Phenethyl Isothiocyanate가 Toll-like Receptor Agonists에 의해 유도된 Nuclear Factor- κ B 활성화와 Cyclooxygenase-2, Inducible Nitric Oxide Synthase 발현에 미치는 효과

김수정^{1†} · 박혜정^{1†} · 신화정² · 김지수¹ · 안희진¹ · 민인순³ · 윤형선^{1,2*}

순천향대학교 의료과학대학 ¹임상병리학과, ²의료과학과, ³보건행정경영학과

The Effects of Phenethyl Isothiocyanate on Nuclear Factor- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Induced by Toll-like Receptor Agonists

Soo-Jung Kim^{1†}, Hye-Jeong Park^{1†}, Hwa-Jeong Shin², Ji Soo Kim¹, Hee Jin Ahn¹, In Soon Min³, and Hyung-Sun Youn^{1,2*}

Department of ¹Biomedical Laboratory Science, ²Medical Science, and ³Healthcare Management, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University

Received September 30, 2011; Accepted November 2, 2011

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in induction of innate immune responses. The activation of TLRs triggers inflammatory responses that are essential for host defense against invading pathogens. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) extracted from cruciferous vegetables has an effect on anti-inflammatory therapy. Dysregulated activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) has been shown to play important roles in the development of certain inflammatory disease. To evaluate the therapeutic potential of PEITC, NF- κ B activation and COX-2 and iNOS expression induced by lipopolysaccharide (LPS, TLR4 agonist), polyinosinic-polycytidylic acid (Poly[I:C], TLR3 agonist), 2 kDa macrophage-activating lipopeptide (MALP-2, TLR2 and TLR6 agonist) or oligodeoxynucleotide 1668 (ODN1668, TLR9 agonist) were examined. PEITC inhibits the activation of NF- κ B induced by LPS or Poly[I:C] but not by MALP-2 or ODN1668. PEITC also suppressed the iNOS expression induced by LPS or Poly[I:C]. However, PEITC did not suppress COX-2 expression induced by LPS, Poly[I:C], MALP-2, or ODN1668. These results suggest that PEITC has the specific mechanism for anti-inflammatory responses.

Key words: cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, inflammation, nuclear factor- κ B, phenethyl isothiocyanate

서론

염증은 여러 분자학적인 기전에 의해서 유도되는데, 그 중에서도 두 가지 중요한 반응에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 하나는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의한 prostaglandins (PGs)의 생성이고, 다른 하나는 inducible nitric oxide synthase

(iNOS)에 의한 nitric oxide (NO)의 생산이다[Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002]. 염증이 발생하는 동안 NO나 PG의 생성이 증가하며, 증가된 NO나 PGs는 고초열(hay fever), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 관절염(rheumatoid arthritis), 알츠하이머(Alzheimer's disease), 암(cancer)과 같은 여러 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다[Moncada and Higgs, 1991; Claria, 2003]. Cytokines, UV irradiation과 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 bacterial endotoxins은 전사요소 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성화를 유도해서 NO나 PGs의 발현을 유도한다[Baldwin, 1996].

Toll-like receptors (TLRs)는 선천성 면역(innate immunity) 반응을 유도하고, 뒤이어 후천성 면역(acquired immunity) 반응을 유도하는 중요한 역할을 한다. TLRs에 agonists가 붙으면

S. J. Kim[†] and H. J. Park[†] contributed equally.

*Corresponding author
Phone: +82-41-530-3086; Fax: +82-41-530-3085
E-mail: hyoun@sch.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.045>

myeloid differential factor 88 (MyD88) 또는 Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF)를 통한 신호 전달 체계를 통하여 NF- κ B를 활성화 시킨다[Takeda and Akira, 2005]. NF- κ B는 인간의 면역반응을 위해서 중요한 역할을 하는 전사 요소이다. 많은 종류의 박테리아나 바이러스가 NF- κ B 활성화를 유도하며, 활성화된 NF- κ B는 여러 타깃 유전자의 발현을 조절해 염증(inflammation)을 유도하여 여러 질병을 일으키게 된다[Pahl, 1999]. NF- κ B는 주로 이종이합체(heterodimerization)의 형태로 NF- κ B 억제제 inhibitor of kappa B alpha (I κ B α)와 결합하여 세포질(cytoplasm) 안에 존재한다. 여러 병원체들에 의해 활성화된 신호들은 I κ B α 를 인산화(phosphorylation) 시키며, 인산화된 I κ B α 는 26S proteasome에 의해서 분해되어 NF- κ B를 자유롭게 만든다. 세포질 안에 있던 NF- κ B는 핵(nucleus) 안으로 전좌(translocation)되어 DNA에 결합하여 타깃 유전자의 발현을 자극해 암이나 질병을 유발하게 된다[Pahl, 1999; Ghosh and Karin, 2002]. 그러므로, 병원균들에 의해 유도된 NF- κ B 활성화를 억제 시킬 수 있다면, NF- κ B 활성화에 의해 유도되는 COX-2, iNOS와 같은 염증 유전자들의 발현을 감소시켜 암이나 여러 질병들을 예방할 수 있게 되는 것이다[Pahl, 1999].

천연물 중에는 LPS, double stranded RNA (dsRNA)와 같은 여러 병원균들의 자극에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시키는 많은 phytochemicals이 포함되어 있다[Surh, 2003; Zingarelli *et al.*, 2003; Youn *et al.*, 2005; 2006b; 2006c; 2008; 2009; Park *et al.*, 2009]. 그 중에서도 브로콜리, 꽃양배추(cauliflower)와 같은 십자화과 식물(cruciferous vegetables)에 풍부하며 유기황(organosulfur)을 포함하고 있는 phenethyl isothiocyanate (PEITC)가 있다 (Fig. 1). PEITC는 폐(lung), 식도(esophagus), 젖샘(mammary gland), 간(liver), 소장(small intestine), 방광(bladder)에 생긴 암을 억제시키는 것으로 알려져 있다[Zhang, 2004]. PEITC는 matrix metalloproteinase (MMP)-2와 MMP-9의 억제에 의해 HT29 colon 암세포의 이동(migration)과 침윤(invasion)을 억제시키는 것으로 알려져 있다[Lai *et al.*, 2011]. 또한 PEITC는 LPS에 의해서 유도된 iNOS의 발현을 억제하여 NO의 생성을 억제시키는 것으로 보고되었다[Rose *et al.*, 2005].

우리는 이번 연구에서 PEITC가 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2, iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

재료 및 방법

재료. 실험에 사용한 phenethyl isothiocyanate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 회사로부터 구입하였다. LPS는 List Biological Lab (San Jose, CA), 2 kDa macrophage-activating lipopeptide (MALP-2)는 Alexis Biochemicals (Braunschweig, Germany), polyinosinic-polycytidylic acid (poly[I:C])는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), oligodeoxynucleotide 1668 (ODN1668)은 Invivogen (San Diego, CA) 회사로부터 각각 구입하였다. COX-2와 β -actin 항체는 Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz, CA) 회사로부터, iNOS 항체는 BD Biosciences (San Jose, CA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다.

세포 배양. RAW 264.7 cells (a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)은 10% (v/v) FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 5% CO₂/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

Plasmid. NF- κ B 발광 plasmid는 F. Mercurio (Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA)로부터 제공받았으며, iNOS 발광 plasmid는 Daniel Hwang (University of California, Davis, CA)로부터 제공받았으며, Heat shock protein (HSP) 70- β -galactosidase plasmid는 R. Modlin (University of California, Los Angeles, CA)으로부터 제공받았다. Transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA)을 사용하여 준비되었다.

트랜스펙션(transfection)과 발광효소 유전자 분석(luciferase reporter gene assay). 발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다[Youn *et al.*, 2005; 2006c]. 발광효소 plasmid와 HSP70- β -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약(Qiagen)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광 효소의 활성화는 luciferase assay system (Promega, Madison, WI)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는 β -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

Western blotting. 선행연구의 방법에 의하여 단백질 추출물들은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었다[Youn *et al.*, 2006a; 2006b]. Membrane은 0.1% Tween 20, 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline로 blocking 한 후 1차 항체로 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, iNIRON Western blot detection system (Seongnam, Korea)을 사용하여 원하는 단백질을 규명하였다.

세포생존율 시험(MTS assay). 세포 생존율 시험은 선행연구에 사용하였던 방식을 따라 하였다[Park and Youn, 2010]. 세포 생존율은 잘 알려진 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)을 사용한 색깔변화에 의해서 평가하였다. 세포 생존율 시험은 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega)을 가지고 제조사의 방법에 따라서 측정하였다.

통계 분석. 각각의 데이터 값은 세 개가 한 벌의 실험으로 얻어졌으며, mean $\pm$ standard error mean (SEM)으로 표현되었다.

결과 및 고찰

PEITC에 의한 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화. PEITC의 세포독성을 측정하기 위해서 MTS assay를 사용하여 세포생존율을 확인하였다. PEITC는 15 μ M의 농도에서 99%, 20 μ M 농도에서 89%의 세포 생존율을 보여주었다 (Fig. 1B). 그래서 PEITC는 15 μ M의 농도까지만을 사용하여 실험

Fig. 1. Effect of PEITC on cell viability. (A) The structure of phenethyl isothiocyanate (PEITC). (B) RAW 264.7 cells were treated with PEITC (10, 15, 20 mM) for 4 h. Twenty microliters of the Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent was added directly to culture wells. The plate was incubated at 37°C for 4 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The absorbance was recorded at 490 nm with a 96-well plate reader. PEITC, phenethyl isothiocyanate.

험을 하였다.

TLRs 신호전달 체계는 NF- κ B 전사인자가 포함된 downstream 신호전달체계를 활성화시킨다[Akira and Takeda, 2004]. NF- κ B는 NF- κ B 억제제 I κ B α 와 결합하여 세포질 (cytoplasm) 안에 존재한다. 여러 병원체들에 의해 활성화된 신호들은 I κ B α 를 인산화(phosphorylation) 시키며, 인산화 된 I κ B α 는 26S proteasome에 의해서 분해되어 NF- κ B를 자유롭게 만든다. 자유롭게 된 NF- κ B는 핵(nucleus) 안으로 전좌 (translocation)되어 DNA에 결합하여 타깃 유전자의 발현을 자극해 암이나 질병을 유발하게 된다[Pahl, 1999; Ghosh and Karin, 2002]. 우리는 NF- κ B 발광효소 유전자 분석실험을 통해 NF- κ B 활성화에 대한 PEITC의 효능을 측정하였다. PEITC는 LPS 또는 poly[I:C]에 의해 유도된 NF- κ B 활성을 억제하였다 (Figs. 2A and 2B). 하지만 PEITC는 MALP-2 (TLR2와 TLR6 agonist) 또는 ODN1668 (TLR9 agonist)에 의해 유도된 NF- κ B 활성화는 억제하지 못하였다(Figs. 2C and 2D). PEITC는 또한 LPS에 의해 유도된 I κ B α 의 분해를 억제하였다(Fig. 2E). LPS와 Poly[I:C]는 TRIF-dependent 신호전달체계를 이용하여 NF- κ B활성화를 유도하지만, MALP-2와 ODN1668은 MyD88-dependent 신호전달체계를 이용하여 NF- κ B활성화를 유도한다. LPS는 또한 MyD88-dependent 신호전달체계를 이용하여 NF- κ B활성화를 유도할 수 있다. 그러므로 이러한 결과는 PEITC가 TLRs의 TRIF-dependent 신호전달체계만을 조절한다는 것을 의미한다고 볼 수 있겠다.

PEITC에 의한 TLRs agonists에 의해서 유도된 COX-2 발현. 다음으로 우리는 PEITC가 NF- κ B활성을 통해 조절되는 유전자 중 하나인 COX-2 발현을 조절하는지 확인하였다. Western blotting 방법으로 실험한 결과 PEITC는 RAW 264.7세포에서 LPS (TLR4 agonist), Poly[I:C] (TLR3 agonist), MALP-2 (TLR2 and TLR6 agonist), ODN1668 (TLR9 agonist)과 같은

Fig. 2. PEITC suppresses the activation of NF- κ B induced by LPS or poly[I:C], but not by MALP-2 or CpG DNA. (A-D) RAW 264.7 cells were transfected with NF- κ B-luciferase reporter plasmid and pretreated with PEITC (10, 13, 15 μ M) for 1 h and then treated with LPS (10 ng/mL) (A), poly[I:C] (10 μ g/mL) (B), MALP-2 (10 ng/mL) (C), or ODN1668 (0.5 μ M) (D) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in Materials and Methods. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean $\pm$ SEM (n=3). **, Significantly different from LPS alone (A), $p < 0.01$. ++, Significantly different from poly[I:C] alone (B), $p < 0.01$. (E) RAW 264.7 cells were pretreated with 10, 13, or 15 mM PEITC for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed for I κ B α and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; PEITC, phenethyl isothiocyanate; LPS, lipopolysaccharide; poly[I:C], polyinosinic-polycytidylic acid; MALP-2, Macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa; ODN, oligodinucleotide 1668

여러 TLR agonists에 의해 유도된 COX-2 발현을 억제하지 않았다(Figs. 3A-D).

PEITC에 의한 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해 유도된 iNOS 발현. 다음 실험은 PEITC가 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. iNOS 발광효소 유전자 분석실험과 Western blotting 방법으로 실험한 결과 PEITC는 RAW 264.7세포에서 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해 유도된 iNOS 발현을 억제하였다 (Figs. 4A-D).

NF- κ B는 염증을 유발하는 타깃 유전자의 빠른 활성화와 다양한 병원체의 자극에 의하여 활성화 된다[Akira and Takeda,

Fig. 3. PEITC does not inhibit COX-2 expression induced by TLR agonists. (A-D) RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 15 μ M PEITC for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/mL) (A), poly[I:C] (10 μ g/mL) (B), MALP-2 (10 ng/mL) (C), or ODN1668 (0.5 μ M) (D) for 8 h. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; PEITC, phenethyl isothiocyanate; LPS, lipopolysaccharide; poly[I:C], polyinosinic-polycytidylic acid; MALP-2, Macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa; ODN, oligodinucleotide 1668

2004]. 그러므로 NF- κ B활성의 억제는 항염증 치료제 개발에 중요한 전략으로 여겨진다. TLRs 신호전달체계의 활성화는 cytokine, COX-2, iNOS와 같은 염증 유전자 물질을 유도한다[Akira and Takeda, 2004]. 이번 연구에서 우리는 염증을 유발하는데 중요한 요소인 NF- κ B 활성화와 두 가지 효소인 COX-2와 iNOS 발현을 PEITC가 조절할 수 있는지 연구하였다. PEITC는 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화는 억제하였지만, MALP-2와 ODN1668에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화는 억제시키지 못하였다(Figs. 2A-D). 하지만 흥미롭게도 PEITC는 LPS, Poly[I:C], MALP-2, ODN1668에 의해서 유도된 COX-2 발현은 억제시키지 못하였지만(Figs. 3A-D), LPS 또는 Poly[I:C]에 의해 유도된 iNOS 발현은 억제하였다(Figs. 4A-D). TLRs 신호전달 체계는 MyD88 또는 TRIF-dependent 신호전달 체계를 통하여 NF- κ B를 활성화시킨다[Akira and Takeda, 2004]. 그러므로 PEITC가 TLR3, TLR4 agonists인 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시켰으므로 iNOS와 COX-2의 발현을 모두 억제 시킬 것이라고 기대하였다. 그러나 PEITC는 LPS 또는 Poly[I:C]에 의해 유도된 iNOS 발현만을 억제하였다. 이 결과는 iNOS와 COX-2유전자들이 다른 메커니즘에 의해 조절된다는 것을 제안한다. LPS에 의해 유도된 대다수의 유전자들은 TRIF-dependent 신호전달체계를 통하여 조절되는 것으로 알려져 있다[Bjorkbacka *et al.*, 2004]. 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현의 대부분은 TRIF-dependent 신호전달체계에 의해 조절된다고 보고되었으며[Gao *et al.*, 1998], COX-2 발현의 대부분은 MyD88-dependent 신호전달 체계에 의해 조절된다고 보고되었다[Hwang *et al.*, 1997]. Poly[I:C] (TLR3 agonist)와 LPS (TLR4 agonist)는 TRIF-dependent신호전달체계를 이용하여 NF- κ B활성화를 유도하지만, MALP-2 (TLR2와 TLR6 agonist)와 ODN1668 (TLR9

Fig. 4. PEITC inhibits iNOS expression induced by LPS or Poly[I:C]. (A,B) RAW 264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and pretreated with 10 or 15 μ M PEITC for 1 h and then treated with LPS (10 ng/mL) (A) or poly[I:C] (10 μ g/mL) (B) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=3). **Significantly different from LPS alone, $p < 0.01$. +, Significantly different from poly[I:C] alone (B), $p < 0.05$ (+), $p < 0.01$ (++). (C,D) RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 15 μ M PEITC for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/mL) (C) or poly[I:C] (10 μ g/mL) (D) for 8 h. Cell lysates were analyzed for iNOS and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; PEITC, phenethyl isothiocyanate.

agonist)은 MyD88-dependent 신호전달체계를 이용하여 NF- κ B활성화를 유도한다. 이 모든 결과들은 PEITC가 TLRs의 TRIF-dependent 신호전달체계를 조절할 수 있다는 것을 보여 준다. 즉 PEITC가 TRIF-dependent 신호전달체계에 의해 조절되는 iNOS는 억제하지만 MyD88-dependent 신호전달 체계에 의해 조절되는 COX-2는 억제하지 못한다는 것을 설명해준다. 미래에는 PEITC가 TRIF-dependent 신호전달체계를 어떻게 조절하여 NF- κ B 활성화와 iNOS의 발현을 억제시키는지 그 작용기전을 규명할 것이다.

우리는 처음으로 PEITC가 TLR agonists에 의해 유도된 NF- κ B 활성화와 iNOS의 발현은 억제하지만, COX-2 발현은 억제하지 않는다는 것을 밝혀내었다. 이러한 결과들은 항염증제 개발에 있어서 새로운 패러다임을 제공할 것으로 기대한다.

초 록

염증의 중요한 분자학적 기전에는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의한 prostaglandins (PGs) 생성과 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의한 nitric oxide (NO) 생성이 있다. 많은 종류의 박테리아나 바이러스가 전사요소인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시켜 여러 타겟 유전자의 발현을 조절해 PGs나 NO와 같은 염증물질을 유도하게 된다. 우리는 이번 실험을 통하여 phenethyl isothiocyanate (PEITC)가 toll-like receptor (TLR) agonists에 의해 유도된 NF- κ B활성과 COX-2, iNOS 발

현에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보았다. PEITC는 lipopolysaccharide (LPS)와 polyinosinic-polycytidylic acid (poly[I:C])에 의해 유도된 NF- κ B활성을 억제시켰다. 또한 PEITC는 LPS와 Poly[I:C]에 의해 유도된 iNOS의 발현도 억제시켰다. 하지만 PEITC는 TLR agonists들인 LPS, Poly[I:C], 2 kDa macrophage-activating lipopeptide (MALP-2), oligodeoxynucleotide 1668 (ODN1668)에 의한 COX-2 발현은 억제시키지 못하였다. 즉 PEITC가 TRIF-dependent 신호전달체계를 조절하여 TRIF-dependent 신호전달체계에 의해 조절되는 iNOS는 억제하지만 MyD88-dependent 신호전달 체계에 의해 조절되는 COX-2는 억제하지 못한다는 것을 설명해준다. 이러한 결과는 iNOS와 COX-2가 서로 다른 메커니즘에 의해 조절된다는 것을 암시하며, PEITC가 여러 병원균들로부터 유도되는 염증반응이나 만성적인 질병들을 조절할 수 있음을 제시하는 중요한 결과이다.

Key words: cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, inflammation, nuclear factor- κ B, phenethyl isothiocyanate

참고문헌

- Akira S and Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499–511.
- Baldwin AS Jr (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649–683.
- Bjorkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, and Freeman MW (2004) The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics* **19**, 319–330.
- Claria J (2003) Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* **9**, 2177–2190.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, and Murphy WJ (1998) Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: Pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* **161**, 4803–4810.
- Ghosh S and Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**, Suppl, S81–96.
- Hwang D, Jang BC, Yu G, and Boudreau M (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol* **54**, 87–96.
- Lai KC, Hsu SC, Kuo CL, Ip SW, Yang JS, Hsu YM, Huang HY, Wu SH, and Chung JG (2011) Phenethyl Isothiocyanate Inhibited Tumor Migration and Invasion via Suppressing Multiple Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer HT29 Cells. *J Agric Food Chem* (in press).
- Moncada S (1999) Nitric oxide: Discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* **92**, 164–169.
- Moncada S and Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* **21**, 361–374.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853–6866.
- Park SJ, Song HY, and Youn HS (2009) Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by isoliquiritigenin in RAW264.7 macrophages. *Mol Cells* **28**, 365–368.
- Park SJ and Youn HS (2010) Isoliquiritigenin suppresses the Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon-beta (TRIF)-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by targeting TBK1. *J Agric Food Chem* **58**, 4701–4705.
- Rose P, Won YK, Ong CN, and Whiteman M (2005) Beta-phenylethyl and 8-methylsulphonyloctyl isothiocyanates, constituents of watercress, suppress LPS induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. *Nitric Oxide* **12**, 237–243.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768–780.
- Takeda K and Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1–14.
- Turini ME and DuBois RN (2002) Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med* **53**, 35–57.
- Youn HS, Ahn SI, and Lee BY (2009) Guggulsterone suppresses the activation of transcription factor IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists. *Int Immunopharmacol* **9**, 108–112.
- Youn HS, Lee JK, Choi YJ, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH, and Lee JY (2008) Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization. *Biochem Pharmacol* **75**, 494–502.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, and Hwang DH (2005) Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: Molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* **175**, 3339–3346.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, and Hwang DH (2006a) Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 866–871.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, and Hwang DH (2006b) Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol* **72**, 850–859.
- Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, and Hwang DH (2006c) Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol* **72**, 62–69.
- Zhang Y (2004) Cancer-preventive isothiocyanates: Measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res* **555**, 173–190.
- Zingarelli B, Sheehan M, and Wong HR (2003) Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* **31**, S105–111.