

Luteolin의 IL-1 β 에 의한 MCP1 단백질 발현 증가에 미치는 영향

임준희 · 권택규*

계명대학교 의과대학 면역학교실

Received March 17, 2009 / Accepted April 10, 2009

Effects of Luteolin on IL-1 β -Induced MCP1 Protein Expression. Jun Hee Lim and Taeg Kyu Kwon*. Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 194 DongSan-Dong Jung-Gu, Taegu 700-712, South Korea - Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) plays a key role in monocyte/macrophage infiltration to the sub-endothelial space of the blood vessel wall, which is a critical initial step in atherosclerosis. In this study, we examined interleukin-1 β (IL-1 β) induced MCP1 expressions via activation of transcription factor NF- κ B in primary human aorta smooth muscle cells. We determined the effect of several anti-inflammatory agents on IL-1 β -induced MCP1 expression. The pretreatment of luteolin significantly suppressed IL-1 β -induced MCP1 expressions through blocking activation and translocation of NF- κ B to the nucleus.

Key words : Luteolin, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), interleukin-1 β (IL-1 β), nuclear factor- κ B (NF- κ B)

서 론

동맥경화증은 심장병이나 여러 혈관 질환의 중요한 원인 중 하나로 혈관벽에 지질, 세포, extracellular matrix 등이 축적되어 plaque을 형성하여 혈관이 좁아지는 결과를 야기하는 질병이다. 동맥경화는 복잡한 일련의 과정을 통해 진행되는데 이는 동맥 내피세포(endothelium)의 손상 및 증식, 단핵구(monocyte)의 혈관 내 벽으로의 이동과 대식세포(macrophage)로의 변형, 지질과 죽은 세포조각의 혈관 내 침착, 평활근 세포(smooth muscle cell)의 증식 및 섬유화 과정, 각종 성장인자들(growth factors)과 cytokine 및 chemokine 등의 regulatory network 등이 관여한다[14,15]. 많은 연구자들이 초기 동맥경화 병변에 활성화된 단핵구(monocyte)나 대식세포(macrophage)를 끌어들이는 데 있어서 monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)이 중요한 역할을 하는 것으로 보고하여 왔다[16,17,21]. MCP1은 chemokine의 일종으로 백혈구에서 처음 분리되었고 혈관내피세포(endothelial cells), 평활근 세포(smooth muscle cells), 단핵구, 대식세포 등에서 interleukin-1, interleukin-4, tumor necrosis factor- α 등의 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)에 반응하여 발현이 증가된다[12,13,22]. 혈관내벽에 감염으로 인한 염증이 발생하면 사이토카인들이 분비되고 그에 반응하여 MCP1의 발현이 증가하면 그 수용체인 chemokine receptor 2 (CCR2)를 발현하는 세포들이 염증부위로 이동하여 활성화되고 혈관벽으로 침투하여 동맥경화 병변의 형성을 야기한다

다[11]. CCR2와 apolipoprotein E (ApoE)가 둘 다 결핍된 쥐가 ApoE만 결핍된 쥐에 비하여 동맥경화 병변의 크기가 3배 정도 감소되어 있다고 보고되었고 MCP1과 저밀도 지단백수용체(LDL receptor)가 결핍된 쥐에 12-14주간 고콜레스테롤 식이를 준 후 대동맥을 분리하여 지질조성을 조사해 본 결과 저밀도 지단백 수용체가 결핍되고 MCP1이 정상인 쥐에 비해 대동맥 내에 축적된 지질의 양이 현저히 감소되어 있음이 보고되었다[4,6]. 또한 apolipoprotein B (ApoB)을 발현시킨 transgenic 쥐에서 MCP1이 결핍되면 동맥경화 병변의 형성이 현저히 감소된다는 것이 보고되었다[5]. 이상의 여러 실험 결과들은 동맥경화의 발병과정에서 MCP1과 그 수용체인 CCR2의 중요성에 대해 보여준다.

식물성 폴리페놀의 일종인 luteolin은 셀러리, 피망, 파슬리, 캐모마일 등의 식용 식물에서 흔히 발견되는 물질로 항염증작용을 나타내는 것으로 보고되어 왔다[3,19,20]. 혈소판 성장인자(PDGF)에 의해 증가된 세포의 이동(migration) 및 침투(invasion)가 luteolin의 처리에 의해 저해되는 것이 보고되었고 astrocytes를 이용한 실험에서 interleukin 1 β (IL-1 β)에 의해 증가된 염증반응이 luteolin과 quercetin의 전처리에 의해 현저히 감소하는 것을 보여주었다[9,18].

본 연구에서는 MCP1의 분비를 통해 단핵구의 이동에 중요한 역할을 하는 평활근 세포에서 IL-1 β 에 의한 MCP1의 발현 변화에 대해 조사하였다. 그 결과 IL-1 β 의 처리는 염증반응에서 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 통해 MCP1의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 IL-1 β 에 의해 증가된 MCP1의 발현이 luteolin에 의해 mRNA 전사 단계에서 저해되는 것을 확인하였고 이것이 전사인자인 NF- κ B의 핵으로의 이동을 저해하여 DNA binding 활성을 감소시킴으로 나타나는 현상임을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-250-7846, Fax : +82-53-250-7074

E-mail : kwontk@dsmc.or.kr

재료 및 방법

세포주 배양

본 실험에 사용된 세포주인 사람 대동맥 평활근세포 주 (Human Aorta Smooth Muscle Cells, HASMCs)는 경북대학교 이인규 교수님 연구실에서 분양받았으며 primary 세포배양을 위한 DMEM (Clonetics, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)과 100 µg/ml gentamycin (Gibco)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기(Thermo Forma, USA)에서 배양하였다.

시약 및 재료

사람 재조합 interleukin-1β는 R&D systems (Minneapolis, MN)제품을 사용하였고 curcumin, baicalein, baicalin, resveratrol, quercetin, luteolin, PD98059, SB203530, SP600125, PDTC, LY294002, wortmannin은 Biomol (Plymouth Meeting, PA)에서 구입하여 사용하였다. Curcumin을 제외한 상기 시약은 DMSO 용액에 녹여서 사용하였으며, curcumin은 ethanol에 녹여서 사용하였다. NF-κB의 p65 항체는 SantaCruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

사람 평활근세포에 interleukin-1β (IL-1β)를 처리한 후 MCP1의 mRNA 발현을 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포를 1×10⁶ cells/well이 되게 6-well plate에 분주하고 IL-1β를 처리한 후 TRIzol (MRC)를 이용하여 total RNA를 분리하고 5 µg의 total RNA를 이용해 M-MLV reverse transcriptase로 역전사를 수행하였다(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). 역전사된 cDNA를 주형으로 하여 사람 MCP1 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 사람 MCP1 유전자를 증폭하기 위해 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다. MCP1 (sense) 5'-CTC GCTCAGCCAGATGCAATCAAT-3', (anti-sense) 5'-CCCAG GGGTAGAACTGTGGTTCAA-3'. PCR로 증폭된 DNA는 agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

사람 MCP1 단백질 정량

사람 평활근세포에 IL-1β를 처리한 후 사람 MCP1 단백질을 정량하기 위해 상층액을 모아서 ELISA를 수행하였다. 사용한 immunoassay kit는 R&D systems에서 구입하였다. 수거한 100 µl 상층액과 standard를 각각 사람 MCP1 항체가 coating된 96-well plate에 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 1X wash buffer로 3번 씻어주었다. Conjugate 200 µl를 씻어준 96-well plate에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 다시 1X wash buf-

fer로 3번 씻어주고 기질을 넣고 어두운 상온에서 20분간 반응시켰다. Stop solution을 넣고 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 값을 standard와 비교하여 MCP1 단백질의 양을 계산하였다.

Electrical mobility shift assay (EMSA)

사람 평활근세포에 luteolin과 IL-1β를 처리한 후 nuclear extracts를 분리하여 EMSA를 수행하였다. EMSA를 수행하기 위한 nuclear extract는 앞서 보고된 논문을 참조하여 분리하였다[1]. NF-κB의 DNA binding 활성을 알아보기 위해 사용된 oligonucleotide의 염기서열은 다음과 같다. NF-κB 5'-AGTTG AGGGGACTTTCCAGGC-3'. 이 oligonucleotide를 동위원소인 [³²P]-ATP로 label하여 probe로 사용하였다. EMSA 반응 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM dithiothreitol, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40)와 1 µg poly (dI-dC), 5 µg의 nuclear proteins를 넣고 competition을 위해 동위원소로 label하지 않은 oligonucleotide (wild type, mutant)를 넣어준 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 동위원소로 label된 oligonucleotide를 넣어 상온에서 20분간 더 반응시킨 후 8% polyacrylamide gel에 loading하여 150 V로 4시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 분리하여 말린 후 X-ray film에 24시간 노출시키고 이 film를 현상하여 확인하였다.

Confocal microscope 관찰

전사인자인 NF-κB의 세포내 위치를 확인하기 위해 confocal microscope로 관찰하였다. 사람 평활근세포를 4-well chamber slide에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주한 다음 5 ng/ml의 IL-1β를 6시간 동안 처리하였다. 4% paraformaldehyde로 세포를 고정하고 0.25% Triton X-100를 처리한 후 PBS로 3번 씻어주었다. 1% BSA를 포함하는 PBS로 30분간 blocking하고 NF-κB의 p65 항체로 2시간 incubation한 후 PBS로 2번 씻어주고 FITC가 label된 2차 항체로 1시간 incubation하였다. PBS로 2번 씻어준 후 Molecular Probes사에서 구입한 anti-fade mounting solution을 이용하여 mounting하여 confocal microscope로 관찰하였다.

결 과

IL-1β에 의한 MCP1 발현 증가

사람 대동맥 평활근 세포에 IL-1β를 농도별로 처리하여 MCP1의 mRNA와 단백질의 발현정도를 조사하였다. 세포에 IL-1β를 1, 2, 5, 10, 20 ng/ml의 농도로 10시간 동안 처리한 후 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과, IL-1β의 농도 의존적으로 MCP1의 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 1A). 세포 밖으로 분비되는 chemokines인 MCP1 단백질의 발현정도를 확인하기 위해 IL-1β를 10시간 동안 처리한 후 배양액을 수거

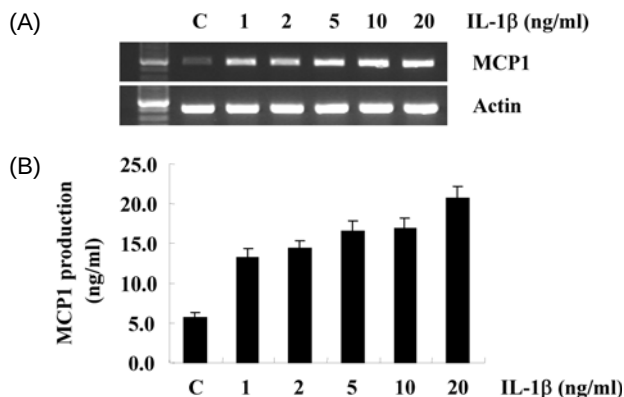


Fig. 1. IL-1 β induces MCP-1 expression in HASMCs. (A) HASMCs were treated with indicated concentrations of IL-1 β for 10 h. Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using MCP-1 gene-specific primers and the internal control gene, β -actin. Two additional experiments yielded similar results. A representative study is shown. (B) The amount of secreted MCP-1 protein was determined in the supernatant after IL-1 β treatment at the indicated concentrations using the human MCP-1 ELISA kit. Data are presented as mean values obtained from three independent experiments, and the bars represent standard deviations.

하여 사람 MCP1에 특이적인 ELISA kit (R & D systems)로 정량하였다. MCP1의 mRNA 발현과 마찬가지로 세포 밖으로 분비되는 단백질 역시 IL-1 β 의 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 1B). 즉 IL-1 β 의 농도 의존적으로 MCP1의 mRNA와 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

IL-1 β 에 의한 MCP1 발현증가에 전사인자 NF- κ B의 관련성
IL-1 β 에 의한 MCP1의 발현 조절 기전에 대해 알아보자 세포내에서 중요한 신호전달 단백질에 특이적인 저해제를 전처리한 후 IL-1 β 를 처리하여 MCP1의 발현 변화를 조사하였다. PD98059 (ERK 저해제), SB203580 (p38 저해제), SP600125 (JNK 저해제), PDTTC (NF- κ B 저해제), LY294002, wortmannin (PI3K 저해제)을 사람 평활근세포에 30분간 전처리한 후 5 ng/ml의 IL-1 β 를 10시간 동안 처리하여 MCP1의 발현을 조사하였다. 각각의 저해제와 IL-1 β 를 처리한 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하고 배양액을 수거하여 MCP1 ELISA를 수행한 결과 NF- κ B의 저해제인 PDTTC의 전처리에 의해 선택적으로 MCP1의 mRNA와 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 위의 실험 결과로 IL-1 β 에 의한 MCP1 발현 증가에 전사인자 NF- κ B의 활성화가 필요하다는 것을 알 수 있었다.

Luteolin에 의한 MCP1 발현 저해

MCP1은 혈관 내에서 염증, 손상 등이 발생하면 단백질과

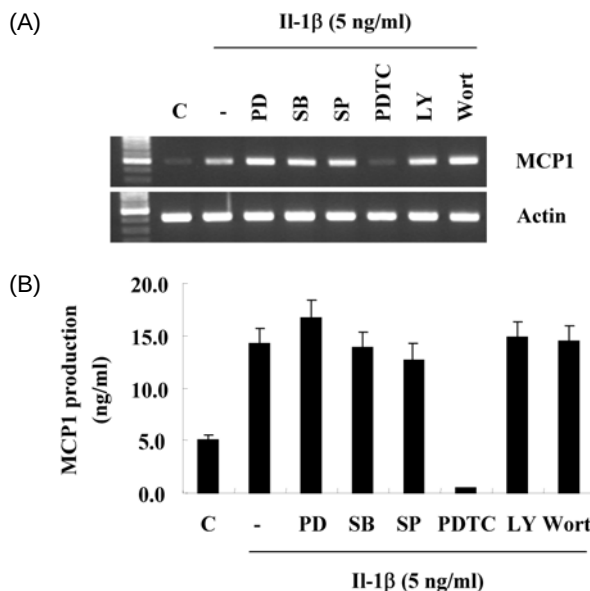


Fig. 2. NF- κ B is involved in IL-1 β -induced MCP-1 expression. HASMCs were pretreated with the several inhibitors, PD98059, SB203580, SP600125, PDTTC, LY294002 and wortmannin for 30 min prior to IL-1 β (5 ng/ml) treatment for 10 h. (A) Total RNA was isolated, and RT-PCR analysis was performed using MCP-1 gene-specific primers and the internal control gene, β -actin. Two additional experiments yielded similar results. A representative study is shown. (B) The amount of secreted MCP-1 protein was determined in the supernatant after IL-1 β treatment for 10 h using the human MCP-1 ELISA kit. Data are presented as mean values obtained from three independent experiments, and bars represent standard deviations.

대식세포가 그 부위에 침윤되어 경화 및 섬유화를 유발하는데 중요한 역할을 하는 chemokine이다. 이러한 MCP1의 발현 조절은 혈관벽의 경화나 섬유화를 완화시키는데 도움을 줄 것이라고 사료된다. 우리는 이 실험에서 MCP1의 발현 조절에 영향을 미치는 항염증물질을 찾기 위해 잘 알려진 항염증물질인 curcumin, baicalein, baicalin, resveratrol, quercetin, luteolin 등을 각각 30분간 전처리한 후 IL-1 β 를 10시간 동안 처리하여 MCP1의 mRNA 발현을 조사하였다. 여러 물질들 중 luteolin의 전처리가 IL-1 β 에 의해 증가한 MCP1의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 3A). Luteolin을 전처리하고 IL-1 β 를 10시간 동안 처리한 세포의 배양액을 수거하여 ELISA를 이용해 MCP1의 단백질 발현을 조사해 본 결과 luteolin의 전처리에 의해 MCP1의 단백질 발현 역시 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 이 때 luteolin의 전처리는 세포의 생존(cell viability)에는 아무런 영향이 없음을 확인하였다(data not shown). 즉, luteolin의 전처리는 IL-1 β 에 의해 증가한 MCP1의 mRNA 발현을 감소시켜 단백질의 분비를 감소시켰다.

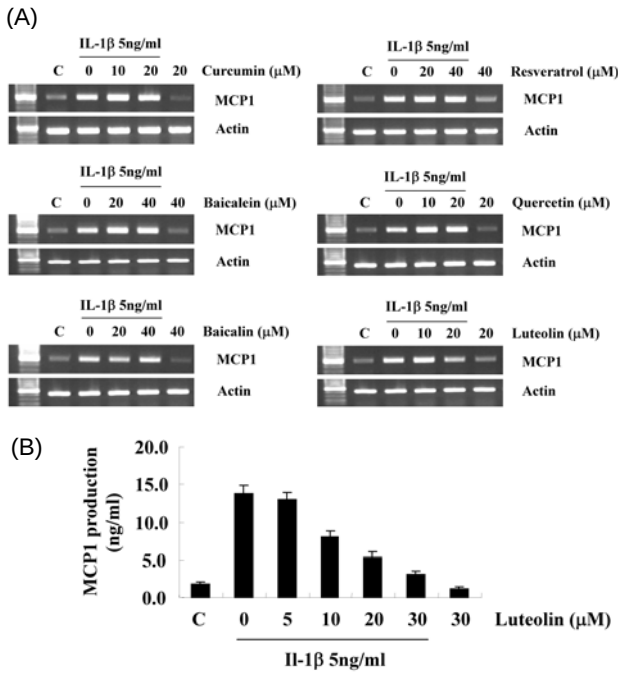


Fig. 3. Luteolin suppresses IL-1β-induced MCP-1 expression. (A) HASMCs cells were treated with indicated concentrations of curcumin, baicalin, baicalin, resveratrol, quercetin and luteolin in absence or presence of IL-1β (5 ng/ml). MCP1 transcript levels were determined by RT-PCR. (B) Conditional medium was collected after 10 hrs and MCP-1 ELISA was performed. Data represent the mean of at least three independent experiments; bars, ±SD.

Luteolin에 의한 NF-κB 활성 억제

이상의 결과들을 살펴볼 때 IL-1β에 의한 MCP1 발현 증가에 전사인자 NF-κB의 활성이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 luteolin이 MCP1의 발현을 전사단계에서 조절한다는 것을 확인하였으므로 luteolin이 NF-κB의 활성 조절을 통해 MCP1의 발현을 억제하는지 조사하였다. 사람 평활근 세포에 luteolin을 전처리하고 5 ng/ml의 IL-1β를 10시간 처리한 후 nucleus를 분리하여 EMSA를 수행하였다. NF-κB binding site를 포함하는 oligonucleotide를 동위 원소로 labeling하여 EMSA를 수행한 결과 IL-1β에 의해 NF-κB DNA binding 활성 증가를 확인하였고 luteolin의 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 뿐만 아니라 NF-κB의 p65 항체를 이용하여 NF-κB의 세포 내 위치를 confocal microscopy로 관찰한 결과 IL-1β에 의해 NF-κB의 subunit인 p65가 핵으로 이동한 것이 보이고 luteolin의 전처리에 의해 핵으로의 이동이 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이상의 결과로부터 IL-1β의 처리에 의해 증가된 NF-κB의 활성이 MCP1 발현에 중요하다는 것을 확인하였고 luteolin이 전사인자 NF-κB의 활성화에 따른 핵으로의 이동을 저해함으로써 DNA

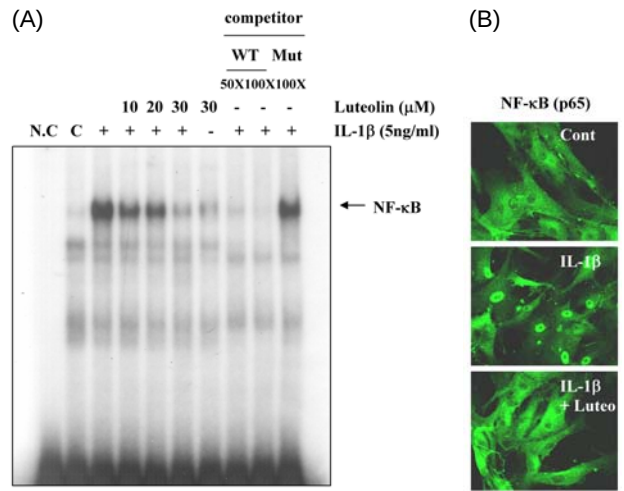


Fig. 4. Luteolin suppresses IL-1β-induced MCP1 expression via inactivation of NF-κB. (A) HASMCs were pretreated with luteolin at the indicated concentrations prior to IL-1β for 6 h. Nuclear extracts were prepared, and EMSA conducted using [³²P]-labeled NF-κB-specific oligonucleotide. (B) HASMCs were seeded onto 8-well chamber slides and pretreated with several inhibitors prior to IL-1β treatment for 6 h. After fixation and permeabilization, cells were stained with FITC-labeled anti-p65 antibody. FITC fluorescence was visualized under a confocal microscope.

binding 활성을 저해하여 MCP1의 mRNA 전사를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

단핵구 및 대식세포의 혈관벽으로의 이동이 동맥경화의 초기 발병에 있어서 중요한 기전임이 잘 알려져 있다. Chemokines의 하나인 MCP1은 혈관내피세포나 평활근 세포에서 분비되어 단핵구나 대식세포 등을 혈관벽으로 끌어들이는 데 있어서 중요한 역할을 하는 단백질이다[16,17,21]. 본 연구에서는 사람 평활근 세포에 IL-1β를 처리하여 MCP1의 발현을 확인해 본 결과 MCP1의 발현이 증가되고 이러한 증가가 전사인자인 NF-κB의 활성화를 통한 MCP1의 mRNA 발현 증가에 의한 것임을 확인하였다(Fig. 2). 앞선 많은 보고들에서 MCP1이나 그 수용체인 CCR2의 발현을 억제하면 동맥경화의 병변 형성이 억제된다는 것을 보여주었다[4-6]. 여러 항염증 활성을 가지는 물질들 중에 MCP1의 발현을 억제하는 물질을 찾고자 이들 물질을 전처리한 후 IL-1β에 의해 증가되는 MCP1의 발현에 변화가 있는지 확인해 보았다. 여러 물질들 중 luteolin의 전처리에 의해서 IL-1β에 의해 증가된 MCP1의 발현이 감소되는 것을 확인하였고 이는 mRNA의 발현 감소에 따른 결과라는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). Luteolin에 의한 MCP1 mRNA의 발현 감소가 전사인자 NF-κB의 활성화와 관련

이 있는지 확인해 보고자 평활근 세포에 luteolin을 전처리한 후 IL-1 β 를 처리하여 NF- κ B DNA binding 활성을 EMSA로 확인해 보았다. IL-1 β 의 처리에 의해 NF- κ B DNA binding이 증가하고 luteolin 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). NF- κ B의 세포내 위치를 확인해 보기 위해 IL-1 β 와 luteolin을 처리한 세포에서 p65 항체를 이용하여 confocal microscope로 관찰해 본 결과도 luteolin의 전처리가 NF- κ B의 활성화에 따른 핵으로의 이동을 저해하는 것을 보여 준다(Fig. 4B). 이 결과는 luteolin이 MCP1의 발현 억제뿐만 아니라 다른 항염증 작용에 있어서도 전사인자 NF- κ B의 활성을 억제하는 기전을 통해 영향을 미칠 가능성을 보여준다.

이미 다른 보고에 따르면 luteolin이 전사인자인 NF- κ B의 활성 저해를 통해 채장 β -세포에서 여러 cytokines에 의해 증가된 iNOS의 발현을 저해한다는 보고가 있다[8]. 뿐만 아니라 쥐의 대식 세포에서 lipopolysaccharides (LPS)에 의해 증가된 여러 cytokine들의 발현이 luteolin에 의해 감소되고 이것이 전사인자 NF- κ B와 AP-1의 활성을 저해함으로써 일어나는 현상이 보고되어 있다[2]. 여러 보고들에 의하면 MCP1의 발현 조절에 NF- κ B뿐만 아니라 AP-1도 관여함을 알 수 있다[10]. Luteolin이 JNK와 AP-1의 활성화의 저해를 통해 IL-6의 생산을 감소시킨다는 보고가 있다[7]. 본 연구에서 luteolin에 의한 MCP1의 발현 감소에 AP-1의 활성 조절이 관여하는지 확인해 볼 필요성이 있을 거라 사료되어 진다. 여러 보고들이 luteolin과 비슷한 구조를 가지는 quercetin이 비슷한 양상의 항염증 및 항암 작용을 나타낸다고 보여주고 있으나 본 연구에서는 평활근 세포에서 IL-1 β 에 의해 증가된 MCP1의 발현 조절에서는 서로 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있었다(Fig. 2A)[8]. 이러한 결과는 luteolin이 다른 세포에서와는 달리 평활근 세포에서 매우 특이적으로 작용할 가능성을 시사하고 있다. 식용식물에서 흔히 발견되는 luteolin에 의한 MCP1의 mRNA 발현 억제기전에 대한 이해는 동맥경화의 초기 발병을 예방 및 치료하는 약제 개발에 도움을 줄 것으로 사료되어 진다.

요 약

혈관벽에 단핵구, 대식세포 등의 세포와 지질 등의 축적은 중요한 동맥경화 발병 요인이다. 이들 세포의 혈관벽으로의 이동에 있어서 chemokine인 MCP1이 중요한 역할을 한다는 것이 많이 알려져 있다. 본 연구에서는 사람 평활근세포에서 IL-1 β 의 처리에 의하여 MCP1의 발현이 증가되는 기전을 알아 보고자 실험을 진행하였다. IL-1 β 의 처리는 전사인자 NF- κ B의 활성화를 통해 MCP1 발현을 전사단계에서 증가시켰다. 이러한 IL-1 β 에 의해 증가된 MCP1 발현을 억제하는 물질을 찾기 위해 여러 항염증작용을 하는 물질들을 전처리하여 확인해 본 결과 luteolin이 선택적으로 IL-1 β 에 의해 증가된 MCP1의 발현을 전사단계에서 저해하는 것을 확인하였고 이는 전사인

자 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것을 감소시킴으로써 나타나는 현상을 확인하였다. Luteolin이 염증작용을 조절하는데 있어서 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성을 조절한다는 것을 본 실험을 통해 알 수 있었고 이는 식용식물에서 일반적으로 발견되는 luteolin이 어떠한 기전으로 항 염증작용을 하는지에 대한 이해를 높여줄 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 MRC (R13-2002-028-03001-0) 지원에 의하여 이루어진 결과입니다.

References

- Baek, W. K., J. W. Park, J. H. Lim, S. I. Suh, M. H. Suh, E. Gabrielson, and T. K. Kwon. 2002. Molecular cloning and characterization of the human budding uninhibited by benomyl (BUB3) promoter. *Gene* **295**, 117-123.
- Chen, C. Y., W. H. Peng, K. D. Tsai, and S. L. Hsu. 2007. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci.* **81**, 1602-1614.
- Comalada, M., I. Ballester, E. Bailon, S. Sierra, J. Xaus, J. Galvez, F. S. de Medina, and A. Zarzuelo. 2006. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1010-1021.
- Dawson, T. C., W. A. Kuziel, T. A. Osahar, and N. Maeda. 1999. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **143**, 205-211.
- Gosling, J., S. Slaymaker, L. Gu, S. Tseng, C. H. Zlot, S. G. Young, B. J. Rollins, and I. F. Charo. 1999. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* **103**, 773-778.
- Gu, L., Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby, and B. J. Rollins. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275-281.
- Jang, S., K. W. Kelley, and R. W. Johnson. 2008. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7534-7539.
- Kim, E. K., K. B. Kwon, M. Y. Song, M. J. Han, J. H. Lee, Y. R. Lee, J. H. Lee, D. G. Ryu, B. H. Park, and J. W. Park. 2007. Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear factor kappaB activation. *Pancreas* **35**, e1-9.
- Lamy, S., V. Bedard, D. Labbe, H. Sartelet, C. Barthomeuf, D. Gingras, and R. Beliveau. 2008. The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and

- VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation. *Cancer Prev. Res. (Phila Pa)*. **1**, 452-459.
10. Martin, T., P. M. Cardarelli, G. C. Parry, K. A. Felts, and R. R. Cobb. 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1091-1097.
 11. Peters, W. and I. F. Charo. 2001. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 175-180.
 12. Rollins, B. J. and J. S. Pober. 1991. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **138**, 1315-1319.
 13. Rollins, B. J., T. Yoshimura, E. J. Leonard, and J. S. Pober. 1990. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* **136**, 1229-1233.
 14. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
 15. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126.
 16. Rossi, D. and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 217-242.
 17. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 593-620.
 18. Sharma, V., M. Mishra, S. Ghosh, R. Tewari, A. Basu, P. Seth, and E. Sen. 2007. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res. Bull.* **73**, 55-63.
 19. Shimoi, K., H. Okada, M. Furugori, T. Goda, S. Takase, M. Suzuki, Y. Hara, H. Yamamoto, and N. Kinae. 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.* **438**, 220-224.
 20. Xagorari, A., A. Papapetropoulos, A. Mauromatis, M. Economou, T. Fotsis, and C. Roussos. 2001. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 181-187.
 21. Zlotnik, A. and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.
 22. Zoja, C., J. M. Wang, S. Bettoni, M. Sironi, D. Renzi, F. Chiaffarino, H. E. Abboud, J. Van Damme, A. Mantovani, G. Remuzzi, and A. Rambaldi. 1991. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* **138**, 991-1003.