBP 結合後，會增加 NF- κ B 轉錄活性 (Parry and Mackman, 1997; Gerritsen et al., 1998)。cAMP/PKA 的訊息傳導會造成 iNOS 表現的促進和抑制均有報導 (Chen et al., 1999; Galea and Feinstein, 1999)，但在巨噬細胞株 RAW 264.7 中，以 LPS 刺激會引發 cAMP 增加，並刺激一氧化氮的生成 (Chen et al., 1999) (圖 1-17)。在 RAW 264.7 細胞中，LPS 引發 iNOS 的表現與一氧化氮釋放的機轉中，MKK3/6 能刺激 CRE 以及 NF κ B。在許多的 promoter 中活化 CRE 位置與轉錄因子 CREB 的活化有關。COX 是合成 prostanoids 的重要酵素，它能使 arachidonic acid 轉變為 PGH₂，而 PGH₂ 再經過其

它的酵素生成不同的 prostanoids (Vane, 1994)。COX-2 是 COX 的 isoform，它會被 proinflammatory 刺激所誘發出來，並且被認為與發炎狀態下的 prostanoid 生成有關 (Murakami et al., 1994; Dewitt and Smith, 1995)。LPS 刺激巨噬細胞時 COX-2 的表現上升，同時偵測到 PGE₂ 的生成 (Chen et al., 1999)。PGE₂ 會經由 G_s-coupled receptor 來活化 adenylyl cyclase，產生 cAMP 及活化 PKA (Fournier et al., 1995)。在腹腔的巨噬細胞的實驗中，LPS 也會經由 PGE₂ 而增加 cAMP 的濃度 (Raddassi et al., 1993)。

九、LPS 與 LPS receptor

當巨噬細胞受到 LPS 的刺激後，會誘導許多發炎媒介物的基因表現，包含 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1) 及 IL-6、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)、GM-CSF、M-CSF、IL-8、monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) 及 iNOS 等 (Guha and Mackman, 2001) (表 1-2)。LPS 和 LPS-containing particles 會與蛋白質 LPS binding protein (LBP) 形成複合物。LBP 在人體中的濃度為 3-10 $\mu\text{g/ml}$ 。當體內經過急性反應 (acute phase response) 後，細胞內的 LBP 濃度會上升。LBP-opsonized particles 會與 CD14 結合，而 CD14 被視為 LPS 在細胞膜上的 receptor (Wright et al., 1990)。在哺乳類細胞中，LPS 也會被一種 toll-like receptor (TLR) 辨認，而引發先天性免疫反應。TLR4 會與 MD-2 在單核球的表面形成複合物，此複合物具有 LPS signaling receptor 的功能 (Hoshino et al., 1999; Akashi et al., 2000) (圖 1-18)。許多的研究報告皆證實，在單核球細胞或細胞株中，LPS 會活化 nuclear factor- κB

(NF- κ B) 此種轉錄因子 (transcriptional factor) (Muller et al., 1993)。



Nature Reviews | Immunology

圖 1-1. 巨噬細胞的分化、分佈及活化 (摘錄自 Gordon, 2003)。

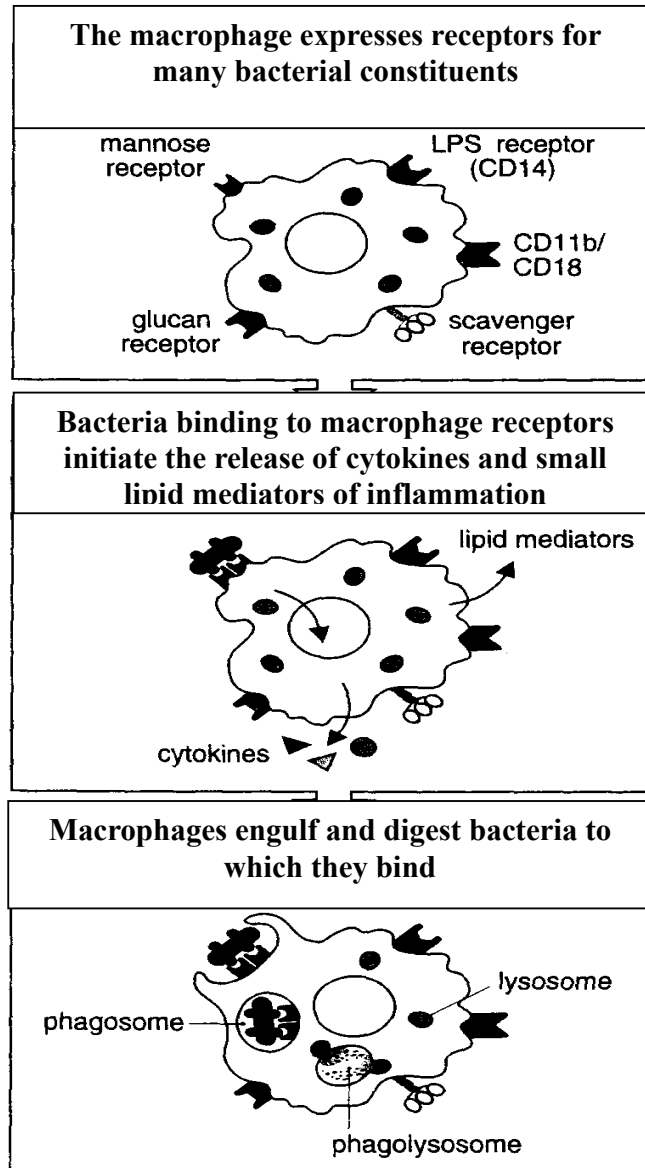
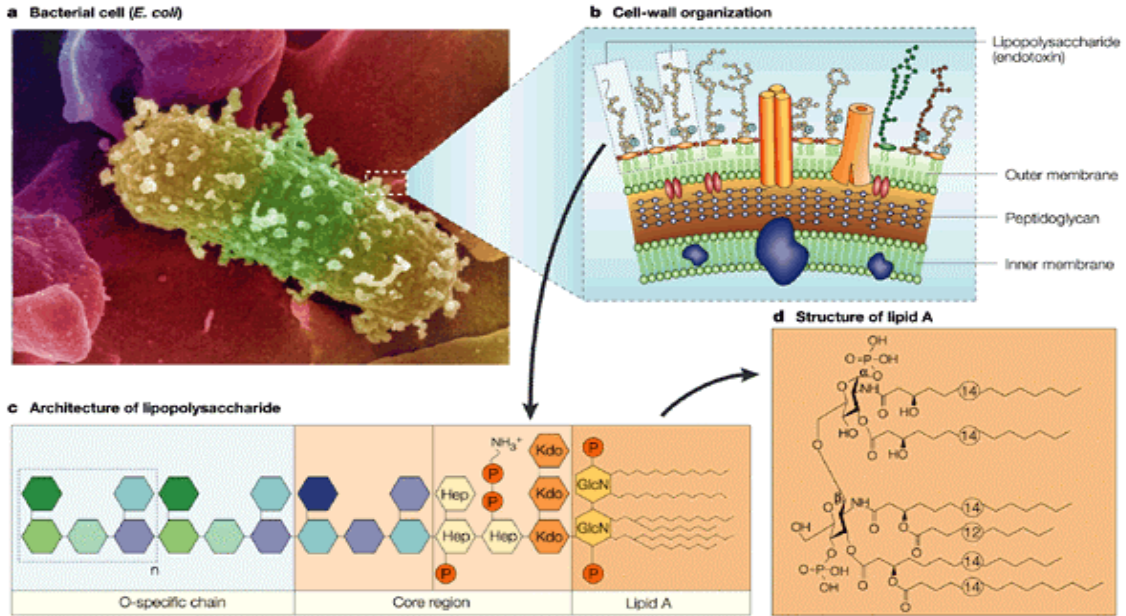


圖 1-2. 吞噬細胞上的數種接受器可辨識細菌並引起吞噬作用
(摘錄自 Janeway et al., 2001)



Nature Reviews | Immunology

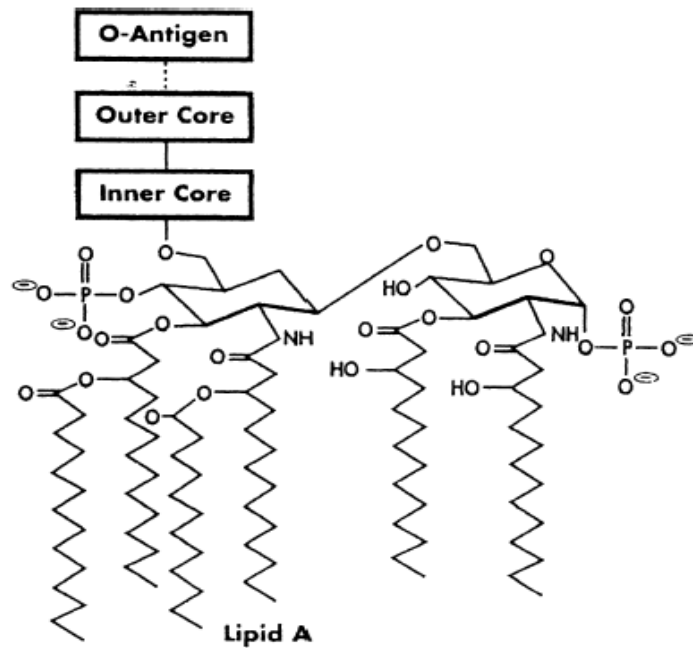


圖 1-3. LPS 的結構 (摘錄自 Beutler and Rietschel, 2003; Guha and Mackman, 2001)。

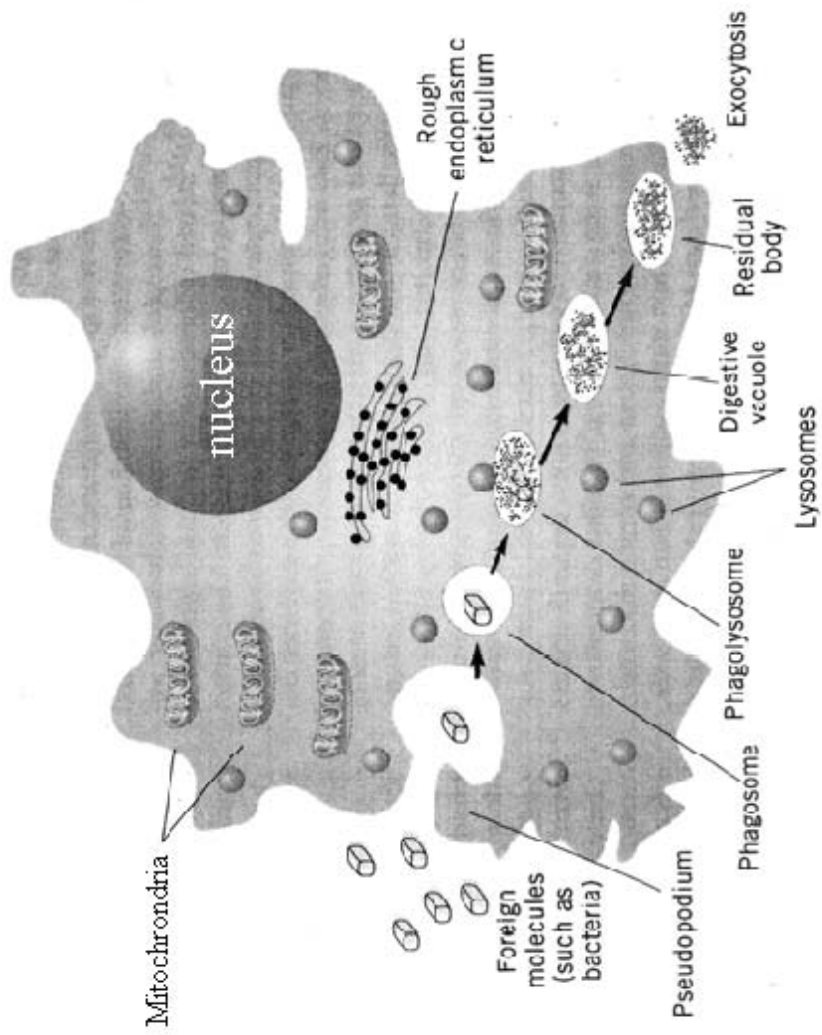
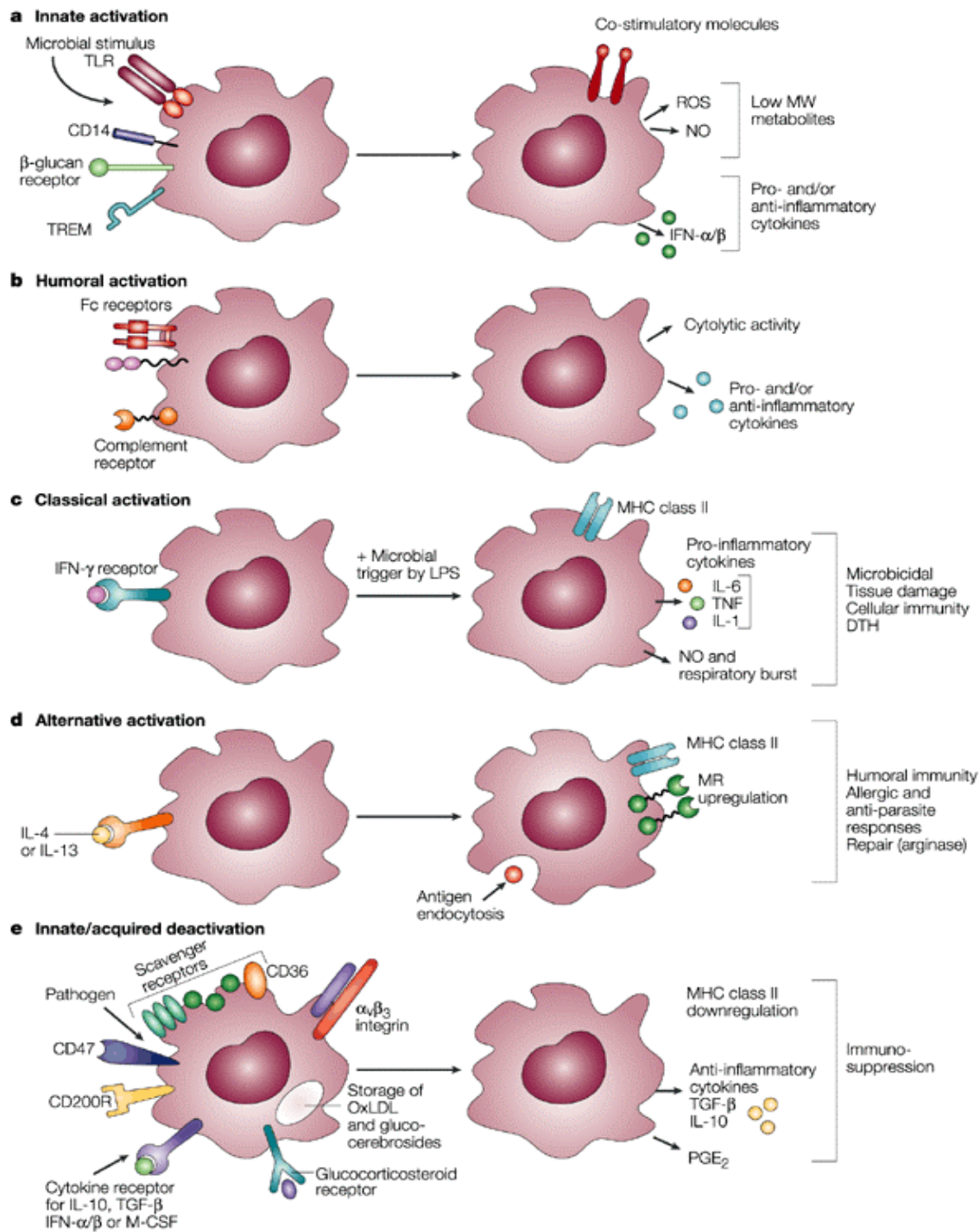


圖 1-4. 巨噬細胞產生吞嚥作用的過程



Nature Reviews | Immunology

圖 1-5. 先天、後天免疫系統活化巨噬細胞 (摘錄自 Gordon, 2003)。

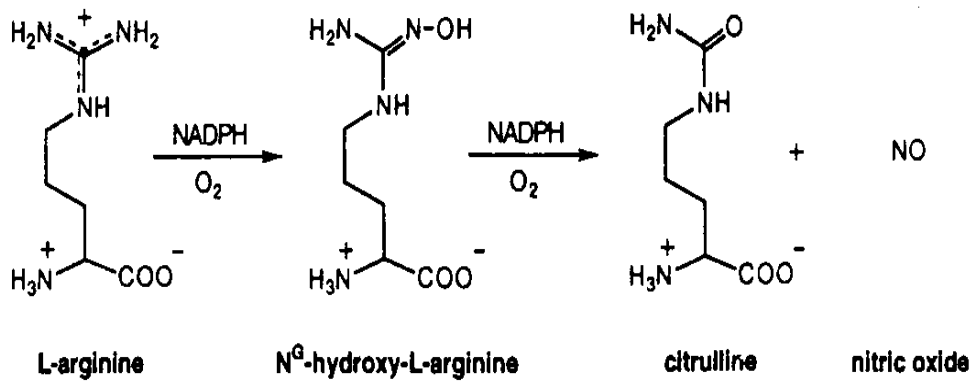


圖 1-6. NOS 的酵素反應 (摘錄自 Marletta, 1994)。

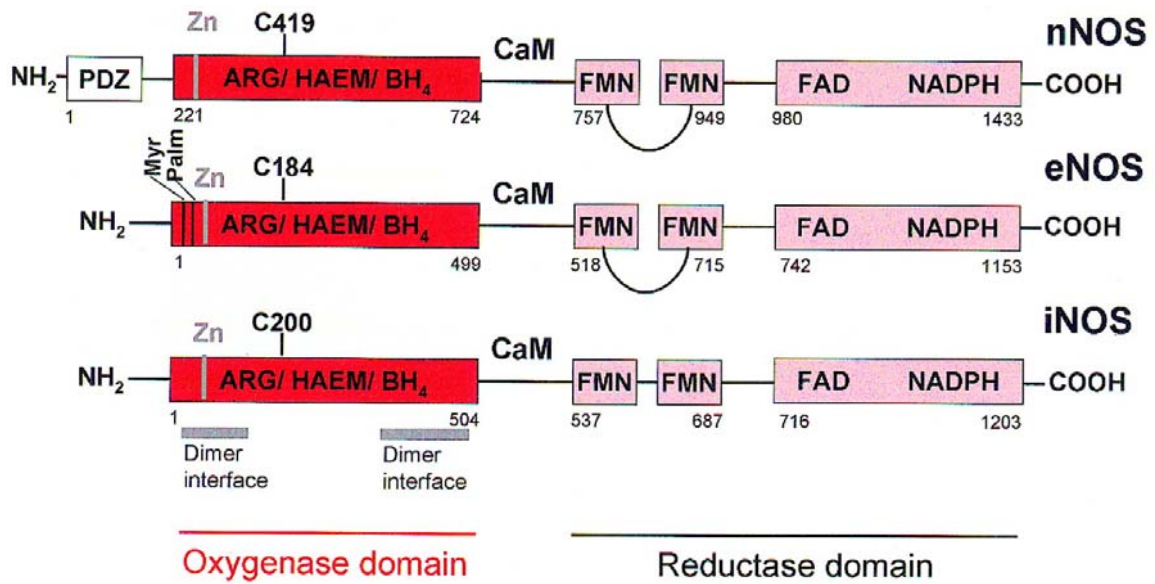


圖 1-7. 人類 nNOS、eNOS 與 iNOS 結構 (摘錄自 Alderton et al., 2001)。

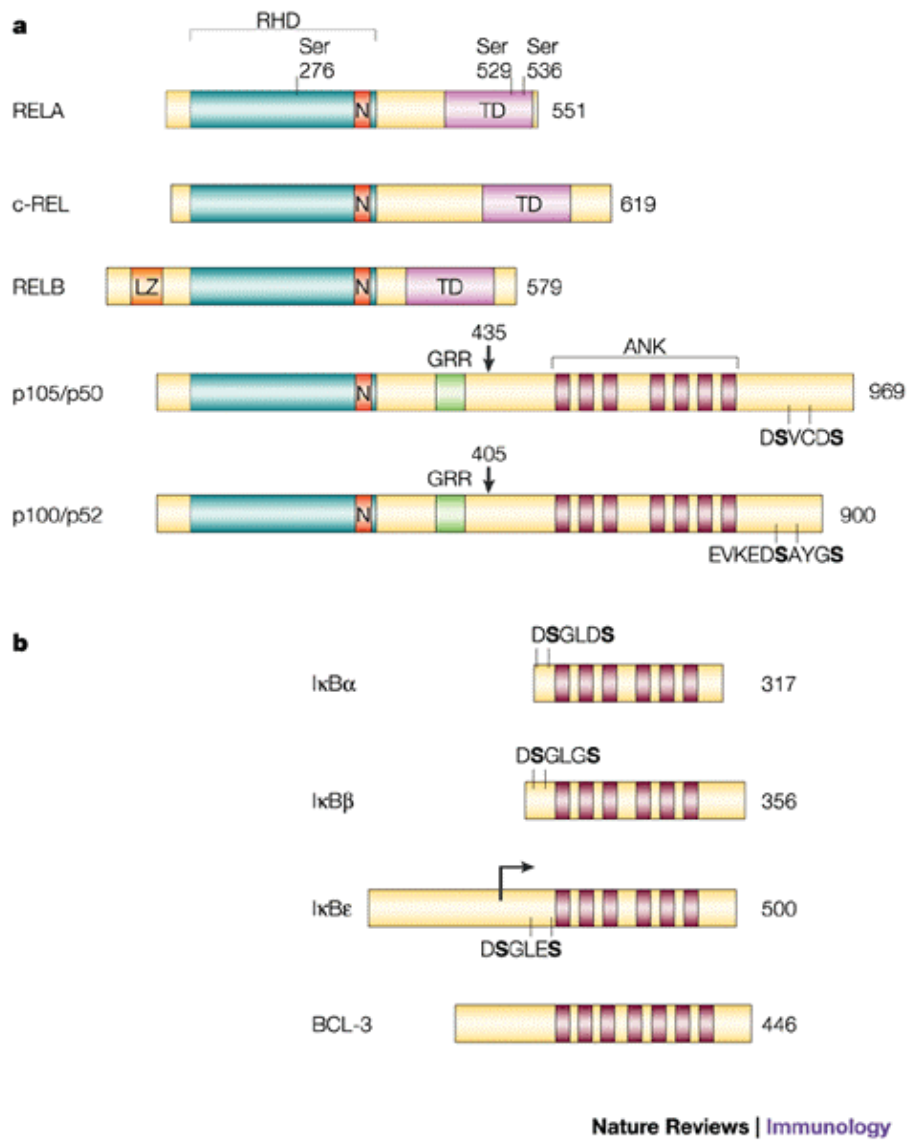


圖 1-8. NF- κ B 與 I κ B 蛋白 (摘錄自 Li and Verma, 2002)。

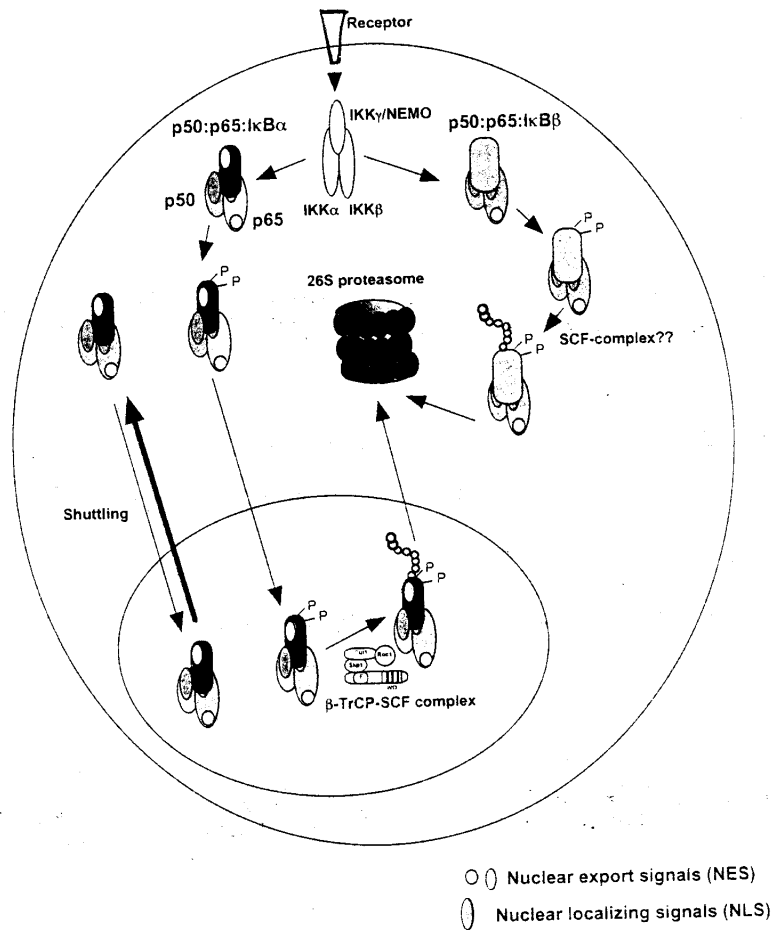


圖 1-9. IκB-α 和 IκB-β 以不同的模式來調節 NF-κB 的活性。IκB-α 與 NF-κB complex 會持續進出細胞核中，而 IκB-β 與 NF-κB complex 則存在細胞質中 (摘錄自 Ghosh and Karin , 2002)。

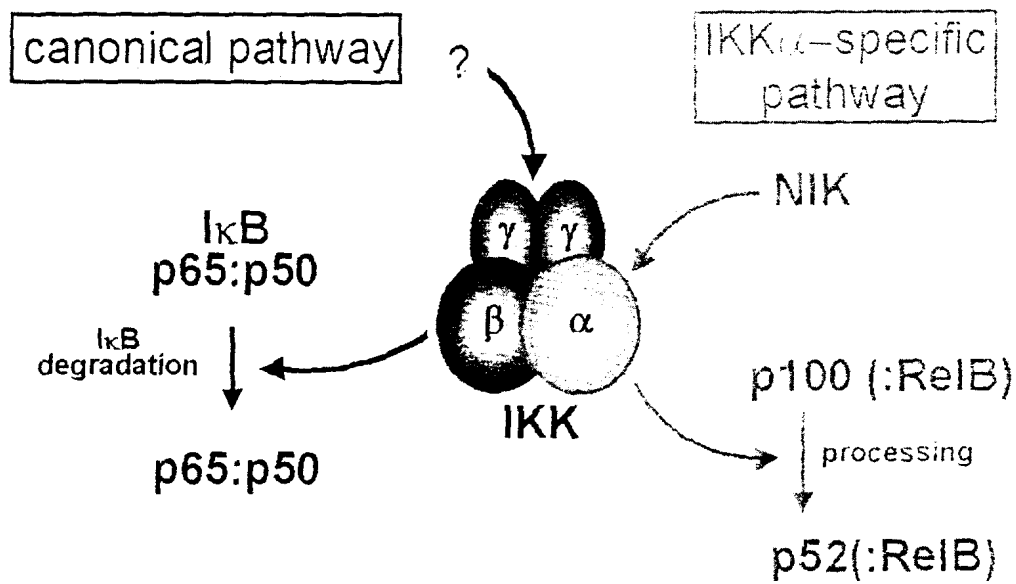


圖 1-10. 標準活化路徑與 IKK α /p52-specific NF- κ B 活化路徑的比較 (摘錄自 Senftleben and Karin, 2002)。

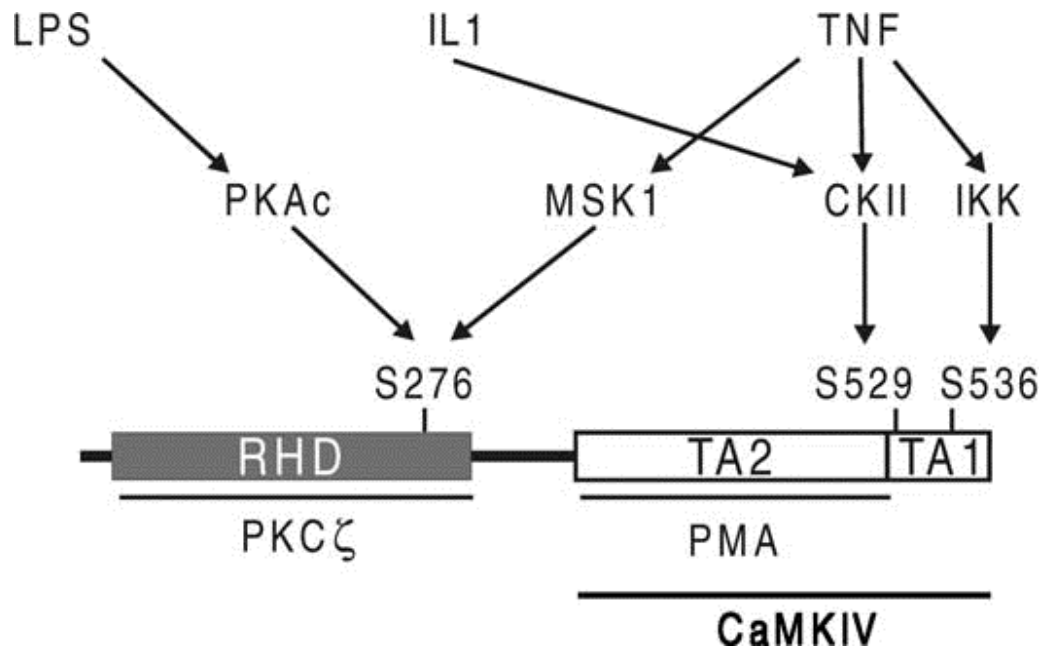
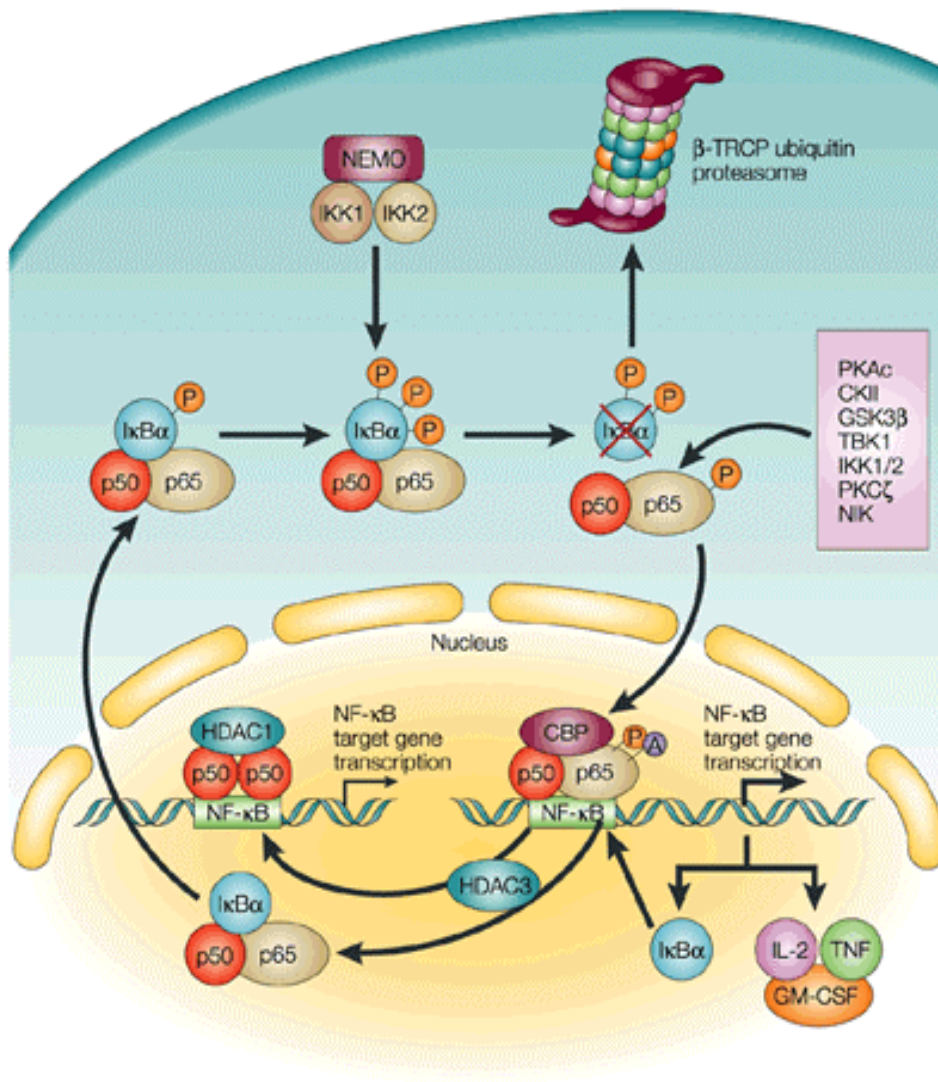


圖 1-11. 不同發炎物質的刺激造成 p65 上不同位置的磷酸化作用 (摘錄自 Vermeulen, 2002)。



Nature Reviews | Immunology

圖 1-12. NF-κB 訊息路徑 (摘錄自 Li and Verma, 2002)。

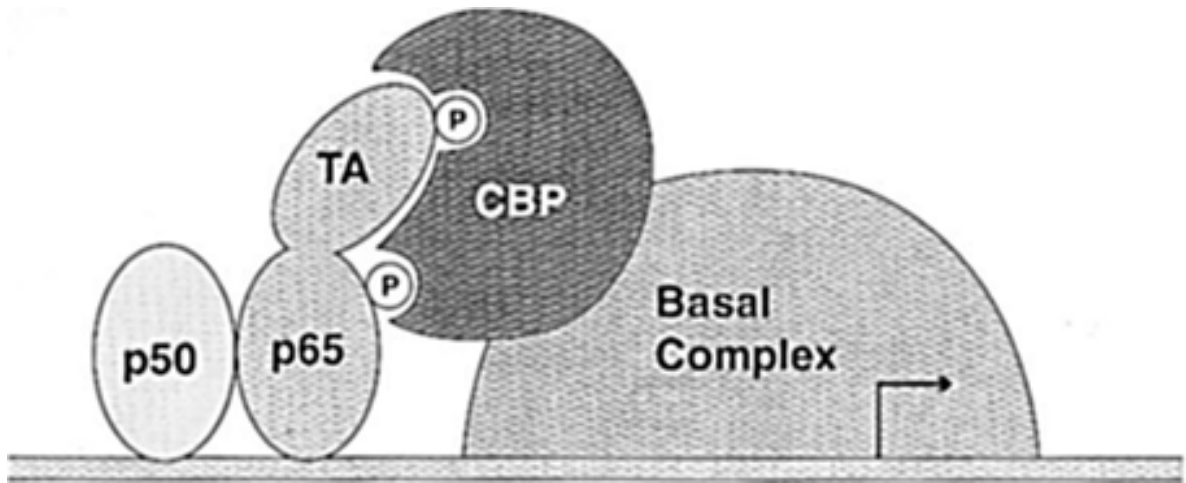


圖 1-13. 轉錄因子、共同活化因子與 basal complex 結合 (摘錄自 Guha and Mackman, 2001)。

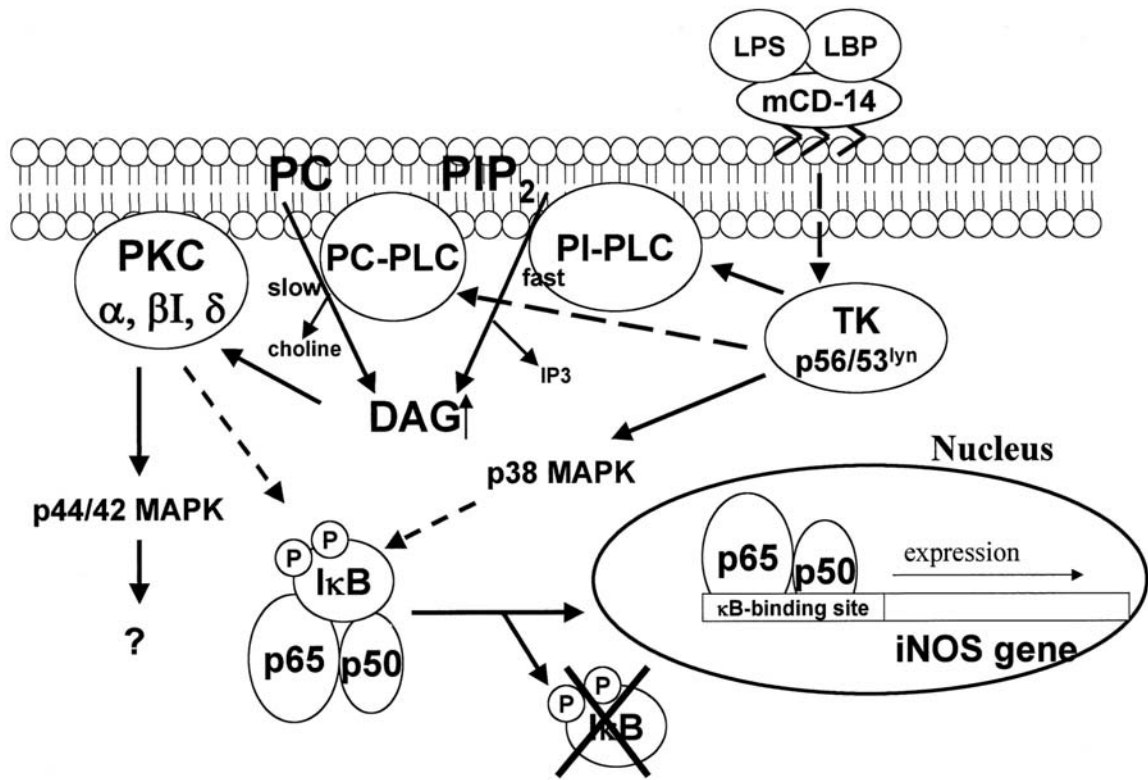


圖 1-14. RAW 264.7 細胞經由 LPS 活化 iNOS 基因的路徑 (摘錄自 Chen and Wang, 1999)。

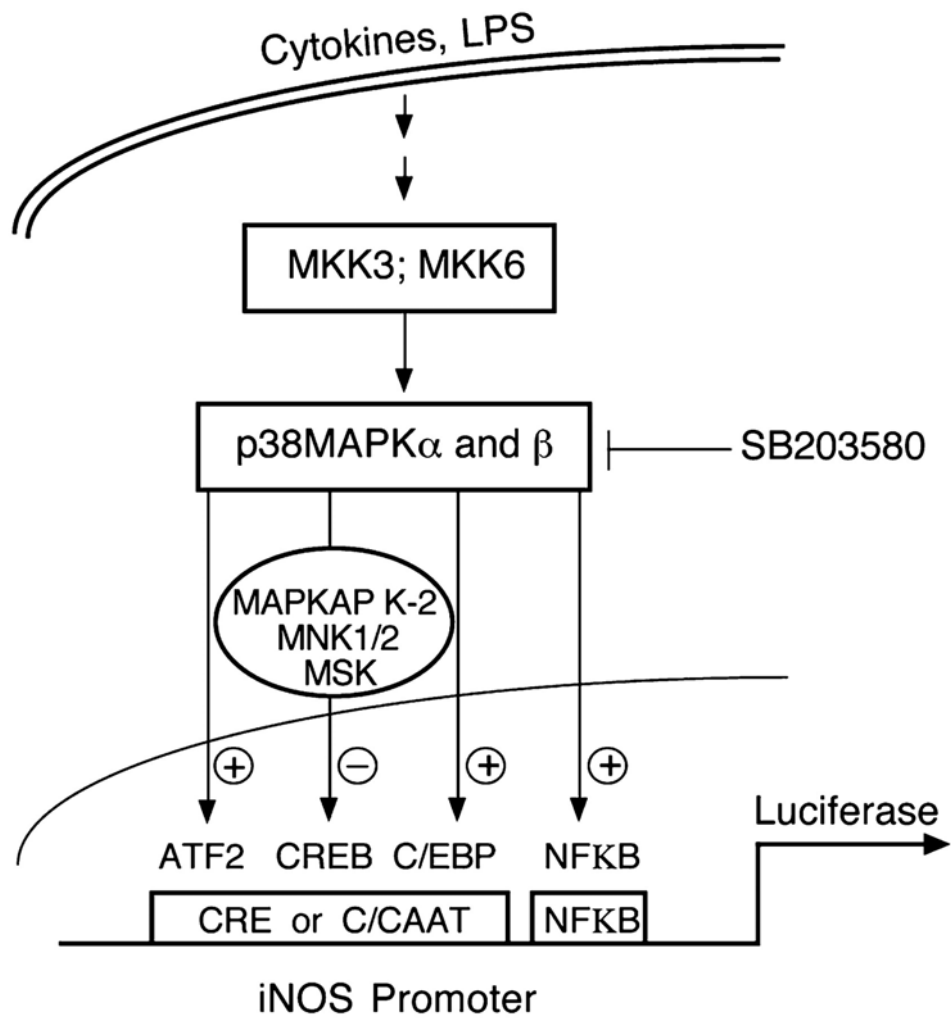


圖 1-15. 膠原細胞 (glial cells) 中 p38 MAPK 經由轉錄作用活化 iNOS 基因 (摘錄自 Bhat et al., 2002)。

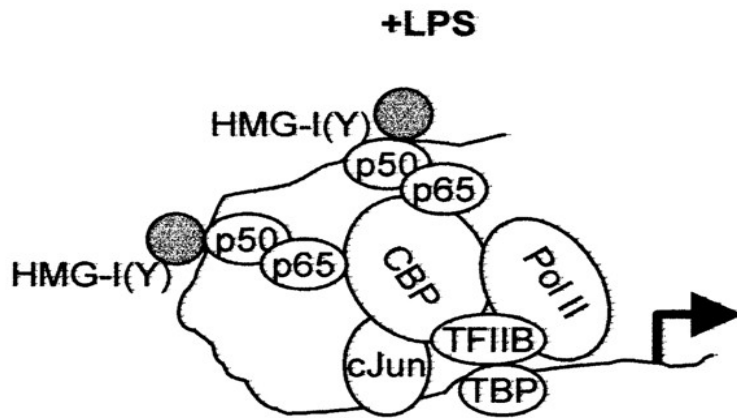


圖 1-16. LPS 刺激引發 NF- κ B 與轉錄因子結合 (摘錄自 Delgado and Ganea, 2001)。

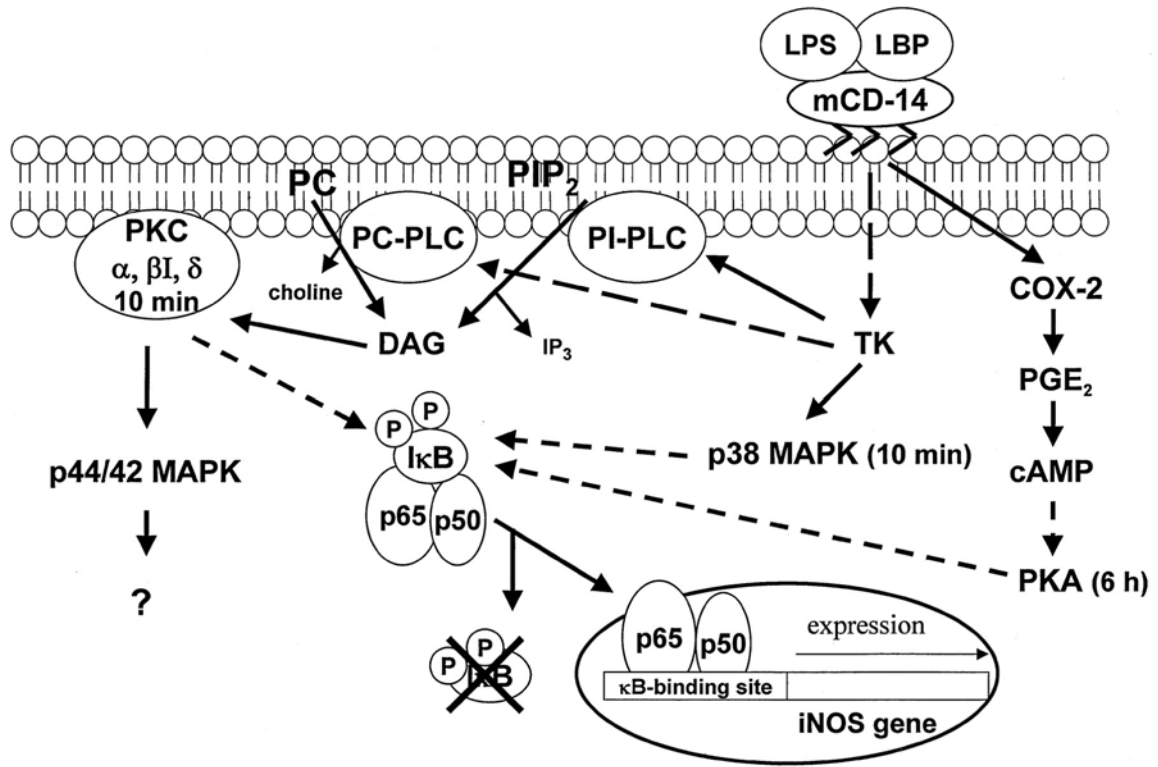


圖 1-17. RAW 264.7 細胞經由 LPS 活化 cAMP/PKA 路徑活化 iNOS 基因 (摘錄自 Chen et al., 1999)。

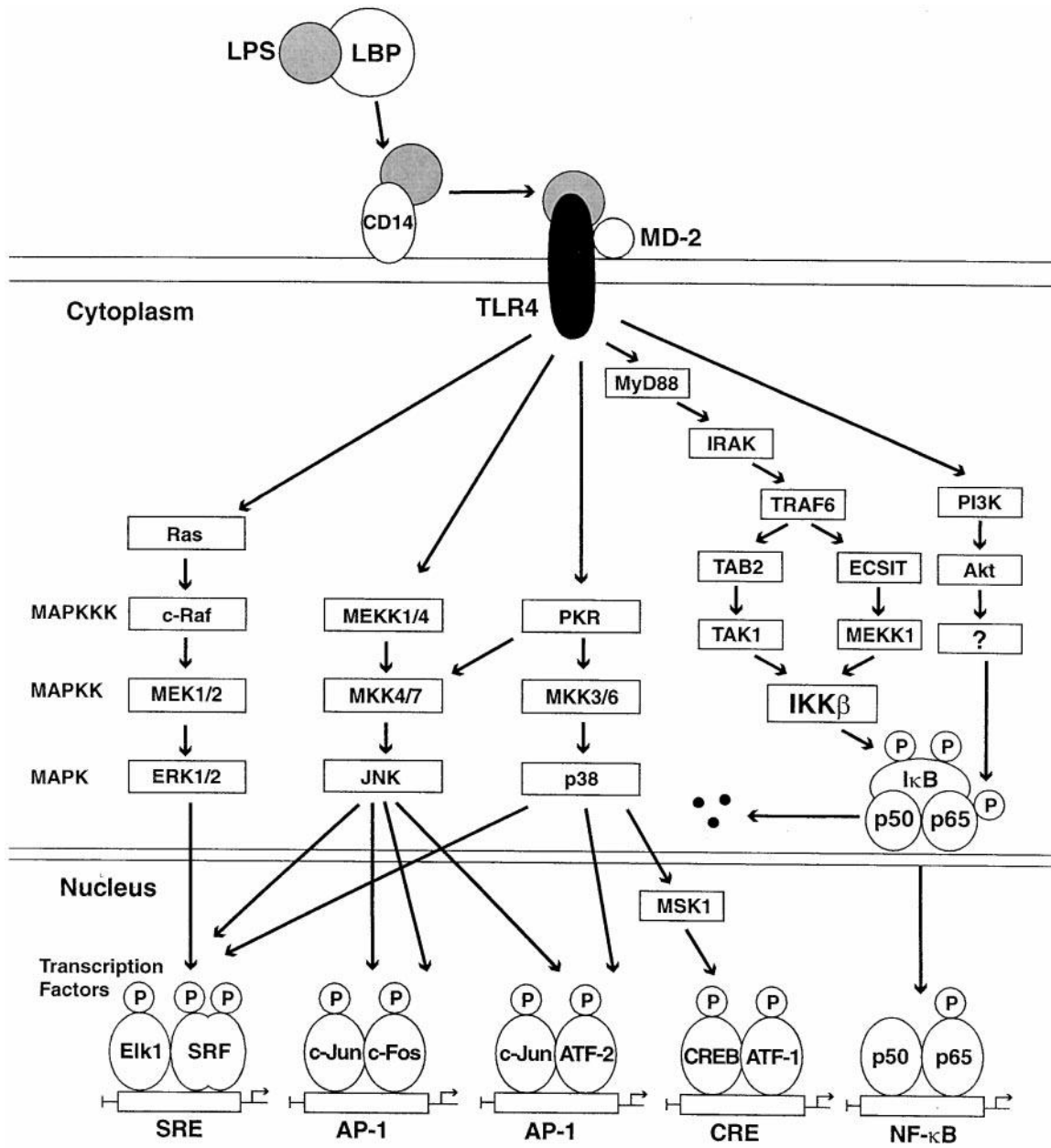


圖 1-18. LPS 刺激單核球細胞所活化的轉錄因子以及訊息傳導路徑 (摘錄自 Guha and Mackman, 2001)。

Genes for human NOS isoforms

Human NOS isoform	Gene structure and size	Chromosomal location	Number of amino acids (aa) in predominant form, protein size	Genbank accession numbers	References
nNOS (NOS-1)	29 exons, 28 introns, complex structural organization, locus over region of > 200 kbp	12q24.2–12q24.3 of chromosome 12	1434 aa, 161 kDa	L02881, U11422	[17,18]
iNOS (NOS-2)	26 exons, 25 introns, 37 kbp	17cen–q11.2 of chromosome 17	1153 aa, 131 kDa	L09210, L24553, X73029	[19–21]
eNOS (NOS-3)	26 exons, 25 introns, 21–22 kbp	7q35–7q36 of chromosome 7	1203 aa, 133 kDa	M93718, M95296	[22,23]

表 1-1. 人類 NOS isoforms 的基因 (摘錄自 Alderton et al., 2001)。

Genes expressed by LPS stimulated monocytes/macrophages	
Cytokines	TNF α
	IL-1
	IL-6
	G-CSF
	GM-CSF
	M-CSF
Chemokines	IL-8
	MCP-1
Receptors	Tissue factor
	IL-2 R α
Transcription factors	p50
	c-Rel
	Egr-1
	IRF-1
Inhibitors	I κ B α
Others	iNOS

表 1-2. LPS 刺激單核球細胞及巨噬細胞所引發的基因表現 (摘錄自 Guha and Mackman, 2001)。

第二章 CCY1a-C1 抑制 RAW 264.7 細胞生成一氧化氮的研究

一、實驗背景與目的

當細菌活化巨噬細胞時，會誘發細胞內的免疫反應以及發炎作用，而引發一氧化氮合成酶大量釋放一氧化氮，適量的一氧化氮可以毒殺外來病原菌，但是過量則會造成組織的傷害，引起慢性或急性發炎，例如：敗血症。如藥物能夠適當的控制細胞內複雜的訊息傳遞過程，則可避免因過量的一氧化氮所造成的細胞毒性及嚴重的發炎反應。從中國醫藥大學藥物化學研究所黃麗嬌、郭盛助教授提供一系列 benzyloxybenzaldehyde 類衍生化合物中，曾發現化合物 2-benzyloxy-benzaldehyde 可活化嗜中性白血球的 adenylyl cyclase (Chang et al., 2001)，抑制 formyl peptide 刺激嗜中性白血球生成超氧自由基 (Wang et al., 2003) 及 phospholipase D 的活化 (Wang et al., 2002)。此系統化合物經初步篩選工作，發現化合物 CCY1a-C1 具有較佳的抑制 LPS 刺激巨噬細胞生成一氧化氮的作用。本篇研究在探討 CCY1a-C1 抑制老鼠巨噬細胞生成一氧化氮的細胞內訊息傳導機制。

二、實驗材料及方法

(一) 實驗材料

CCY1a-C1 (> 99% 純度) 溶於 DMSO 。 RAW 264.7 mouse macrophage-like cell line 購自 American Type Culture Collection (Rockville, MD) 。 DMEM 、 penicillin 、 streptomycin 及 fetal bovine serum 購自 Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD) 。 ECL Western blotting reagent 及 Hybond-N⁺ nylon membranes 購自 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) 。 RezoTMCT reagent 購自 Protech Technology (Taipei, Taiwan) 。 Express Hyb hybridization solution 及 pNFκB-LUC 購自 BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) 。 Random primer fluorescein labeling kit 購自 DuPont-New England Nuclear Life Science (Boston, MA) 。 DIG gel shift kit 購自 Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany) 。 Polyvinylidene difluoride membrane 購自 Millipore (Bedford, MA, USA) 。 Cytotoxicity detection kit 購自 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) 。 Anti-mouse iNOS antibody 購自 Transduction (San Diego, CA, USA) 。 Phospho-IκB-α (Ser32) antibody 及 CREB antibody 和 phospho-CREB antibody 購自 New England Biolabs (Beverly, MA, USA) 。 Anti-IκB-α antibody 、 anti-IκB-β antibody 、 anti-p65 antibody 及 anti-p50 antibody 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 。 Dual-Luciferase reporter assay system 及 pRL-TK 購自 Promega (Madison, WI, USA) 。 LPS (from *Escherichia coli* serotype 0111: B4) 。 LipofectamineTM reagent 購自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 。 piNOS-LUC 由陳春榮博士提供 。

(二) RAW 264.7 細胞培養

RAW 264.7 細胞培養在 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

培養液中含有 10% FBS、penicillin (100 unit/ml) 以及 streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) 中，置於 37°C 含有 5% 二氧化碳細胞培養箱中。

(三) 測量細胞毒性

RAW 264.7 細胞 (5×10^4 cells/well) 種於 96-well plates，隔夜培養。以 phosphate-buffered saline (PBS) 沖洗後，加入 dimethyl sulphoxide (DMSO) 或藥物作用 24 小時。對照組加入 DMSO 並同時加入 5 μl 20% Triton X-100 (final 0.5%)。加入 DMSO 求得值作為 lactate dehydrogenase (LDH) 釋放 0%。另一對照組含有 0.5% Triton X-100，將此值作為 LDH 釋放 100 %。將上清液取出以 cytotoxicity detection kit (LDH) 來測量 490 nm 吸光值變化，spectraMAX 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)。

(四) 測量一氧化氮的生成

RAW 264.7 細胞 (2×10^5 cells/well) 種於 96-well plates，隔夜培養。以 PBS 沖洗。待加入 CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激細胞。反應 24 小時後取細胞上清液。將細胞上清液取出以 Griess reagent 來測量培養液中的 nitrite 濃度 (Minghetti et al., 1997)。將 150 μl 細胞上清液加入 5 mM sulfanilamide 40 μl 、2 M HCl 10 μl 及 40 mM *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine 20 μl ，在室溫下反應 10 分鐘。在 550 nm 下測定吸光值的變化。spectraMAX 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)。

(五) 測量 iNOS 酵素活性

RAW 264.7 細胞培養在 10-cm plate 中隔夜培養。待細胞長滿至 70%，加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激細胞 16 小時。以冰的 PBS 沖洗 2 次後丟棄，加入 5 ml PBS 將細胞打下，並懸浮均勻，進行細胞計數。經過離心 (200 g 10 分鐘 4°C) 後將 PBS 移除。以 lysis buffer (20 mM Tris-HCl、137 mM NaCl、1 mM PMSF、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstain A、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin 及 antipain) 將細胞數調整至 4×10^7 cell/ml。細胞經超音波震盪 40 次後，將細胞離心 (10,000 rpm, 30 分鐘)，取上清液測量細胞蛋白質濃度。以 lysis buffer 調整最終蛋白質濃度在 2 mg/ml。取 100 μl 溶液加入 CCY1a-C1 (5、10 μM) 5 分鐘，和對照組 L-NAME (1、3 mM)，加入 reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM NADPH、2 mM L-arginine、10 μM FAD) 100 μl ，在室溫下作用 3 小時。加入 reduction buffer (0.1 unit/ml nitrate reductase、0.1 mM NADPH、及 5 μM FAD)。在 37°C 下反應 15 分鐘後，加入 10 unit/ml L-LDH 及 10 mM pyruvate 來停止反應。最後取出 150 μl 再加入 Griess reagent 於 550 nm 下測量吸光值的變化。(Wang et al., 2001)。

(六) 測量細胞中 iNOS 酵素的表現

RAW 264.7 細胞培養在 35-mm plate，放置培養箱中隔夜培養。加入 CCY1a-C1 (1、3、5、10 μM) 或 DMSO 作用 1 小時後，加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激細胞。作用 24 小時後，將細胞上清液丟棄。以冰的 PBS 沖洗 2 次，加入 100 μl Laemmli buffer (Laemmli, 1970)。將細胞刮下，並在沸騰的水溶液中隔水加熱 20 分鐘。離心取上清液，測量蛋白質濃度。蛋白質以 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE) 展開後，轉移至 polyvinylidene difluoride 膜上。以含 5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) 充填 1 小時後，用 iNOS 抗體反應來辨識。經過 TBST buffer 清洗後再以 1:10,000 (v/v) horseradish peroxidase labeled IgG 抗體在室溫下作用 1 小時。利用 ECL reagent 來偵測。辨識後的 polyvinylidene difluoride 膜，利用 stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、100 mM 2-mercaptoethanol、2% SDS) 在 50°C 清洗 30 分鐘後，再次充填膜後。並以 β -tubulin 抗體辨識。

(七) 測量細胞中 iNOS mRNA 的表現

RAW 264.7 細胞培養在 10-cm plate 中，隔夜培養。待細胞長滿至 60%，以 PBS 沖洗一次後加入 6 ml 培養液及不同濃度的 CCY1a-C1 混合均勻，放入培養箱中作用 1 小時。然後加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激細胞，放入培養箱中作用 24 小時。細胞反應結束之後，以冰的 PBS 沖洗 2 次，將 plate 中剩餘的 PBS 丟棄。加入 1 ml REzol[®] reagent 將細胞刮下，分離出細胞中的 total RNA。取 RNA (20 μ g) 濃縮後加入 glyoxal mixture (glyoxal、50% DMSO、10 mM phosphate buffer pH 6.8) 55°C 下作用 1 小時 (Thomas, 1980)。跑 1% agarose gel，轉移至 hybond-N⁺ 膜上。以 UV cross-link 2 次，以 20 mM Tris-HCl pH 8.0 在 60°C 下搖 5 分鐘，加入 prehybridization solution 60°C 下作用 30 分鐘，然後加入 iNOS 及 GAPDH probe 60°C 放置隔夜。iNOS cDNA probe 的製做是利用 reverse transcription 的 polymerase chain reaction amplification (PCR) [geneAmp[®] PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, Boston, USA)] 以及 primers: 5'-TCATTGTACT-CTGAGGGCTGACACA-3' (sense), 5'-GCCTTCAAAC-

CAAGGTTGTCTGCA-3' (antisense) (Hecker et al, 1996) 並以 random primer fluorescein labeling kit 來標識。以含 0.5% blocking reagent 的 detection buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5、0.15 M NaCl) 充填。加入含抗 fluorescein- HRP-conjugate Ab 的 detection buffer，以 chemiluminescence 來偵測。

(八) 測量細胞中 mRNA 的穩定性

RAW 264.7 細胞培養在 10-cm plate 中，隔夜培養。待細胞長滿至 80%，加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激細胞 12 小時。以 PBS 沖洗 2 次。加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (10 μ M) 並同時加入 actinomycin D (10 μ g/ml)，在作用 0、1、2、4、8 小時後加入 REzol reagent 抽取 total RNA，之後步驟如同 (七)。

(九) 測量 I κ B- α 及 I κ B- β 分解及 I κ B- α 、p38 MAPK、CREB 的磷酸化

RAW 264.7 細胞培養在 35-mm plate，放置培養箱中隔夜培養。待細胞長滿至 80%，加入 CCY1a-C1 (1、3、5、10 μ M) 或 DMSO。作用 1 小時後，加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激細胞 0 或 30 分鐘。將細胞上清液丟棄，以冰的 PBS 沖洗 2 次。加入 150 μ l Laemmli sample buffer，將細胞刮下，並在沸騰的水溶液中隔水加熱 20 分鐘。離心取上清液測量蛋白質濃度。蛋白質以 10% SDS-PAGE 展開後，轉移至 polyvinylidene difluoride 膜上。以含 5% (w/v) 脫脂奶粉的 TBST Buffer 充填 1 小時後，用 I κ B- α 、I κ B- β 、anti-phospho-I κ B- α (S32)、anti-phospho-p38 MAPK、或 anti-phospho-CREB 抗體反應來辨識。辨識後的 polyvinylidene difluoride

膜，利用 stripping buffer 在 50°C 清洗 30 分鐘後，再次充填膜。並以 β -tubulin、anti-p38 MAPK、或 anti-CREB 抗體辨識。

(十) NF- κ B 的 DNA 結合作用

1) 製備細胞核萃取液

細胞核萃取液製備參考 (Chen et al., 1998)。RAW 264.7 細胞培養在 10-mm plate 中，隔夜培養。待細胞長滿至 80%，以 PBS 沖洗一次後，加入 6 ml 培養液，加入 CCY1a-C1 (1、5、10 μ M) 或 25 μ M pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 混合均勻，放入培養箱中作用 1 小時。然後再加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激細胞，放入培養箱中作用 24 小時。細胞反應結束之後，以冰的 PBS 沖洗兩次，將 plate 中剩餘的 PBS 丟棄。加入 PBS 將細胞刮下後離心 (200 g 10 分鐘)。沈澱的細胞以 1 ml hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH7.9、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM dithiothreitol、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄) 混合均勻，置於冰上 15 分鐘，並時常混合均勻，再加入 50 μ l 10% NP-40 (final 0.5%) 並混合均勻 10 秒，離心 (12,000 g 30 秒) 上清液丟棄，將沈澱物再懸浮在 10-20 μ l extraction buffer 中 (20 mM HEPES pH 7.9、400 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM dithiothreitol、0.5 mM PMSF、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄) 置於冰上 15 分鐘，並時常混合均勻，離心 (12,000 g 10 分鐘 4°C)，取上清液蛋白並貯存在 -70°C 中。

2) Electrophoreic mobility shift assay (EMSA)

合成一氧化氮合成酶 promoter 在 κ B binding site (-92 to -65) (oligonucleotide sequence 5'-tcgaCCAACCTGGGGACTCTCCCTTTGGGAA CA-3') (Martin et al., 1994; Velasco et al., 1997)。取 5 μ g 細胞核的萃取物加入 binding reaction mixtures 含 1 μ g poly (dI-dC)、1 μ l DIG-labeled NF- κ B probe、2 μ l 5 倍濃度 binding buffer (75 mM HEPES pH 7.6、400 mM NaCl、5 mM EGTA、50% glycerol、5 mM DTT、及 H₂O) 在 30°C 下作用 20 分鐘後，置於冰上。加入 2.5 μ l loading buffer，以 6% native-PAGE 來進行分離。轉移至 nylon membrane 上，UV cross-link 兩次。再以 wash buffer (0.1 M maleic acid、0.15 M NaCl pH 7.5、0.3% Tween 20) 輕洗 5 分鐘。以 1% blocking buffer 充填 30 分鐘後，加入 1 μ l anti-digoxigenin-AP (1:10000) 在 10 ml 的 blocking solution 中作用 30 分鐘。以 wash buffer 清洗兩次，各 15 分鐘。再以 detection buffer (0.1 M Tris-HCl、0.1 M NaCl pH 9.5) 沖洗一次 5 分鐘。再加入含 20 μ l CSPD[®] substrate 的 2 ml detection solution 中搖動 5 分鐘，置於 37°C 下 15 分鐘後壓片。

(十一) 測量細胞中 cAMP

RAW 264.7 細胞 (2×10^5 cells/well) 種於 96-well plates，隔夜培養。以 PBS 沖洗1次後，加入CCY1a-C (3-10 μ M)，作用 1 小時。加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激細胞，作用 6或 12 小時後加入200 μ l lysis buffer (0.25% dodecyltrimethylammonium bromide) 作用 10 分鐘，收集細胞上清液，利用enzyme immunoassay kit來測量細胞內cAMP的濃度。在 OD 450 nm

波長下測量吸光值的變化。spectraMAX 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)。

(十二) Plasmids, 短期轉染 及 reporter 表現

1) DNA 製備

先挑取單一菌落至 5 ml 含 100 µg/ml ampicillin 之 LB 中。於 37°C 培養箱中，以 230 rpm 震盪 8 小時後，倒入 250 ml LB 中。置於 37°C 培養箱中，培養 16 小時。使用 Maxi kit (Qiagen) 製備 DNA。菌液以 7,000 rpm 4°C 離心 15 分鐘。將沉澱物以 10 ml buffer P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA、100 µg/ml RNase A) 再懸浮。再加入 10 ml buffer P2 (200 mM NaOH、1% SDS) 並輕微搖晃 4-6 次後，放置室溫下 5 分鐘。加入 10 ml buffer P3 (3 M potassium acetate pH 5.5) 馬上混合均勻，並輕微上下來回轉動。放置於冰上 20 分鐘，每 5 分鐘搖動一次。以 12,000 rpm 4°C 離心 15 分鐘。取上清液至新的離心管中，再次離心 12,000 rpm 4°C 5 分鐘。將上清液倒入先以 10 ml QBT buffer (750 mM NaCl、50 mM MOPS pH 7.0、15% isopropanol、0.15% Triton X-100) 平衡過之層析柱，以 30 ml QC buffer (1 M NaCl、50 mM MOPS pH 7.0、15% isopropanol) 清洗兩次。再以 15 ml QF buffer (1.25 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.5、15% isopropanol) 洗入離心管中。加入 10.5 ml isopropanol 沈澱 DNA。於 12,000 rpm 4°C 離心 30 分鐘後，吸去上清液。加入 5 ml 70% 乙醇後，離心 12,000 rpm 10 分鐘。所得沉澱物即為 DNA。乾燥之後，回溶於 500 µl TE buffer，以 U-3210 Spectrophotometer (Hitach) OD₂₆₀ 測定

DNA 之濃度。

2) lipofectamine-DNA 混合液製備

分別取 piNOS-Luc、pNF- κ B-Luc DNA 2.5 μ g 以及 pRL-TK 0.5 μ g 至 100 μ l 不含血清及抗生素的培養液小心的混合均勻。取 10 μ l liposome 至 100 μ l 不含血清及抗生素的培養液製成 lipofectamine reagent。再將 DNA 與 lipofectamine reagent 小心的混合均勻，放置室溫作用 30 分鐘。

3) 短期轉染

RAW 264.7 (4×10^5 cell/well) 種於 6 well plate 上，放置 37°C 培養箱中隔夜培養。待細胞密度為 60-70% 時以 2 ml 不含血清培養液沖洗細胞一次。加入 0.8 ml 不含血清培養液至 well 中，將 lipofectamine-DNA 混合懸浮液 200 μ l 均勻的滴在 well 中，將細胞放置 37°C 培養箱中培養 6 小時。加入 1 ml complete medium (含 20% serum, 200 unit/ml penicillin 以及 200 μ g/ml streptomycin) 至 well 中，放置 37°C 培養箱中隔夜培養。以不含血清培養液沖洗細胞一次。加入培養液 (2 ml) 及 CCY1a-C1 混合均勻，放入培養箱中作用 1 小時。加入 1 μ g/ml LPS 刺激細胞，並放入培養箱中作用 6 小時。細胞反應結束之後，以冰的 PBS 沖洗 2 次，將 plate 中剩餘的 PBS 丟棄。加入 passive lysis buffer 250 μ l，將細胞刮下並混合均勻。將 cell lysates 重複冰凍解凍數次後。接著測 firefly luciferase activity 和 renilla luciferase activity。

4) 測量 firefly luciferase 和 renilla luciferase 活性

取 cell lysates 20 μ l 置入試管中，並放入 Biorbit 1251 luminometer 中。注入 100 μ l luciferase assay reagent II 至試管中，混合均勻，並紀錄 12 秒 firefly luciferase 產生的螢光值。然後注入 100 μ l Stop and Glo reagent 混合均勻，並紀錄 12 秒 renilla luciferase 產生的螢光值。

(十三) 統計分析

實驗數據以 mean \pm S.E.表示。統計上使用 Student's *t*-test 或先以 ANOVA 分析，再經 Bonferroni *t*-test 來比較差異。分析結果以 *P* 值小於 0.05 視為有統計上的差異。分析 regression line 來定藥物抑制作用的 IC₅₀ 值。

三、結果

(一) CCY1a-C1 對一氧化氮生成之影響及細胞毒性

收集 LPS 刺激細胞 24 小時後的上清液，利用 Griess method 測量 CCY1a-C1 對一氧化氮生成之影響。CCY1a-C1 以濃度依存性的方式抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞生成一氧化氮 (圖 2-1)。CCY1a-C1 於 5 μM 時即有顯著的抑制效果 ($30.8 \pm 3.6\%$ 抑制, $P = 0.047$)。當濃度增加到 10 μM 可達到 $50.6 \pm 3.4\%$ 的抑制效果, IC_{50} 值為 $7.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ 。利用 trypan blue 細胞染色法與細胞釋放 LDH 偵測方法，測量 CCY1a-C1 對細胞毒性的影響，發現加入 10 和 15 μM CCY1a-C1 均不會造成細胞毒性 (表 2-1)。

(二) CCY1a-C1 對 iNOS 酵素活性之影響

LPS 刺激細胞 16 小時後，將細胞打破，加入 CCY1a-C1 測量 iNOS 酵素活性。結果顯示 CCY1a-C1 不會影響 iNOS 酵素活性 (對照組生成一氧化氮 $42.0 \pm 1.5 \text{ nmole/mg protein}$ ，加入 10 μM CCY1a-C1 實驗組為 $43.9 \pm 1.2 \text{ nmole/mg protein}$ ， $P > 0.05$)。NOS 抑制劑 *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 1 mM 明顯抑制 iNOS 酵素活性 ($17.1 \pm 3.8 \text{ nmole/mg protein}$, $58.8 \pm 10.1\%$ 抑制)，在 3 mM 時一氧化氮生成量為 $14.5 \pm 3.5 \text{ nmole/mg protein}$ ，抑制程度為 $65.2 \pm 8.6\%$ (圖 2-2)。

(三) CCY1a-C1 對 iNOS 蛋白及 mRNA 表現之影響

利用 Western blot 來測量 CCY1a-C1 對於 iNOS 蛋白的表現。在未刺激的 RAW 264.7 細胞中偵測不到 iNOS 蛋白的表現。LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 24 小時後，iNOS 蛋白明顯的表現出來 (圖 2-3)。CCY1a-C1 以濃度依存性的方式抑制 iNOS 蛋白的表現。CCY1a-C1 於 3 μM 時即有顯著的抑制效果 ($38.0 \pm 13.0\%$ 抑制, $P = 0.016$)。當濃度增加到 10 μM 可達到 $86.0 \pm 3.6\%$ 的抑制效果， IC_{50} 值為 $3.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 。

(四) CCY1a-C1 對 iNOS mRNA 表現及穩定性之影響

利用 Northern blot 來測量 CCY1a-C1 對於 iNOS mRNA 表現。LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 24 小時後，iNOS mRNA 明顯的表現出來 (圖 2-4)，10 μM CCY1a-C1 可達到 $61.7 \pm 6.7\%$ 的抑制效果。CCY1a-C1 抑制 iNOS mRNA 的 IC_{50} 值為 $7.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$ 。CCY1a-C1 不會影響 GAPDH 基因的表現。進一步探討 CCY1a-C1 抑制細胞內 iNOS mRNA 含量，是否經由加速 iNOS mRNA 的分解。可加入 actinomycin D 抑制 RNA 的轉錄合成來測量 LPS 刺激 0、1、2、4、8 小時後的 iNOS mRNA 含量變化。結果顯示 CCY1a-C1 不會增加 iNOS mRNA 的分解作用 (圖 2-5)。

(五) CCY1a-C1 對 I κ B- α 的分解及磷酸化之影響

I κ B- α 可抑制 NF- κ B 的活化。利用 Western blot 測到在 LPS 刺激細胞 0-120 分鐘的實驗中，I κ B- α 的分解作用在 LPS 刺激 30 分鐘時最大，而在接近 1 小時回復 (圖 2-6)。而 CCY1a-C1 對於 LPS 刺激不同時間所

造成的 I κ B- α 分解作用並無影響 ($-12.9 \pm 9.2\%$, $P > 0.05$) (圖 2-6)。在加入不同濃度 CCY1a-C1 (5 或 10 μ M) 再以 LPS 刺激 30 分鐘時所造成的 I κ B- α 分解作用並無明顯影響 (圖 2-7)。誘導 I κ B 的分解作用與 I κ B- α N-端調節區域被磷酸化有關 (DiDonato et al., 1996)。故進一步探討 CCY1a-C1 對於 I κ B- α 的磷酸化作用。在測量 I κ B- α 的磷酸化作用時，細胞要加入非專一性蛋白質酶抑制劑 (20 μ M MG132) 來抑制 proteasome 對 I κ B- α 的分解作用。並利用偵測 I κ B- α 作為標準化的工具。而 CCY1a-C1 不會影響 I κ B- α 磷酸化作用 ($13.2 \pm 3.8\%$ 抑制, $P > 0.05$) (圖 2-8)。

(六) CCY1a-C1 對 I κ B- β 分解之影響

在 LPS 刺激細胞 0-120 分鐘的實驗中，I κ B- β 的分解作用在 LPS 刺激 30 分鐘時最大，而在接近 2 小時有部分回復 (圖 2-9)。CCY1a-C1 (10 μ M) 會抑制 I κ B- β 分解 (圖 2-9)。CCY1a-C1 在 5 μ M 時會些微抑制 I κ B- β 的分解作用 ($18.0 \pm 6.0\%$)，而在 10 μ M 時會明顯的抑制 I κ B- β 的分解 ($59.0 \pm 18.0\%$) (圖 2-10)。此結果皆顯示出 CCY1a-C1 的作用機轉可能與抑制 NF- κ B 這條路徑有關。抑制的路徑主要為抑制了 I κ B- β 分解，並不抑制 I κ B- α 分解以及 I κ B- α 的磷酸化作用。

(七) CCY1a-C1 對 NF- κ B 結合 DNA 之影響

利用 EMSA 來測量 NF- κ B 與 DNA 的結合活性。在 LPS (1 μ g/ml) 刺激 1 小時的細胞，取出細胞核萃取蛋白，與 DIG label 的探針 (含 iNOS

promoter 上 κ B 序的 oligonucleotide) 反應。發現 NF- κ B 與 DNA 結合活性會明顯的上升。加入 CCY1a-C1 10 μ M 則會抑制 NF- κ B 與 DNA 的結合活性 (圖 2-11)。PDTC 為 NF- κ B 的抑制劑 (Schreck R et al., 1992)，會減少 NF- κ B 在核內與 DNA 的結合。CCY1a-C1 本身並不會影響 NF- κ B 的結合活性。利用 Western blot 來測量 p65、p50 轉移至細胞核內的情形，發現以 LPS 刺激 30 分鐘時細胞核中 p65、p50 的量達到最大，並持續表現到 60 分鐘。120 分鐘後 p65、p50 慢慢下降。加入 CCY1a-C1 10 μ M 可延緩 LPS 刺激 p65 的轉移作用 (圖 2-12)。CCY1a-C1 對於 p50 的轉移作用並不影響。

(八) CCY1a-C1 對 p38 MAPK 磷酸化之影響

細胞加入 CCY1a-C1 10 μ M 反應 1 小時後，以 LPS (1 μ g/ml) 刺激 0、15、30、60 分鐘。在 LPS 刺激 15 分鐘後開始偵測到 p38 MAPK 磷酸化，30 分鐘達到最大值，而 60 分鐘後磷酸化程度下降。CCY1a-C1 並不影響 LPS 引起的 p38 MAPK 磷酸化的作用 (圖 2-13)。

(九) CCY1a-C1 對 cAMP 生成與 CREB 活化之影響

細胞以 LPS (1 μ g/ml) 刺激 0、1、3、6、12、24 小時後，發現在 6 小時後 cAMP 濃度會明顯的增加 (3.4 倍增加)，刺激 12 小時後達到最大值 (5 倍增加)，24 小時後出現下降 (圖 2-14)。細胞加入 CCY1a-C1 (3-10 μ M) 不會影響 LPS 刺激引起的 cAMP 生成 (圖 2-15)。cAMP 能夠調節 NF- κ B 的活化與 iNOS 的轉錄作用，是經由 PKA 來磷酸化 cAMP response element-binding protein (Walton and Rehfuss, 1990)。進一步探討藥物對於

細胞內 CREB 磷酸化的影響。細胞經 LPS 刺激 30 分鐘時，CREB 磷酸化達到最高值 (增加了兩倍) (圖 2-16)。CCY1a-C1 (1-10 μ M) 不影響 CREB 的磷酸化 (圖 2-17)。

(十) CCY1a-C1 對 NF- κ B 轉錄活性之影響

為了更進一步的探討 CCY1a-C1 對於 NF- κ B 轉錄活性的影響，將 RAW 264.7 巨噬細胞進行短期轉染。將含有 4 個 tandem copies NF- κ B 序列，連接著 luciferase 基因的 reporter plasmid (pNF- κ B-Luc)，藉由 liposome 的攜帶轉染至細胞當中。利用 luminometer 測量 luciferase 的活性，來表示 NF- κ B 轉錄的活性。LPS 刺激細胞時，luciferase 的活性會明顯的比未刺激時增加 7 倍。加入 5 μ M CCY1a-C1 時會些微的減少 ($17.1 \pm 3.4\%$)。加入 10 μ M CCY1a-C1 時 luciferase 的活性會被抑制 ($38.9 \pm 10.5\%$, $P = 0.000$) (圖 2-18)。

(十一) CCY1a-C1 對 iNOS 轉錄活性之影響

為了瞭解 CCY1a-C1 對於 iNOS 轉錄活性的影響，將含有 iNOS promoter 序列連接著 luciferase 基因的 reporter plasmid (piNOS-Luc) 轉染至細胞當中。利用 luminometer 測量 luciferase 的活性，表示 iNOS 轉錄的活性。LPS 刺激細胞時 luciferase 的活性會明顯的增加 4.7 倍。加入 10 μ M CCY1a-C1 時 luciferase 的活性會被抑制 ($24.4 \pm 6.6\%$, $P = 0.033$) (圖 2-19)。

四、討論

CCY1a-C1 為 benzyloxybenzaldehyde 類新合成的化合物。在 RAW 264.7 細胞中抑制了由 LPS 所引發的一氧化氮生成 (圖 2-1)。藉由測定 CCY1a-C1 的細胞毒性來證明抑制一氧化氮的生成並非藥物本身的毒性所致。在以 trypan blue (數據未呈現) 和 LDH release assay 以及 housekeeping GAPDH 基因的表現測定結果, 均發現 CCY1a-C1 並不會引起細胞毒性。再進一步測量 cell free 的 iNOS 酵素活性。顯示 CCY1a-C1 並不會經由直接抑制 iNOS 的酵素活性來抑制一氧化氮生成。

使用 Wester blot 及 Northern blot 來測量 iNOS 蛋白及 mRNA 的表現, 顯示 CCY1a-C1 可抑制 iNOS 蛋白及 mRNA 的表現。有報導顯示提高 iNOS mRNA 的穩定性能夠增加 iNOS 表現 (Weisz et al., 1994)。CCY1a-C1 並沒有使 iNOS mRNA 分解加速。因此由以上結果得知 CCY1a-C1 抑制一氧化氮生成是經由抑制 iNOS mRNA 轉錄作用, 進而抑制 iNOS 的表現。

當細胞受到 LPS 刺激誘發 iNOS 基因表現, 其中 NF- κ B 活化扮演主要的角色 (Xie et al., 1994)。而 NF- κ B 的活化會受到抑制性蛋白 I κ B 的調控 (Ghosh et al., 1998; Karin, 1999b)。已知在未受刺激的細胞中 NF- κ B 會與 I κ B- α 和 I κ B- β 結合形成不活化態 (Baldwin, 1996)。當細胞受到刺激時, I κ B 會磷酸化並快速的分解, 造成 NF- κ B 的核轉移作用, 並結合在 promoter 序列上誘導基因表現 (Henkel et al., 1993)。在本文所做的 EMSA 的實驗中以 LPS 刺激細胞 60 分鐘時會誘發出最強的兩個與 κ B 結合的複合物。有人報導過, 這兩個複合物經分離之後, upper band 的組成為 p50/Rel A (p65) heterodimers, 而 lower band 的組成為 p50 homodimers (Xie et al., 1994)。而 CCY1a-C1 能抑制 NF- κ B 與 DNA 的結

合活性。接著再測量 CCY1a-C1 會抑制 p65 核轉移，對於 p50 並不影響。在細胞開始受到 LPS 刺激時會造成 p50 的核轉移作用，隨著刺激時間的增加至 120 分鐘細胞核內的 p50 表現量仍然持續發生，這樣的結果與 (Xia et al., 2000; Zhong et al., 2002) 研究結果一致。由此結果推測 CCY1a-C1 抑制了 p65 的核轉移作用，並且抑制 NF- κ B 與 DNA 結合。雖然無法完全排除掉 CCY1a-C1 可能抑制其它的轉錄因子，但在 NF- κ B promoter 分析結果中，也顯示 CCY1a-C1 可明顯抑制 luciferase 的表現。

NF- κ B 活化的過程中，除了會快速造成 I κ B- α 的分解，也會快速合成新的 I κ B- α 。因 I κ B- α 含有 NES，所以新合成的 I κ B- α 能夠由細胞核回到細胞質中 (Arenzana-Seisdedos et al., 1997)，並帶回與 DNA 結合的 NF- κ B (Sun et al., 1993)。當新合成的 I κ B- β 產生出來後，會被快速的在 C-端磷酸化，並同樣的具備了 I κ B- α 抑制 NF- κ B 活化的功能 (Velasco et al., 1997)。在 I κ B- α 與 I κ B- β 所扮演的角色上 I κ B- α 被認為與 NF- κ B 快速活化有關，而 I κ B- β 則與 NF- κ B 持續性活化有關 (May and Ghosh, 1997)。有研究顯示在剔除 I κ B- α 的小鼠，I κ B- β 能取代 I κ B- α 功能並回復回來，由此顯示它們的生物活性相似 (Cheng et al., 1998)。在本實驗中發現 CCY1a-C1 會選擇性的抑制 I κ B- β 的分解作用。因對 I κ B- α 並無影響，可能可以說明 CCY1a-C1 無法完全抑制 NF- κ B 與 DNA 結合的實驗結果。所以 CCY1a-C1 對 NF- κ B 與 DNA 結合的抑制，可能是經由抑制了 I κ B- β 分解，抑制了 p65 的核轉移以及與 κ B 結合作用所致。另外是新合成出來的 I κ B- α 也可能將核內 NF- κ B 帶出細胞核，造成 NF- κ B 與 DNA 的結合減少。將 pNF κ B-Luc 轉染至細胞中來測量 luciferase 的活性，是這幾年研究調節 iNOS 基因表現被廣泛使用的方法。結果顯示 CCY1a-C1 並沒有完全抑制了 κ B 位置的活性。在訊息傳遞的研究中，常

可見訊息會被逐層放大。抑制了部分的上游傳遞訊息，會表現出對下游產物較大的抑制作用。將一段 1.7-kb iNOS promoter (piNOS-Luc) 轉染至細胞中來測量 luciferase 的活性，發現 iNOS promoter 被抑制的程度如同抑制 κ B 位置的活化，均小於 CCY1a-C1 對 iNOS mRNA 及 iNOS 蛋白生成的明顯抑制，我們不排除 CCY1a-C1 也有可能經由影響 iNOS 基因的轉錄速率，進而抑制了轉錄的作用。

許多研究指出 p38 MAPK 為活化 iNOS 基因重要的路徑，它包含著活化 NF- κ B、C/EBP、ATF-2 這些轉錄因子 (Bhat et al., 2002)。實驗結果顯示 CCY1a-C1 對於 p38 MAPK 磷酸化沒有影響。推測 CCY1a-C1 並非經由 p38 MAPK 路徑而抑制下游的轉錄因子 NF- κ B。在 iNOS promoter 上也含有 CREB、C/EBP 這兩個轉錄因子的結合位置。同時這兩個轉錄因子也受到 p38 MAPK 的調控 (Bhat et al., 2002)。我們在之前也曾發現 CCY1a 化合物會活化 cAMP 路徑 (Wang et al., 2003)。並且先前的報告指出在 cAMP 存在下會活化 NF- κ B (Dendorfer et al., 1994)。加入 CCY1a-C1 並不會影響細胞內 cAMP 的產生。cAMP 能夠活化下游 PKA，PKA 再使 CREB 產生磷酸化來調節轉錄功能，磷酸化的 CREB 分別走兩條路徑來影響轉錄，第一 CREB 的磷酸化作用會增加 CREB 的 homodimers 與 cAMP-response element (CRE) 位置的結合力。第二會促進 CREB 與 CBP 的結合來穩定轉錄作用 (Goldman et al., 1997)。cAMP/PKA 路徑也會使 CREB 結合在 C/EBP 位置而增加 iNOS 的轉錄，並引起 CCAAT Box 的活性。而 CCY1a-C1 亦不會影響下游 CREB 磷酸化作用。

五、結論

綜合上述結果顯示 benzyloxybenzaldehyde 類新合成的化合物 CCY1a-C1，能夠抑制由 LPS 引起的一氧化氮生成，此種抑制作用並非經由產生細胞毒性或抑制 iNOS 酵素活性而來。CCY1a-C1 抑制一氧化氮生成的機轉為經由抑制轉錄因子 NF- κ B 的活化，進而抑制一氧化氮產生。抑制 NF- κ B 的活性，可能主要來自於抑制 I κ B- β 的分解，以及延遲 p65 的核轉移作用，但與 p38 MAPK、cAMP/PKA 和 CREB 的傳遞路徑無關。

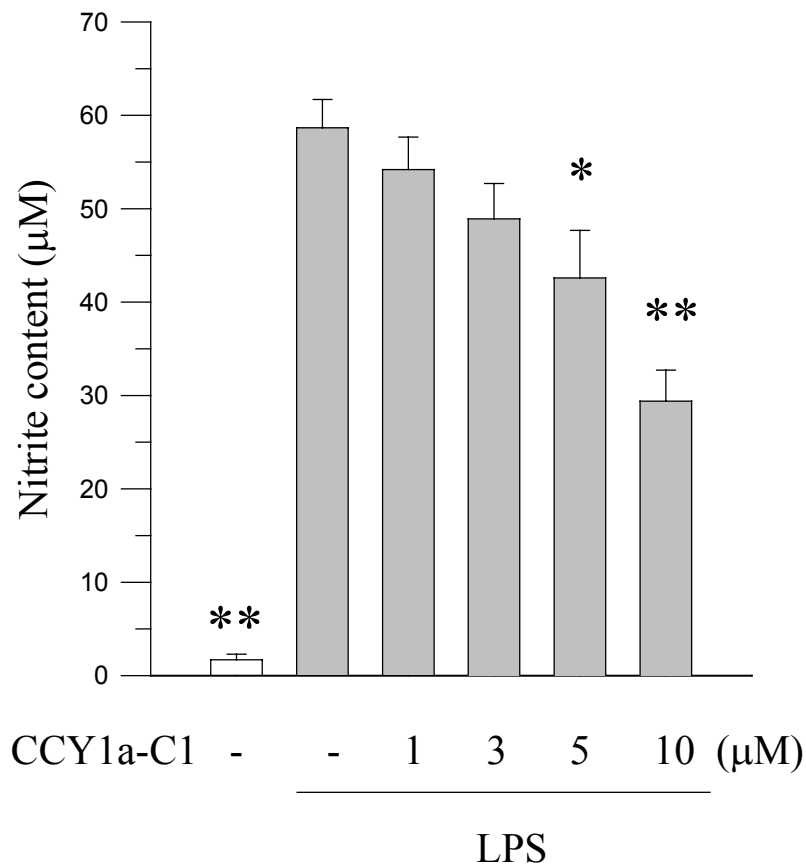


圖 2-1. CCY1a-C1 濃度依存性影響 LPS 刺激細胞產生一氧化氮。 細胞加入 DMSO (control 組, 第二 column) 或 1-10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 24 小時。取細胞上清液以 Griess reagent 測量 nitrite 產量。數據以 mean ± S.E. 值表示。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 與 control 值 ($58.6 \pm 3.1 \mu\text{M}$) 比較 ($n = 6$)。

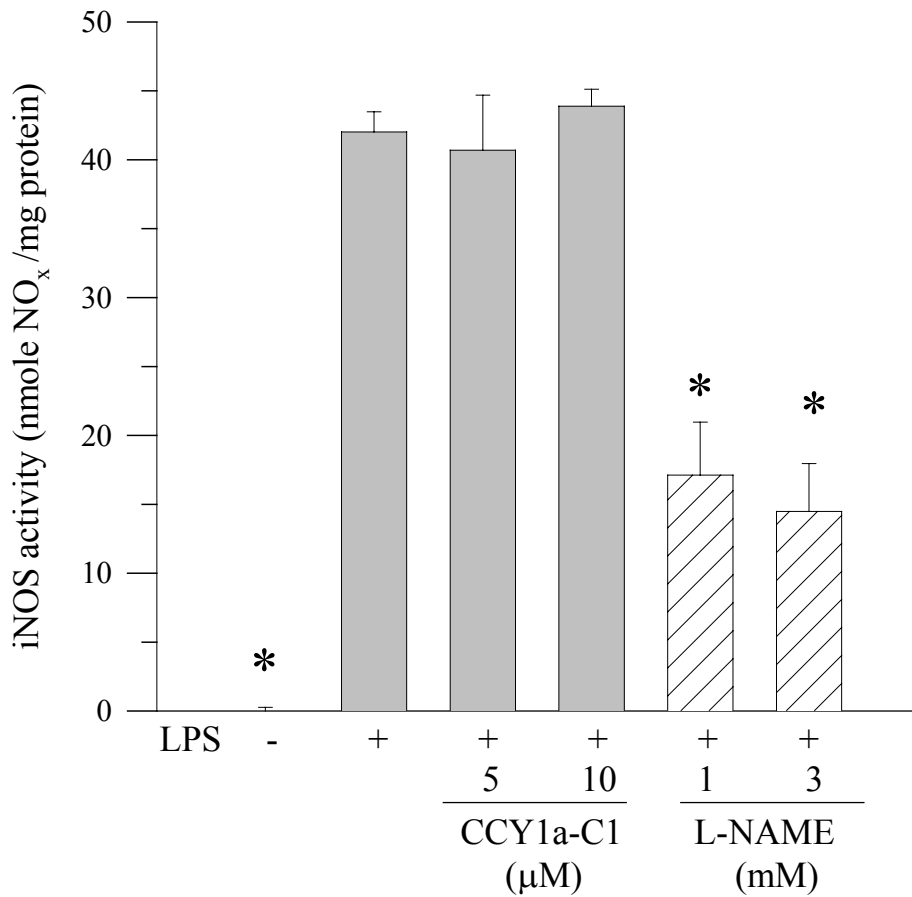


圖 2-2. CCY1a-C1 對於 iNOS 活性的影響。 細胞加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 16 小時。Lysates 離心取上清液，加入 DMSO (control 組，第二 column)、CCY1a-C1 (5、10 μM) 或 L-NAME (1、3 mM) 作用 5 分鐘。測量 nitrite 產量。數據以 mean ± S.E. 值表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (42.0 ± 1.5 nmole/mg protein) 比較 (n = 4)。

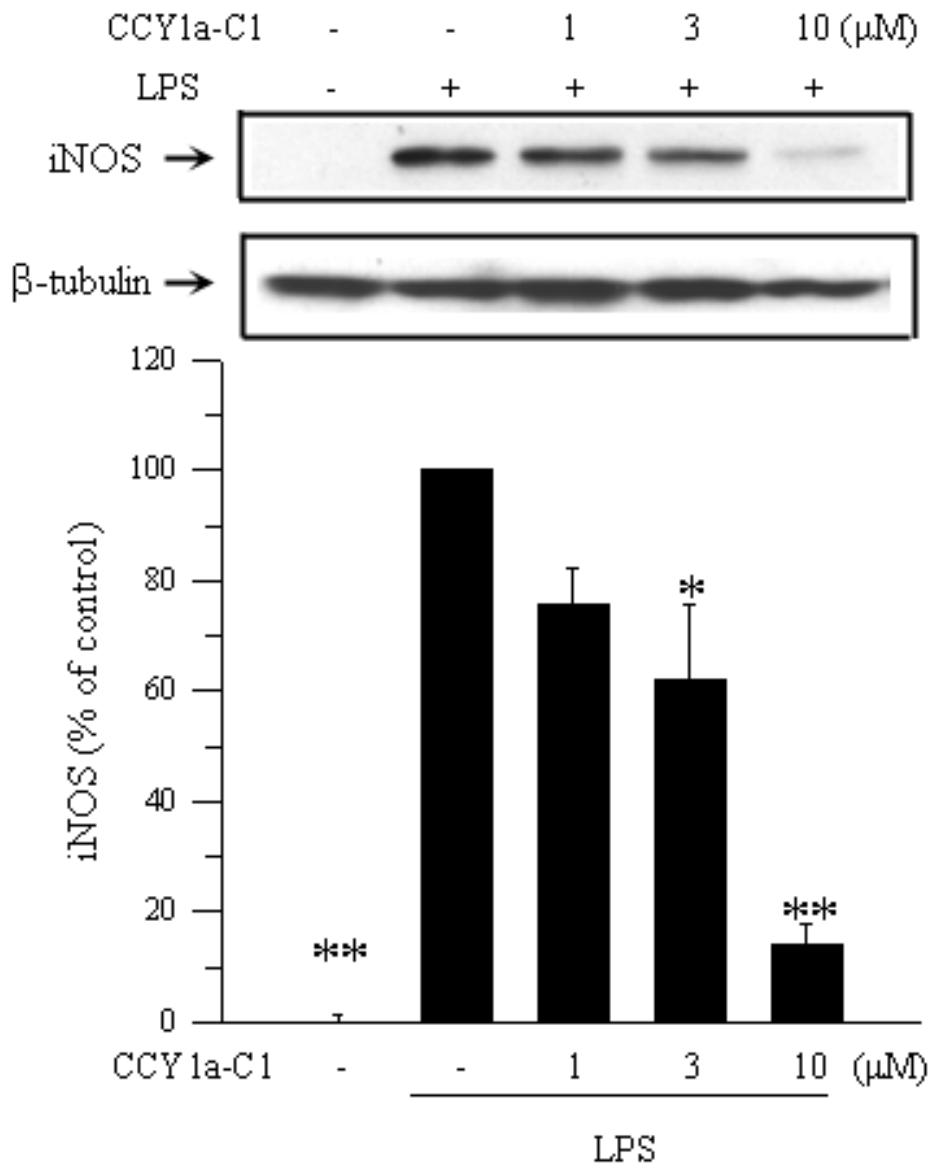


圖 2-3. CCY1a-C1 濃度依存性影響 LPS 刺激細胞產生誘發型一氧化氮合成酶. 細胞加入 DMSO (control 組, 第二 column) 或 1-10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後, 加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激 24 小時。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後, 用 anti-iNOS 抗體辨識, 並以 β -tubulin 來標準化。上圖為 Western blot 結果, 下圖為利用 densitometer 分析 iNOS 之結果。數據以 mean \pm S.E. 表示。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 與 control 值 (14.4 ± 1.0 densitometer unit) 比較 ($n = 4$)。

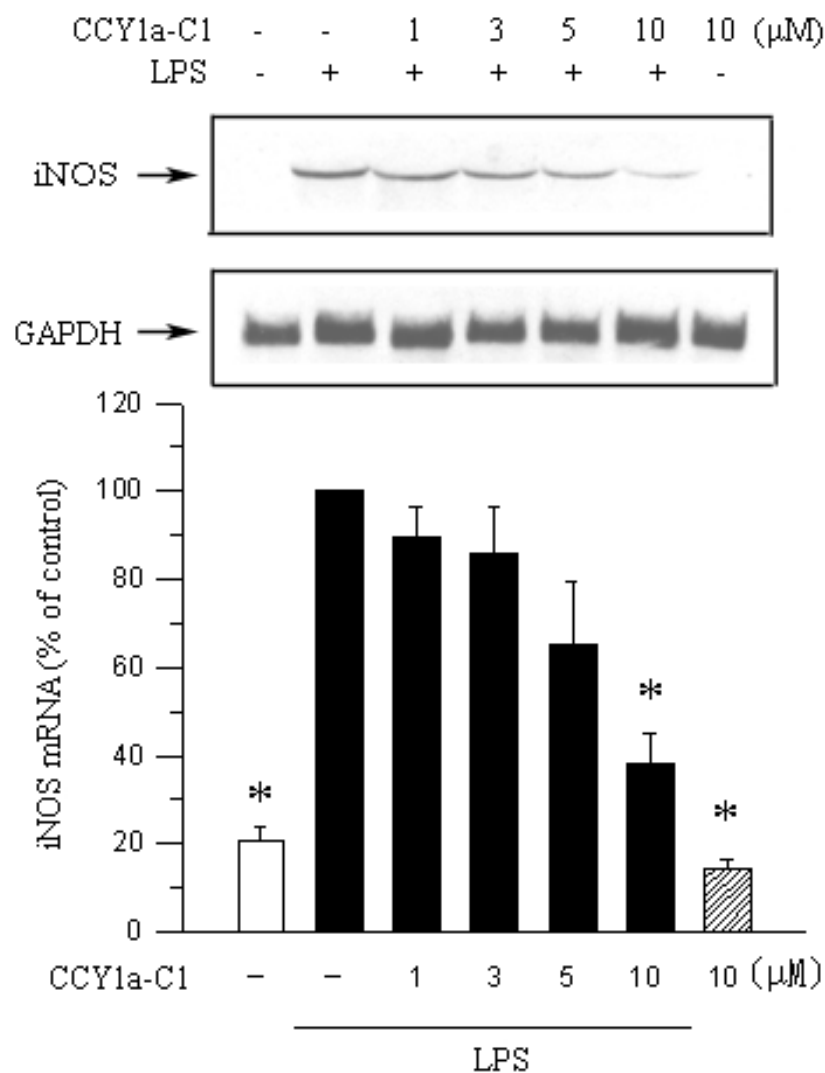


圖 2-4. CCY1a-C1 濃度依存性影響 iNOS mRNA 作用。 細胞加入 DMSO (control 組, 第二 column) 或 CCY1a-C1 (1-10 μM) 作用 1 小時後, 加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 24 小時。利用 Northern blot 來測量 iNOS mRNA 的表現, GAPDH 當 internal control。上圖為北方點墨法的結果。下圖為利用 densitometer 分析 iNOS/GAPDH 的 ratio 值之結果。數據以 mean ± S.E. 值表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (ratio 值 0.26 ± 0.03) 比較。# $P < 0.05$ 最後一個 column 與未刺激組 (第一 column; ratio 值 0.05 ± 0.01) 比較 (n = 5)。

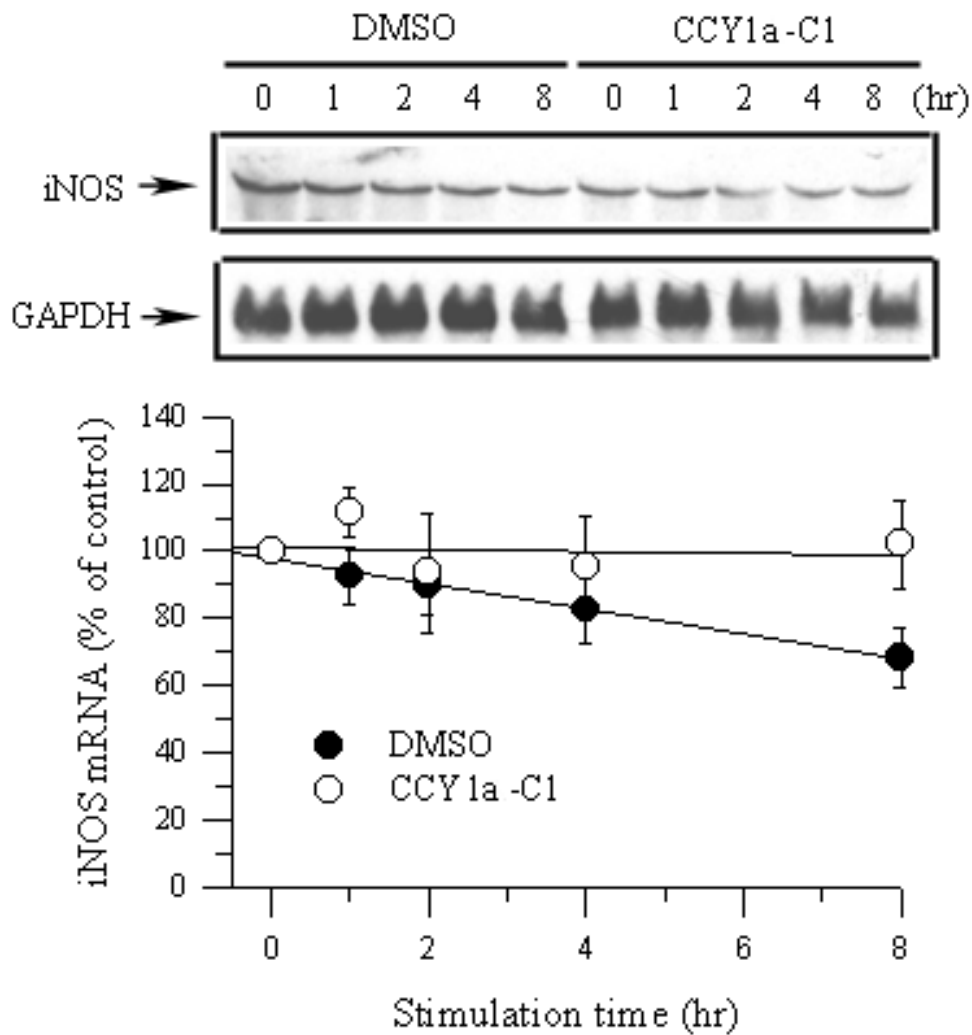


圖 2-5. CCY1a-C1 對於 iNOS mRNA stability 的影響。 細胞以 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 12 小時之後加入 DMSO (control 組) 或 CCY1a-C1 (10 μM)，並加入 10 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D。經過不同時間的抑制轉錄之後，利用 Northern blot 來測量 iNOS mRNA 的表現，GAPDH 當 internal control。上圖為 Northern blot 的結果。下圖為利用 densitometer 分析 iNOS/GAPDH 的 ratio 值之結果。數據以 mean \pm S.E. 值表示。Control 組與 10 μM CCY1a-C1 實驗組 0 小時值分別為 ratio 值 0.37 ± 0.05 ； 0.26 ± 0.03 。(n = 5)。

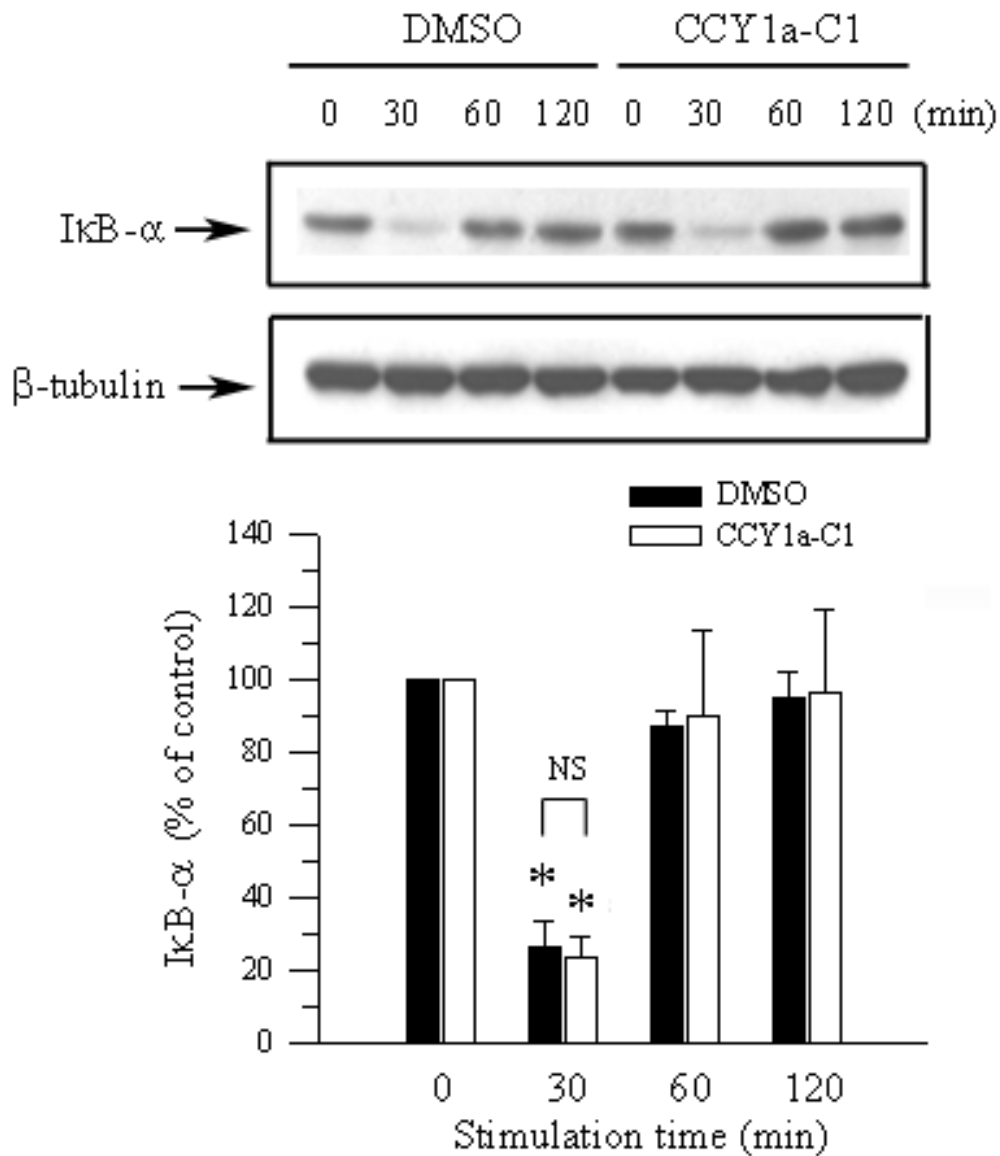


圖 2-6. CCY1a-C1 對於 LPS 不同時間刺激產生 IκB-α 分解的影響。細胞加入 DMSO 或 10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 0-120 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-IκB-α 抗體辨識 IκB-α 分解的程度。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 IκB-α 之結果。數據以 mean ± S.E. 表示。* $P < 0.05$ 與個別的 control 值 (第一 column 群; DMSO 組值 16.2 ± 3.4 densitometer unit, 而 CCY1a-C1 組值 16.0 ± 4.4 densitometer unit) 比較 ($n = 3$)。

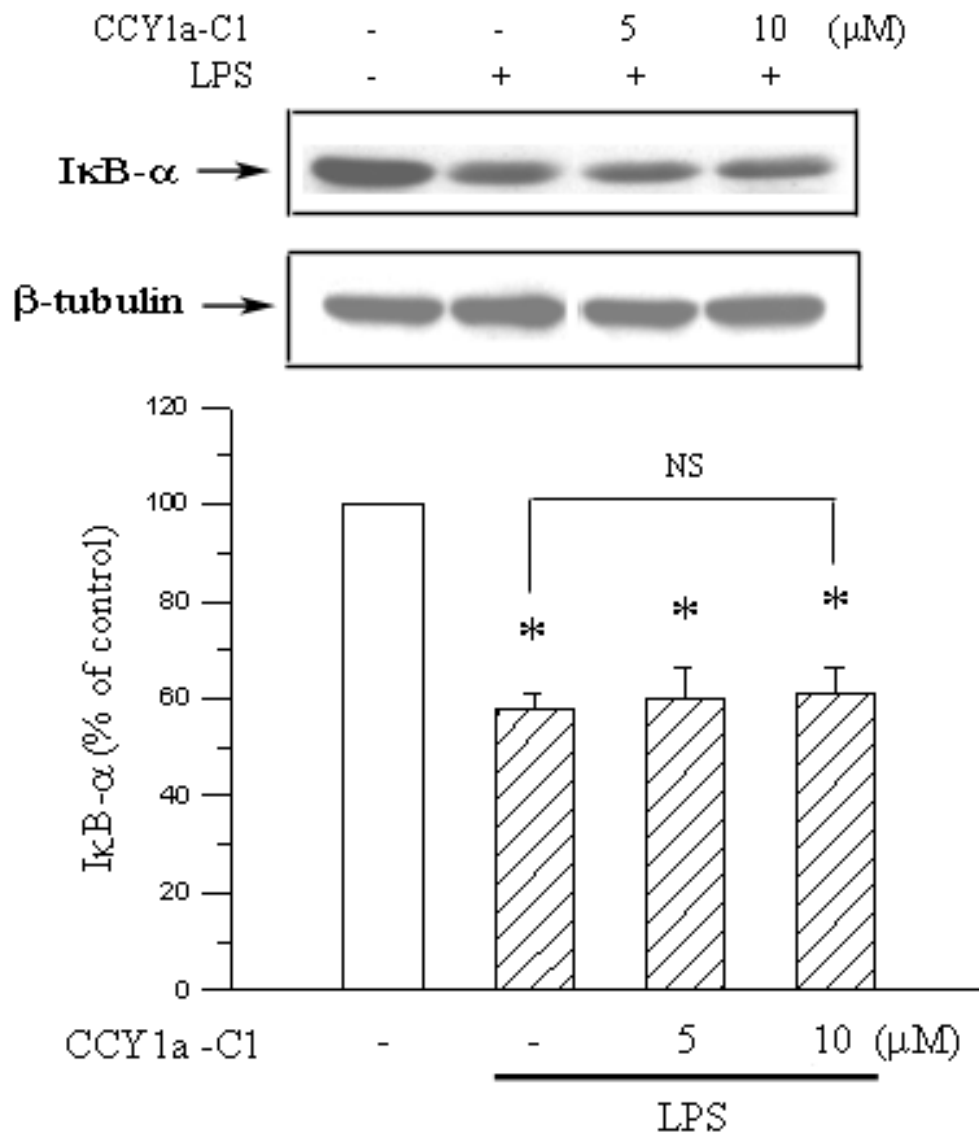


圖 2-7. CCY1a-C1 不同濃度影響 LPS 刺激 IκB-α 分解的作用。細胞加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (5、10 μM) 作用 1 小時後，加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激 30 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-IκB-α 抗體辨識 IκB-α 分解的程度，並以 β -tubulin 來標準化。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 IκB-α/ β -tubulin 的 ratio 值。數據以 mean \pm S.E. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (第一 column; ratio 值 1.19 ± 0.09) 比較 (n = 9)。

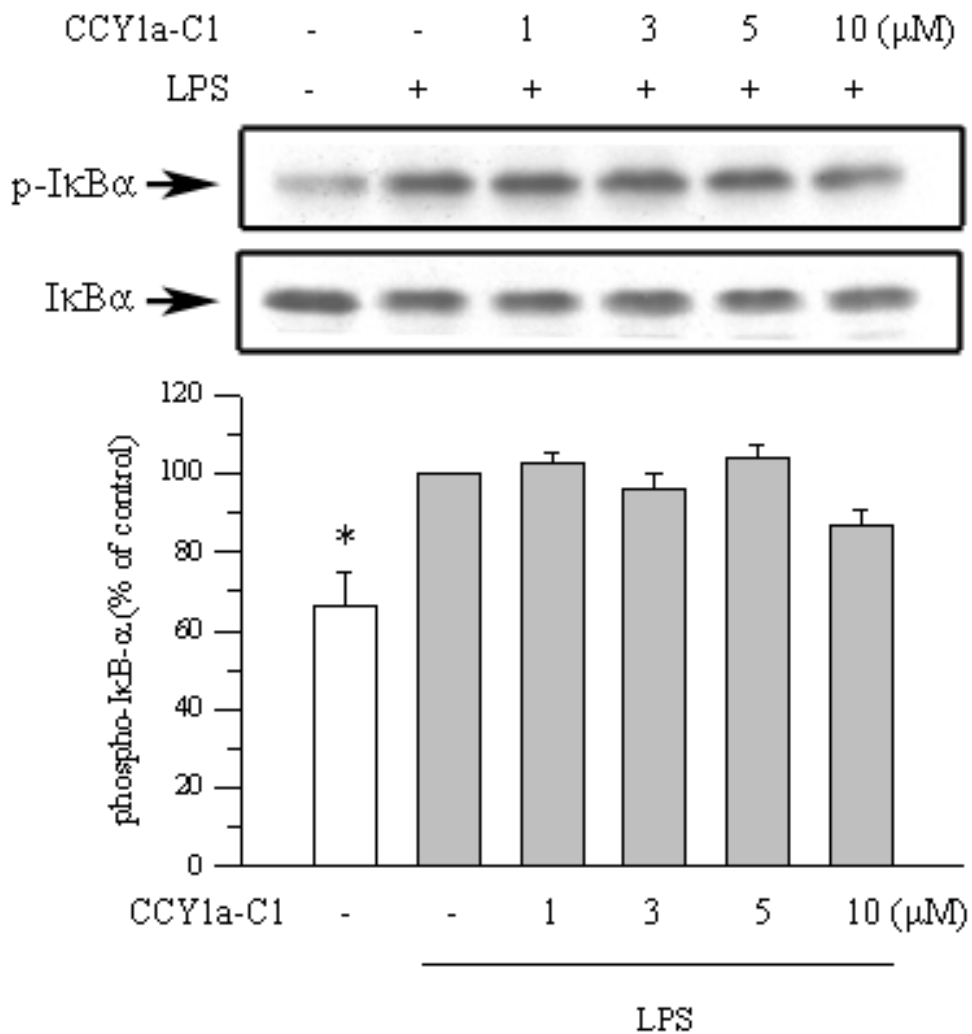


圖 2-8. CCY1a-C1 影響 LPS 刺激 IkB- α 磷酸化的作用。 細胞加入 DMSO 或 1-10 μ M CCY1a-C1 以及 20 μ M MG132 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激 30 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-IkB- α 抗體辨識 IkB- α 磷酸化的程度，並以 IkB- α 來標準化。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 phospho-IkB- α /IkB- α 的 ratio 值。數據以 mean \pm S.E. 表示。* $P < 0.05$ 與 control 值 (第二 column; ratio 值 1.2 ± 0.1) 比較 (n = 4)。

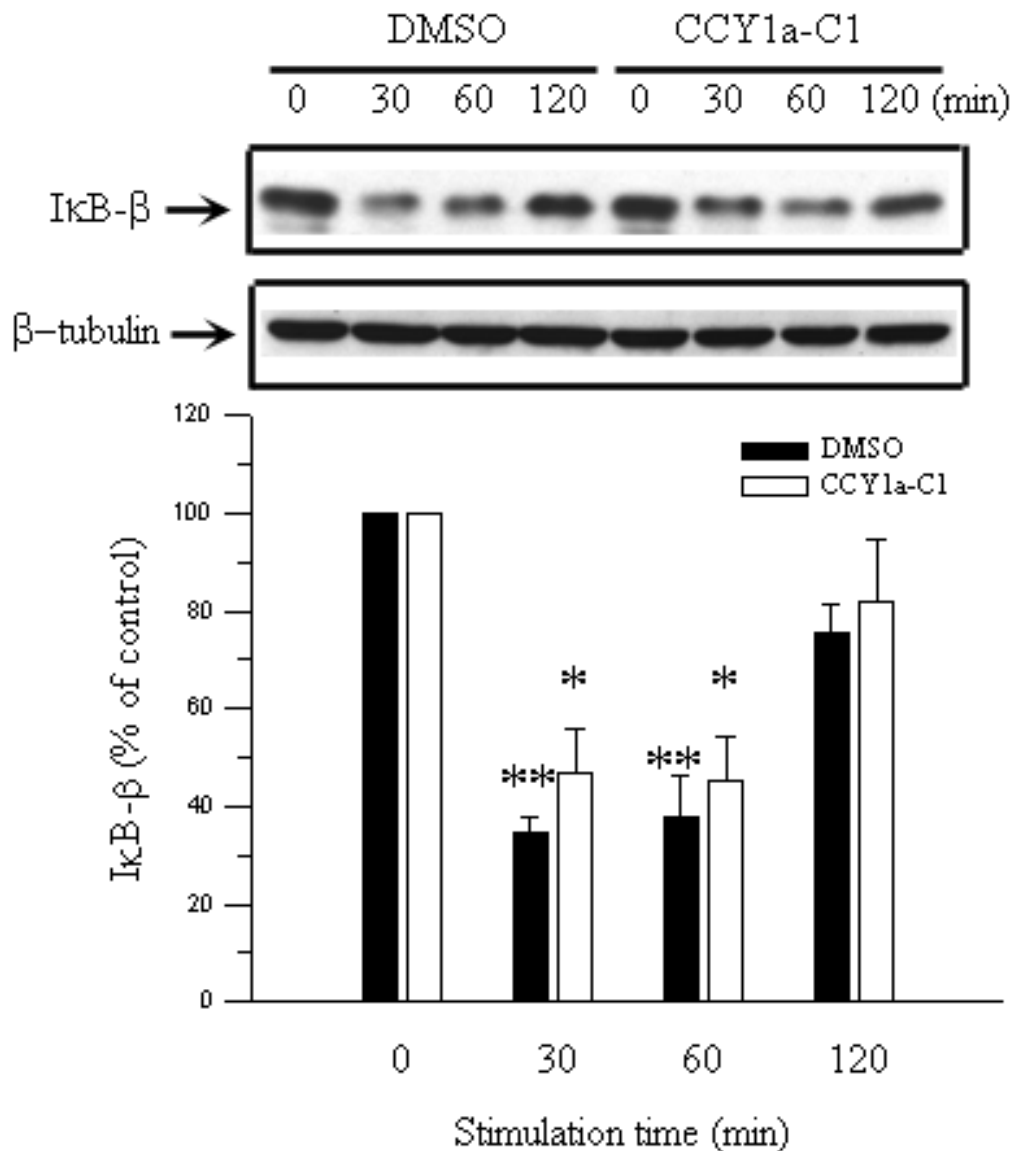


圖 2-9. CCY1a-C1 對於 LPS 不同時間刺激產生 IκB-β 分解的影響。細胞加入 DMSO 或 10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 0-120 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-IκB-β 抗體辨識 IκB-β 分解的程度。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 IκB-β 之結果。數據以 mean ± S.E. 表示。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 與個別的 control 值 (第一 column 群; DMSO 組值 18.0 ± 4.7 densitometer unit, 而 CCY1a-C1 組值 17.7 ± 3.8 densitometer unit) 比較 (n = 4)。

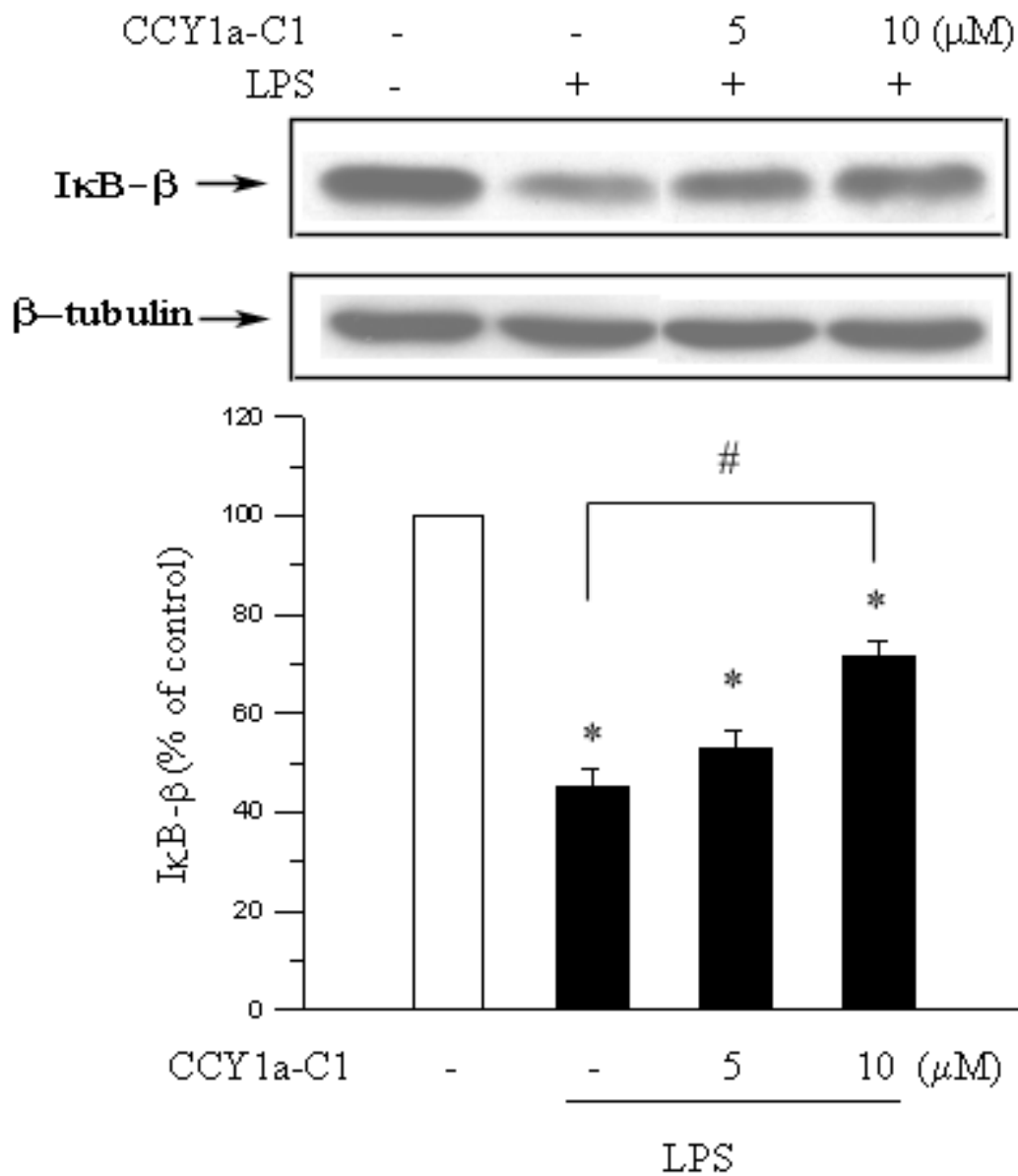


圖 2-10. CCY1a-C1 不同濃度影響 LPS 刺激 I κ B- β 分解的作用。細胞加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (5、10 μM) 作用 1 小時後，加入 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 30 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-I κ B- β 抗體辨識 I κ B- β 分解的程度，並以 β -tubulin 來標準化。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 I κ B- β / β -tubulin 的 ratio 值。數據以 mean \pm S.E. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (第一 column; ratio 值 0.8 ± 0.1) 比較。# $P < 0.05$ 以 Student's t -test 統計 ($n = 7$)。

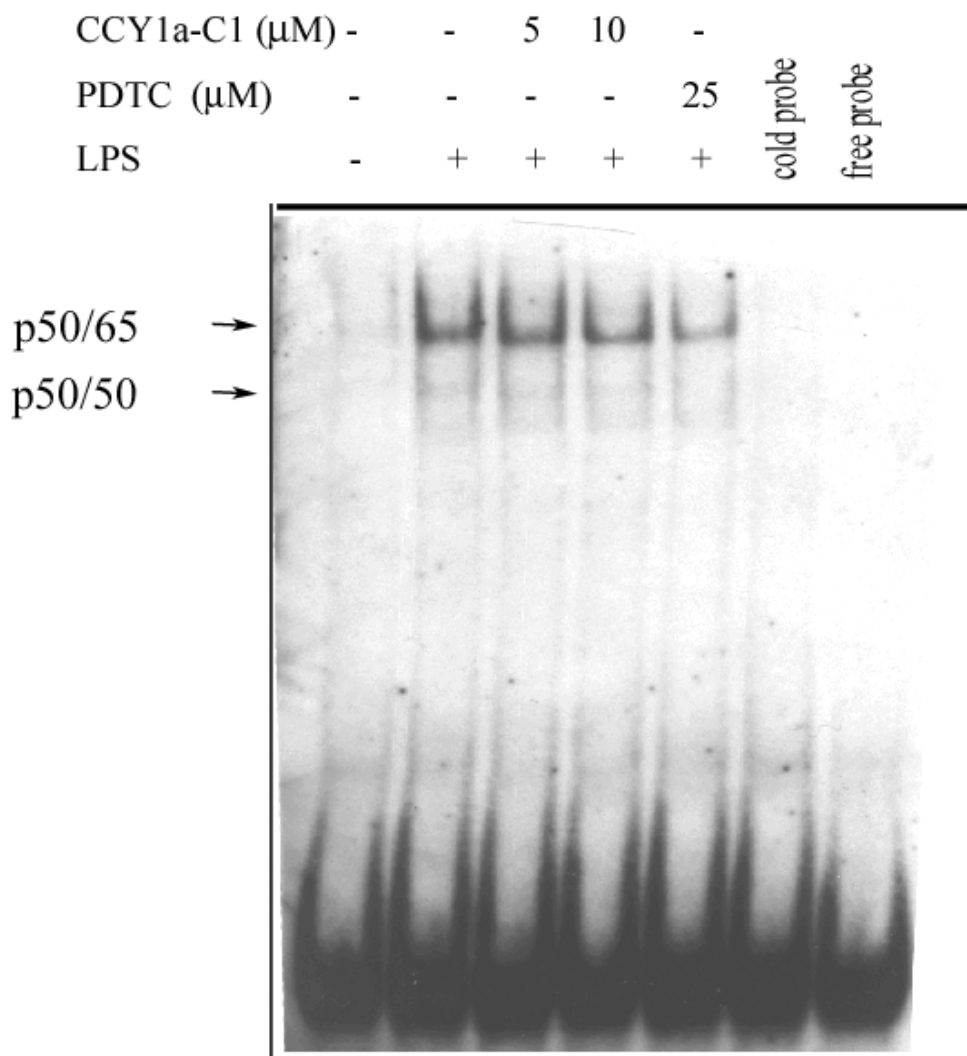


圖 2-11. CCY1a-C1 對於 NF- κ B 的 DNA 結合活性影響。 細胞加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (5、10 μM) 作用 1 小時後，加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激 1 小時。細胞核萃取物利用 EMSA 來測量 NF- κ B 的 DNA 結合程度。Cold probe lanes 的 sample 為 LPS 刺激 1 小時後的核萃取物，加入 DIG-labeled NF- κ B probe 與 50 fold excess unlabeled probe。(n = 3)。

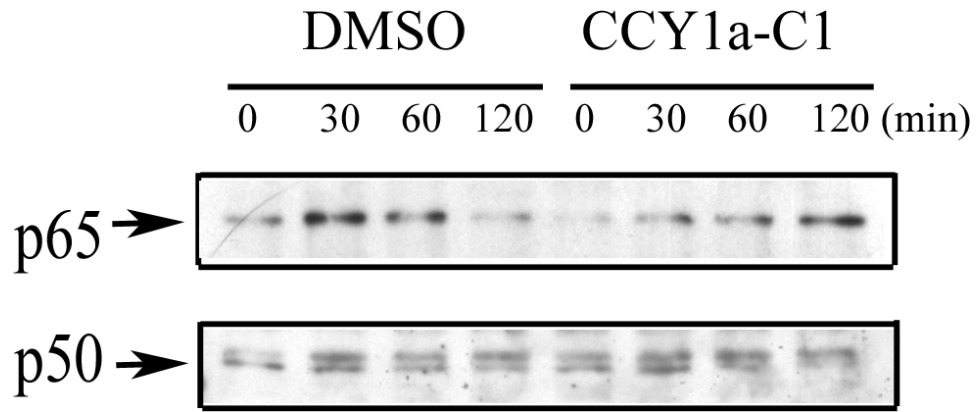


圖 2-12. CCY1a-C1 對於 p65 及 p50 核轉移的影響。 細胞加入 DMSO 或 10 μ M CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激 0-120 分鐘。細胞核萃取物經由 SDS-PAGE 展開後，用 p65、p50 抗體辨識 p65、p50 蛋白。(n = 3)。



圖 2-13. CCY1a-C1 對於 p38 MAPK 磷酸化的影響。 細胞加入 DMSO 或 10 μ M CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μ g/ml) 刺激 0-60 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-p38 MAPK 抗體辨識 p38 MAPK 磷酸化的程度。並以 p38 MAPK 來標準化。此圖為 Western blot 結果。(n = 6)。

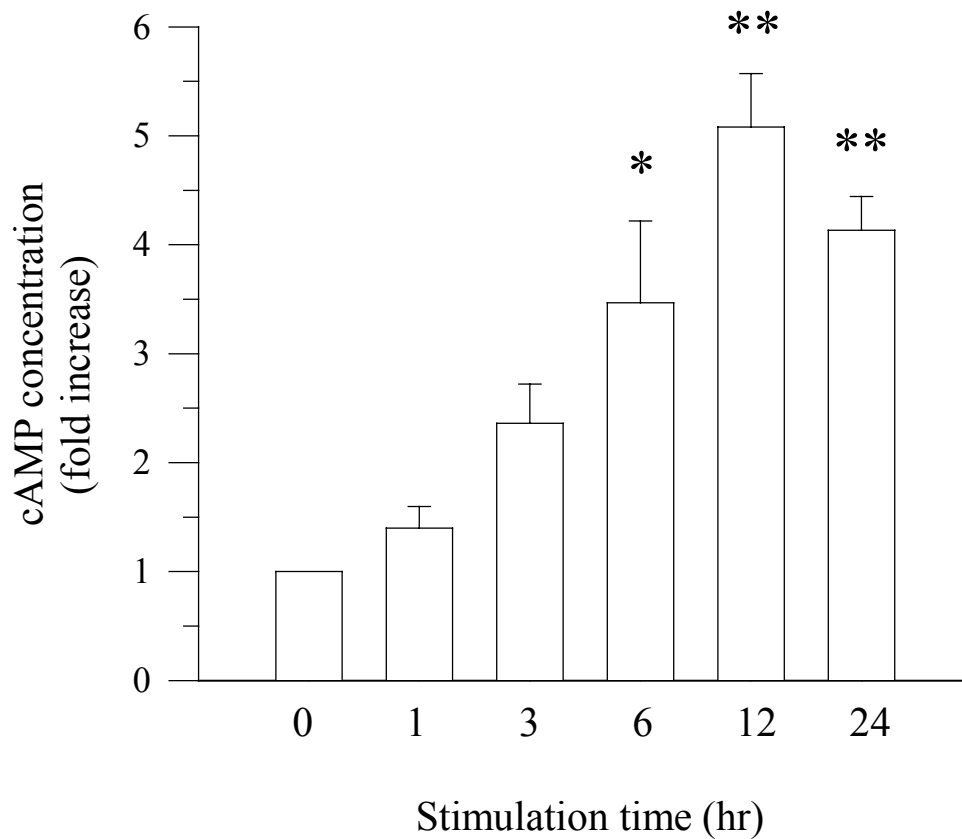


圖 2-14. LPS 不同時間刺激 RAW 264.7 巨噬細胞產生細胞內 cAMP 濃度的變化。細胞加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激 0-24 小時。收集細胞上清液，測量細胞內 cAMP 的濃度。實驗結果以 mean \pm S.E. 來表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 與 control 值 (第一 column; cAMP 濃度為 58.6 ± 7.5 fmol/well) 比較 ($n = 3$)。

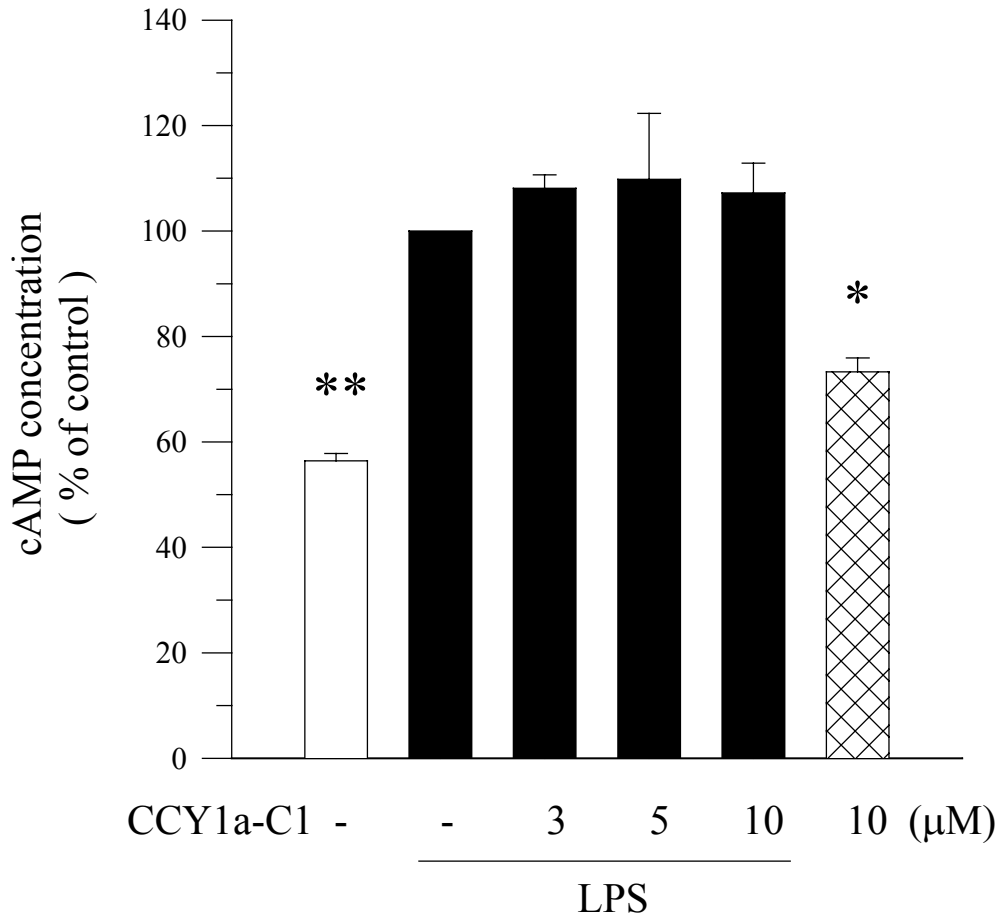


圖 2-15. CCY1a-C1 對於 RAW 264.7 巨噬細胞細胞內 cAMP 的影響。 細胞加入 DMSO 或 10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 12 小時。收集細胞上清液，測量細胞內 cAMP 的濃度。實驗數據以 mean ± S.E. 來表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 與 control 值 (第二 column; cAMP 濃度為 107.2 ± 6.6 fmol/well) 比較。# $P < 0.05$ 最後一個 column 與未刺激組 (第一 column; 濃度為 60.5 ± 4.3 fmol/well) 比較 (n = 3)。

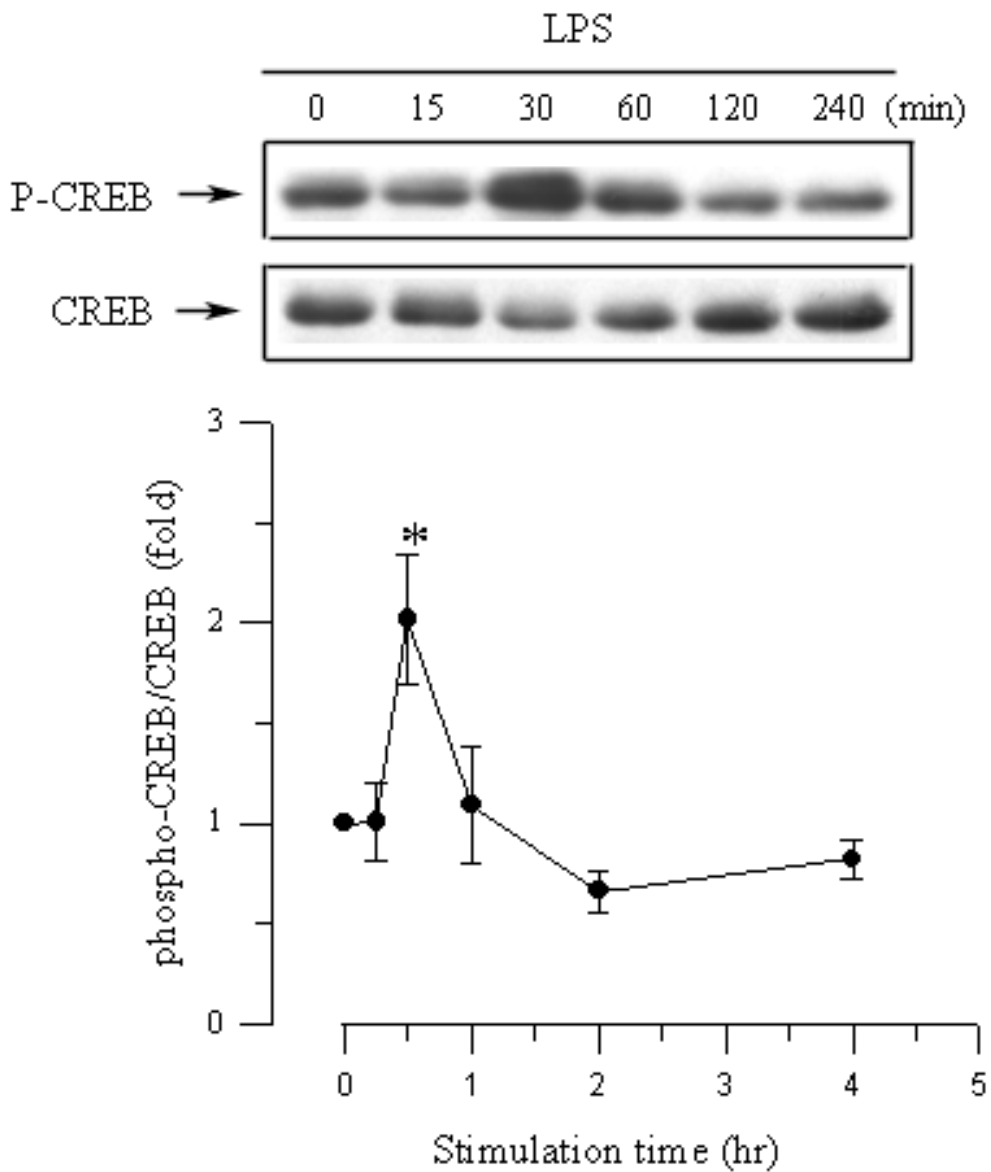


圖 2-16. LPS 刺激細胞產生 CREB 磷酸化作用。 細胞加入 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 0-4 小時。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-CREB 抗體辨識 CREB 磷酸化的程度，並以 CREB 來標準化。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 phospho-CREB/CREB 的 ratio 值之結果。數據以 mean \pm S.E. 表示。* $P < 0.05$ 與 control 值 (ratio 值 0.97 ± 0.20) 比較 ($n = 3$)。

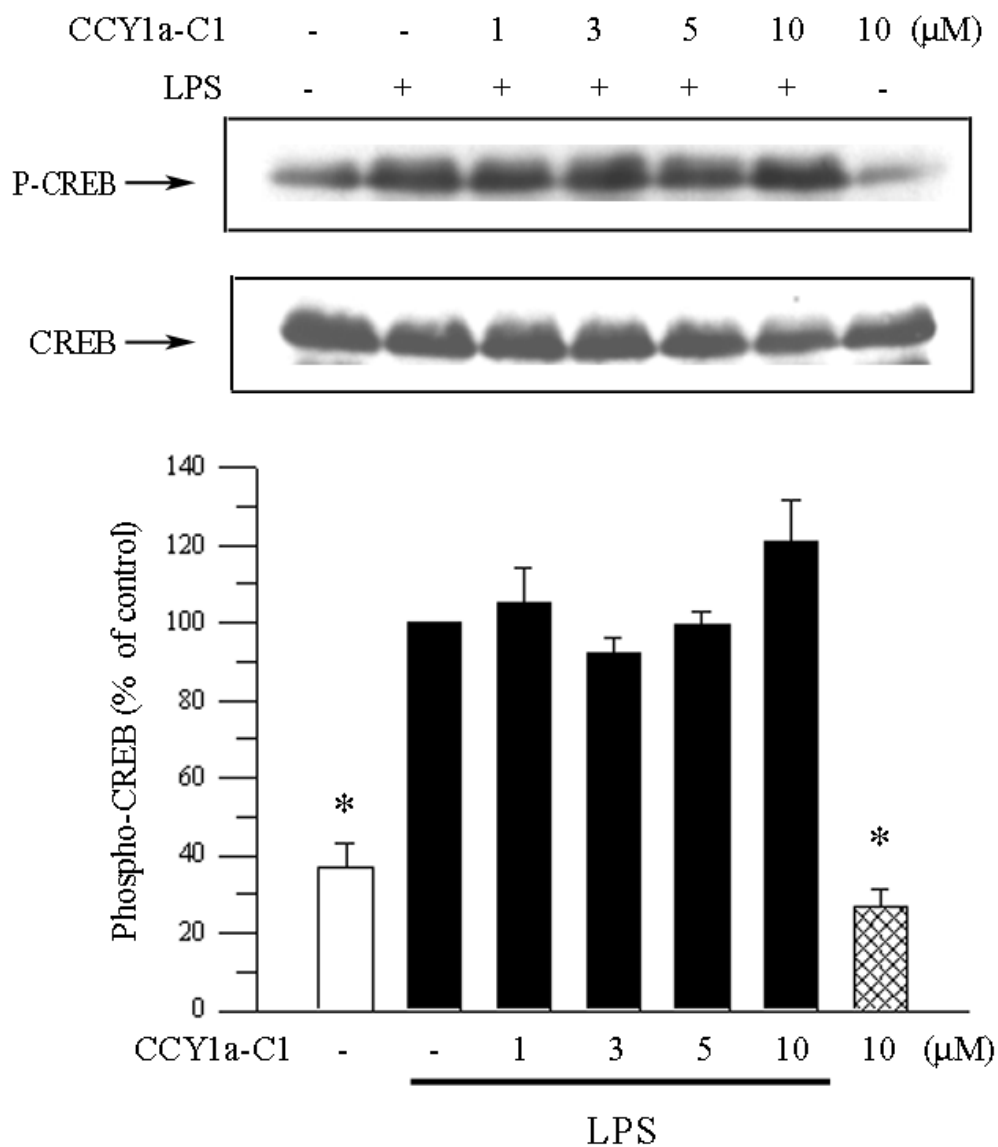


圖 2-17. CCY1a-C1 對於 CREB 磷酸化的影響。 細胞加入 DMSO 或 1-10 μM CCY1a-C1 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 30 分鐘。細胞蛋白經由 SDS-PAGE 展開後，用 anti-phospho-CREB 抗體辨識 CREB 磷酸化的程度，並以 CREB 來標準化。上圖為 Western blot 結果。下圖為利用 densitometer 分析 phospho-CREB/CREB 的 ratio 值之結果。數據以 mean ± S.E. 表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (ratio 值 1.2 ± 0.1) 比較。# $P < 0.05$ 最後一個 column 與未刺激組 (第一 column; ratio 值 0.42 ± 0.06) 比較 (n = 5)。

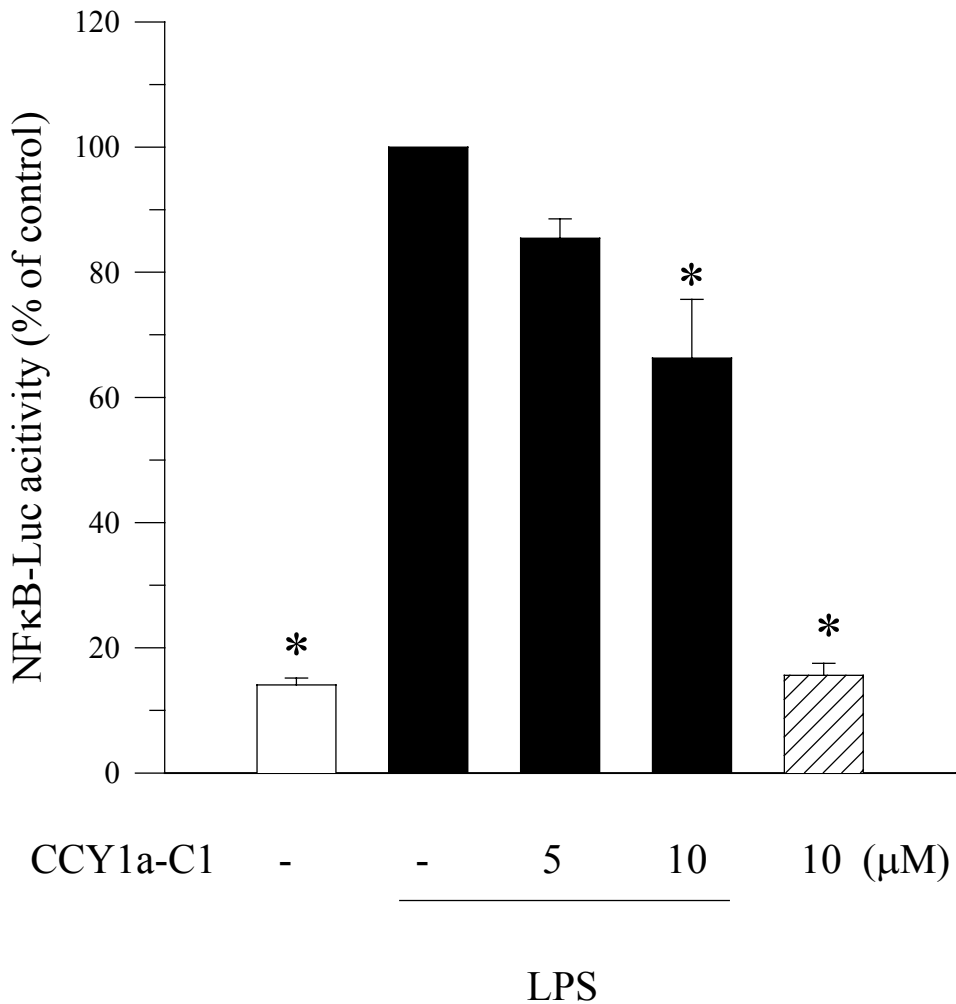


圖 2-18. CCY1a-C1 對於 NF-κB promoter 活性的影響。 將 NF-κB-dependent firefly luciferase reporter gene 和 *Renilla* luciferase reporter gene 轉染至 RAW 264.7 巨噬細胞中。經過 24 小時之後，細胞加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (5、10 μM) 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 6 小時。收集 cell lysate，利用 luminometer 以 dual-luciferase reporter assay system 來測量 firefly 和 *Renilla* luciferase 的活性。Firefly luciferase 的活性以 *Renilla* luciferase 的活性來標準化。實驗數據以 mean ± S.E. 來表示。* $P < 0.01$ 與 control 值 (ratio 值 6.3 ± 0.6) 比較。# $P < 0.05$ 最後一個 column 與未刺激組 (第一 column；ratio 值 0.9 ± 0.1) 比較。(n = 8)

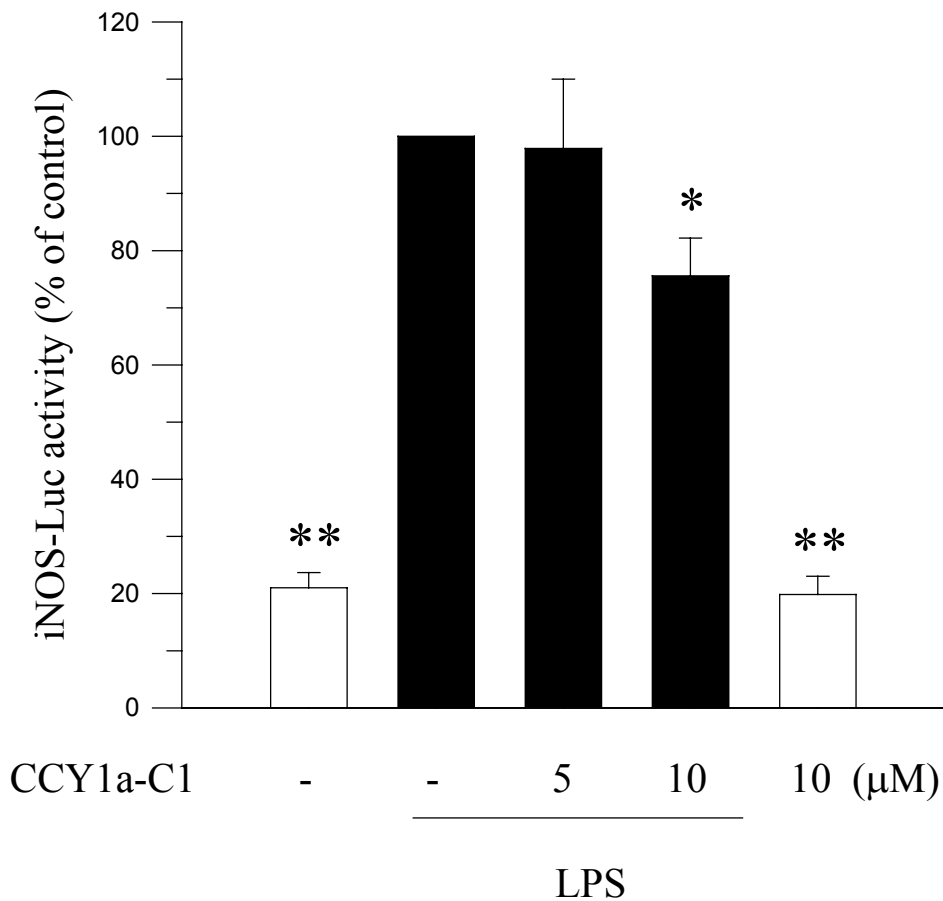


圖 2-19. CCY1a-C1 對於 iNOS promoter 活性的影響。 將 iNOS-dependent firefly luciferase reporter gene 和 *Renilla* luciferase reporter gene 轉染至 RAW 264.7 巨噬細胞中。經過 24 小時之後，細胞加入 DMSO 或 CCY1a-C1 (5、10 μM) 作用 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 刺激 6 小時。收集 cell lysate，利用 luminometer 以 dual-luciferase reporter assay system 來測量 firefly 和 *Renilla* luciferase 的活性。Firefly luciferase 的活性分別以 *Renilla* luciferase 的活性來標準化。實驗數據以 mean ± S.E. 來表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 與 control 值 (ratio 值 7.0 ± 1.7) 比較。# $P < 0.05$ 最後一個 column 與未刺激組 (第一 column; ratio 值 1.5 ± 0.4) 比較 (n = 8)。

表 2-1 CCY1a-C1 對 RAW 264.7 巨噬細胞的毒性

RAW 264.7 細胞 (5×10^5 cells/ml) 加入 DMSO 或 1-15 μ M CCY1a-C1 作用 24 小時。收集細胞的上清液，以 LDH cytotoxicity detection kit 測量 490 nm 吸光值變化。以加入 DMSO 的值作為 LDH 釋出 0%。加入 DMSO 並同時含有 0.5% Triton X-100 此值作為 LDH 釋出 100%。將 CCY1a-C1 作用後的細胞上清液收集起來，並測量 LDH 的釋出百分比 (n = 5)。

		LDH release (%)
CCY1a-C1	10 μ M	-3.6 ± 0.8
	15 μ M	-2.9 ± 1.5

參考文獻

- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- Anrather, J., Csizmadia, V. Soares, M.P., and Winkler, H. (1999) Regulation of NF- κ B RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21 (ras) and protein kinase Czeta in primary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 13594-13603.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Tomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., and Dargemont, C. (1997) Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* 110, 369-378.
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D., and Baldwin Jr, A.S. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7065-7077.
- Baldwin, A.S. (1996) The NF- κ B, and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683.
- Baek, K.J., Thiel, B.A., Lucas, S., and Stuehr, D.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 21120-21129.
- Ben-Neriah, Y. (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* 3, 20-26.
- Beutler, B., and Cerami, A. (1989) The biology of cachectin/TNF- α primary

- mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 625-655.
- Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *3*, 169-176.
- Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q., Bhat, A.N. (2002) p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein- β , and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* 277, 29584-29592.
- Bogdan, C. (2000) The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 419-424.
- Bonnard, M. Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W.J., Elia, A.J., Shillinglaw, W., Mak, T.W., Cao, Z., and Yeh, W.C. (2000) Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF- κ B-dependent gene transcription. *EMBO J.* 19, 4976-4985.
- Carter, A.B., Knudtson, K.L., Monick, M.M., and Hunninghake, G.W. (1999) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- κ B-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J. Biol. Chem.* 274, 30858-30863.
- Chang, C.Y., Kuo, S.C., Lin, Y.L., Wang, J.P., and Huang, L.J. (2001) Benzyloxybenzaldehyde analogues as novel adenylyl cyclase activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1971-1974.
- Chen, C.C., Chiu, K.T., Sun, Y.T., and Chen, W.C. (1999) Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide

- synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 274, 31559-31564.
- Chen, C.C., and Wang, J.K. (1999) p38 but not p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophage. *Mol. Pharmacol.* 55, 481-488.
- Chen, K.D., Chen, L.Y., Huang, H.L., Lieu, C.H., Chang, Y.N., Chang, M.D., and Lai, Y.K. (1998) Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the rapid induction of the 78-kDa glucose-regulated protein in 9L rat brain tumor cells. *J. Biol. Chem.* 273, 749-755.
- Chen, L.F., Fischle, W., Verdin, E., and Greene, W.C. (2001) Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* 293, 1653-1657.
- Cheng, J.D., Ryseck, R.P., Attar, R.M., Dambach, D., and Bravo, R. (1998) Functional redundancy of the nuclear factor κ B inhibitors I κ B α and I κ B β . *J. Exp. Med.* 188, 1055-1062.
- Chiao, P.J., Miyamoto, S., and Verma, I.M. (1994) Autoregulation of I κ B α activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 28-32.
- Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S., and Hobbs, A.J. (2001) Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J. Immunol.* 166, 3873-3881.
- Davis, M., Hatzubai, A., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Fisher, G.Z., Yaron, A., Bauskin, A., Mercurio, F., Mann, M., and Ben-Neriah, Y. (2002) Pseudosubstrate regulation of the SCF (β -TrCP) ubiquitin ligase by

- hnRNP-U. *Genes Dev.* 16, 439-451.
- Deff, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (1999) The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca^{2+} /calmodulin-dependent electron transfer. *J. Biol. Chem.* 274, 30589-30595.
- Delgado, M., and Ganea, D. (2001) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit nuclear factor- κ B-dependent gene activation at multiple levels in the human monocytic cell line THP-1. *J. Biol. Chem.* 276, 369-380.
- Delhase, M., Hayakawa, M., and Chen, Y. (1999) Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.
- Dendorfer, U., Oettgen, P., and Libermann, T.A. (1994) Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4443-4454.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Dewitt, D., and Smith, W.I. (1995) Yes, but do they still get headaches? *Cell* 83, 345-348.
- DiDonato, J., Mercurio, F., and Rosette, C. (1996) Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1295-1304.

- DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M. (1995) Phosphorylation of I κ B α precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- κ B. *Mol. Cell Biol.* 15, 1302-1311.
- Dlaska, M., and Weiss, G. (1999) Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* 162, 6171-6177.
- Fang, F.C. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99, 2818-2825.
- Fenwick, C. Na, S.Y., Voll, R.E., Zhong, H., Im, S.Y., Lee, J.W., and Ghosh, S. (2000) A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of I κ B. *Science* 287, 869-873.
- Fournier, T., Riches, D.W., Winston, B.W., Rose, D.M., Young, S.K., Noble, P. W., Lake, F.R., and Henson, P.M. (1995) Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF- α and prostaglandin E2. *J. Immunol.* 155, 2123-2133.
- Fritsche, G., Larcher, C., Schennach, H., and Weiss, G. (2001) Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *J. Infect. Dis.* 183, 1388-1394.
- Galea, E., and Feinstein, D.L. (1999) Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J.* 13, 2125-2137.
- Ganster, R.W., Taylor, B.S., Shao, L., Geller, D.A. (2001) Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and

- NF- κ B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8638-8643.
- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H., and Billiar, T.R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3491-3495.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T. (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2927-2932.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. Cell 109, S81-S96.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 16, 225-260.
- Goldman, P.S., Tran, V.K., and Goodman, R.H. (1997) The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. Recent. Prog. Horm. Res. 52, 103-120.
- Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. Nature reviews immunology 3, 23-35.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell. Signalling 13, 85-94.
- Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L., and DeFranco, A.L. (1996) Activation of C-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2774-2778.

- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Han, J., Lee, J.D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., and Ulevitch, R.J. (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol. Chem.* 271, 2886-2891.
- Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P., and Busse, R. (1996) Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophage: role of nuclear factor κ B and interferon regulatory factor 1. *Br. J. Pharmacol.* 118, 2178-2184.
- Hecker, M., Walsh, D.T., and Vane, J.R. (1992) Characterization of a microsomal calcium-dependent nitric oxide synthase in activated J774.2 monocyte/macrophages. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, S139-S141.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Nerah, Y., and Baeuerle, P. (1993) Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature (London)* 365,16317-16322.
- Henricson, B.E., Carboni, J.M., Burkhardt, A.L., and Vogel, S.N. (1995) LPS and Taxol activate Lyn kinase autophosphorylation in Lps (n), but not in Lpsd), macrophages. *Mol. Med.* 1, 428-435.
- Hiki, K., Yui Y., Hattori R., Eizawa H., Kosuga, K., and Kawai, C. (1991) Cytosolic and membrane-bound nitric oxide synthase. *Jpn. J. Pharmacol.* 56, 217-220.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M. S., Jin, O., and Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and

- NF- κ B activation. *Nature* 406, 86-90.
- Hu, Y.L., Baud, V., and Delhase, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* 284, 316-320.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1014-1019.
- Israel, A. (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol.* 10, 129-133.
- Janeway, C.A., et al. (2001) *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*.p:40.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* 16, 1620-1627.
- Johson, R., and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* 284, 316-320.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gericitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J., Mak, T.W., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615.
- Karin, M. (1999a) How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene.* 18, 6867-6874.
- Karin, M. (1999b) The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and NF- κ B

- activation. *J. Biol. Chem.* 274, 27339-27342.
- Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D.A., and Forstermann, U. (1998) Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF- κ B-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 125, 193-201.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., and Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laskin, D.L., and Pendino, K.J. (1995) Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 655-677.
- Lee, J.S., See, R.H., Deng, T., and Shi, Y. (1996) Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol. Cell Biol.* 16, 4312-4326.
- Lee, S.H., and Hannink, M. (2002) Characterization of the nuclear import and export functions of I κ B ϵ . *J. Biol. Chem.* 277, 23358-23366.
- Leitges, M., Sanz, L., Martin, P., Duran, A., Braun, U., Garcia, J.F., Camacho, F., Diaz-Meco, M.T., Rennert, P.D., and Moscat, J. (2001) Targeted disruption of the zeta PKC gene results in the impairment of the NF- κ B pathway. *Mol. Cell* 8, 771-780.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C., and Verma, I.M. (1999a) IKK-1-deficient mice exhibit abnormal

- development of skin and skeleton. *Genes Dev.* 13, 1322-1328.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725-734.
- Li, Q.T., Van Antwerp, D., Mercurio, F. (1999b) Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 284, 321-325.
- Li, Z.W., Chu, W.M., and Hu, Y.L. Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999c) The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 1839-1845.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., and Murphy, W.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9730-9734.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997a) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.
- MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997b) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5243-5248.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., and Ghosh, G. (2001) I κ B β , but not I κ B α , function as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimmers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* 276, 45225-45235.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., and Kovalenko, AV. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385,

540-544.

- Marletta, M.A. (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234.
- Marletta, M.A. (1994) Nitric oxides syntjase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-930.
- Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180, 977-984.
- May, M.J., and Ghosh, S. (1997) Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* 8, 63-73.
- Meffert, M.K., Premack, B.A., and Schulman, H. (1994) Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12, 1235-1244.
- Miller, B.S., and Zandi, E. (2001) Complete reconstitution of human I κ B kinase (IKK) complex in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 36320-36326.
- Minghetti, L., Nicolini, A., Polazzi, E., Creminon, C., Maclouf, J., and Levi, G. (1997) Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is down-regulated by exogenous prostaglandin E₂ and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia.* 19, 152-160.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, path ophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Muller, J.M., Ziegler-Heitbrock, H.W., and Baeuerle, P.A. (1993) Nuclear factor κ B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 187, 233-256.
- Murakami, M., Matsumoto, R., Austen, K.F., and Arm, J.P. (1994)

- Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D₂ in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* 269, 22269-22275.
- Mutin, M., Canavy, I., Blann, A., Bory, M., Sampol, J., and Dignat-George, F. (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93, 2951-2958.
- Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., and Okumura, K. (1998) Differential regulation of I κ B kinase- α and - β by two upstream kinase, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase ERK kinase kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3537-3542.
- Nathan, C. (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100, 2417-2423.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064.
- Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918.
- Nishida, C.R., and Ortiz de Montellano, P.R. (1999) Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J. Biol. Chem.* 274, 14692-14698.
- Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18, 128-131.
- Norris, J.L., and Baldwin, A.S. (1999) Oncogenic Ras enhances NF- κ B transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent

- mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 13841-13846.
- Orian, A., Whiteside, S., and Israel, A. (1995) Ubiquitin-mediated processing of NF- κ B transcriptional activator precursor p105: Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J. Biol. Chem.* 270, 21707-21714.
- Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251-1256.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., and Goldberg, A.L. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78, 773-785.
- Parry, G.C., and Mackman, N. (1997) Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF- κ B-mediated transcription. *J. Immunol.* 159, 5450-5456.
- Pellacani, A., Wiesel, P., Razavi, S., Vasilj, V., Feinberg, M.W., Chin, M.T., Reeves, R., and Perrella, M.A. (2001) Down-regulation of high mobility group-I(Y) protein contributes to the inhibition of nitric-oxide synthase 2 by transforming growth factor-beta1. *J. Biol. Chem.* 276, 1653-1659.
- Petters, R.T., and Maniatis, T. (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I κ B kinase kinases. *Biochem. Biophys. Acta* 2, M57-M62.

- Raddassi, K., Petit, J. F., and Lemaire, G. (1993) LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclic nucleotides. *Cell. Immunol.* 149, 50-64.
- Raingaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1247-1255.
- Rao, K.M. (2000) Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J. Toxicol. Environ. Health. B Crit. Rev.* 3, 27-58.
- Rodriguez-Pascual, F., Hausding, M., Ihrig-Biedert, I., Furneaux, H., Levy, A.P., Forstermann, U., and Kleinert, H. (2000) Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* 275, 26040-26049.
- Rothwarf, D.M., and Karin, M. (1999) The NF- κ B pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE.* 26, RE1.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Natoli, G. (1998) IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 395,297-300.
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999) I κ B kinase phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 274, 30353-30356.
- Salerno, J.C., Harris, D.E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A.J., Smith, S.M., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S., and Jones, C.L. (1997) An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of

- nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 29769-29777.
- Schmitz, M.L., Bacher, S., and Kracht, M. (2001) I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem. Sci.* 26, 186-190.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W., and Baeuerle, P.A. (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175, 1181-1184.
- Schumann, R.R., Pfeil, D., Lamping, N., Kirschning, C., scherzinger, G., Schlag, P., Karawajew, L., and Herrmann, F. (1996) Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood* 87, 2805-2814.
- Senftleben, U., and Karin, M. (2002) The IKK/NF- κ B pathway. *Crit. Care Med.* 30, S18-S26.
- Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S., and Van Dyke, T.E. (1994) Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *J. Immunol.* 153, 1818-1824.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., and Akira, S. (1999) IKK-i, a novel lipopolysaccharide -inducible kinase that is related to I κ B kinases. *Int. Immunol.* 11, 1357-1362.
- Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. and Stark, G. R. (2002) Distinct roles of the I κ B kinase alpha and beta subunits in liberating

- nuclear factor κ B (NF- κ B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 277, 3863-3869.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1993) NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Tam, W.F., and Sen, R. (2001) I κ B family members function by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 7701-7704.
- Taylor, B.S., and Geller, D.A. (2000) Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 13, 413-424.
- Umansky, V., Hehner, S.P., Dumont, A., Hofmann, T.G., Schirmacher, V., Droge, W., and Schmitz, M.L. (1998) Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- κ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* 28, 2276-2282.
- Vane, J. (1994) Towards a better aspirin. *Nature* 367, 215-216.
- Velasco, M., Diaz-Guerra, M.J., Diaz-Achirica, P., Andreu, D., Rivas, L., and Boscá, L. (1997) Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* 158, 4437-4443.
- Velasco, M., Diaz-Guerra, M.J., Martin-Sanz, P., Alvarez, A., and Bosca, L. (1997) Rapid Up-regulation of I κ B β and abrogation of NF- κ B activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 272, 23025-23030.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2002) Regulation of the transcriptional activity of the

- nuclear factor- κ B p65 subunit. *Biochem. Pharmacol.* 64, 963-970.
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 178, 749-754.
- Walton, K.M., and Rehfuss, R.P. (1990) Molecular mechanisms of cAMP-regulated gene expression. *Mol. Neurobiol.* 4, 197-210.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L., and Baldwin, A.S.Jr. (2000) Tumor-necrosis factor- α -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 275, 32592-32597.
- Wang, M.J., Huang, H.M., Chen, H.L., Kuo, J.S., and Jeng, K.C. (2001) Dehydroepian drosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *Journal of Neurochemistry* 77,830-838.
- Wang, X.Z., and Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272, 1347-1349.
- Wang, J.P., Chang, L.C., Hsu, M.F., Huang, L.J., and Kuo, S.C. (2002) 2-Bnzyloxybenzaldehyde inhibits formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of phospholipase D activation in rat neutrphils by. *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 26-32.
- Wang, J.P., Chang, L.C., Lin, Y.L., Hsu, M.F., Chang, C.Y., Huang, L.J., and Kuo, S.C. (2003) Investigation of the cellular mechainsim of inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide anion generation in rat neutrphils by 2-benzyloxybenzaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1043-1051.

- Weisz, A., Oguchi, S., Cicatiello, L., and Esumi, H. (1994) Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophage during activation by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 269, 8324-8333.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.
- Xia, D., Wang, F., and Parmely, M.J. (2000) Inhibition of NF- κ B activation in mouse macrophages and the RAW 264.7 cell line by a synthetic adenylyl carbocyclic nucleoside. *Biochem. Pharmacol.* 60, 717-727.
- Xie, Q., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994) Role of transcriptional factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705-4708.
- Xie, Q.W., Whisnant, R., and Nathan, C. (1993) Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 1779-1784.
- Yamaoka, S., Courtois, G., and Bessia, C. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Yang, J., Fan, G.H., Wadzinski, B.E., Sakurai, H., and Richmond, A. (2001) Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *J. Biol. Chem.* 276, 47828-47833.

- Zhang, G., and Ghosh, S. (2001) Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J. Clin. Invest.* 107, 13-19.
- Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.* 9, 625-636.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 89, 413-424.