

개 말초혈액 탐식세포의 탐식반응에 따른 순간산소 과소비현상에 있어 1,2-benzopyrone의 면역증강효과

김현아 · 강지훈 · 양만표¹

충북대학교 수의과대학 수의내과학교실 및 동물의학연구소

Immunoenhancing Effect of 1,2-Benzopyrone on the Oxidative Burst Activity to Phagocytic Response of Canine Peripheral Blood Phagocytes

Hyun-ah Kim, Ji-houn Kang and Mhan-pyo Yang¹

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

Abstract : 1,2-benzopyrone can stimulate macrophages to increase the ability of phagocytosis. Peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) and macrophages destroy microbial organisms with reactive oxygen species (ROS), called oxidative burst activity (OBA). This study was undertaken to determine whether 1,2-benzopyrone affects the OBA on the phagocytic response of canine peripheral blood phagocytes. The OBA of phagocytes in the addition or absence of latex beads was analyzed by flow cytometry system using dihydrorhodamine 123 (DHR). The direct treatments of 1,2-benzopyrone have no effect on the OBA of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), PMN and monocyte-rich cells regardless of addition of latex beads. When latex beads are added to PMN, the OBA of PMN was remarkably enhanced by culture supernatant from PBMC but not PMN treated with 1,2-benzopyrone. Similarly, it was also enhanced by human recombinant (hr) TNF- α . However, when latex beads were not added to PMN, its OBA was not enhanced by culture supernatant from either PBMC or PMN treated with 1,2-benzopyrone. The OBA of latex beads-phagocytized PBMC and monocyte-rich cells was not enhanced by culture supernatant from either PBMC or PMN treated with 1,2-benzopyrone. These results strongly suggested that 1,2-benzopyrone has an immunoenhancing effect on the OBA of PMN when phagocytic response occurred only. This enhanced OBA may be mediated through active humoral substance(s), such as TNF- α , produced by PBMC stimulated with 1,2-benzopyrone.

Key words : 1,2-benzopyrone, phagocytes, phagocytic response, oxidative burst activity (OBA), dog.

서 론

말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)는 동물의 체내에서 비특이적 면역반응을 조절하는 중요한 세포이며 interleukin (IL)-1, IL-2, IL-8, interferon들, tumor necrosis factor들 (TNFs), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 등의 물질을 분비하여 염증반응에 관여하고^{20,26,28,29}, 이러한 물질들은 다형핵백혈구 (polymorphonuclear cell; PMN)나 대식세포 (macrophage)의 유주¹¹, 탐식 및 lysosomal enzyme들의 분비과정¹을 조절한다. 특히 탐식세포들은 외부물질을 탐식한 후 소화과정에서 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)을 생성함으로써 세균, 진균 및 바이러스 등의 미생물을 파괴시킨다. 이러한 탐식세포의 일시적인 산소 소모를 oxidative burst activity (OBA; 순간산소 과소비현상)라 한다⁶. 탐식반응이 일어나면 그와 동시에 세포막에 존재하는 nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate reduced (NADPH) oxidase가 활성화되어 산소가 산화된다¹⁰. Oxidase system에 의해 생성되는 첫 번째 중간체는 superoxide anion (O_2^-)이다. 이것의 대부분은 superoxide dismutase (SOD)에 의해 산소와 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 생성하고, H_2O_2 는 다시 myeloperoxidase (MPO)에 의해 phagosome 내에서 hypochlorous acid와 chloramine로 전환된다². 이러한 ROS 성분들은 이차적으로 산화성 탈탄산반응, 과산화반응, 할로겐화반응을 일으켜 세균이나 다른 세포들을 파괴시킨다^{4,21}.

1,2-benzopyrone은 여러 종류의 식물이나 세균, 그리고 몇몇의 동물로부터 추출한 천연 화합물이다⁸. 이것은 임상적 치료 약물로써, 림프부종, 혈전성 정맥염 및 경구용 항응고 요법에 응용되고 있다^{5,16,18}. 1,2-benzopyrone은 조직 속에 축적된 단백질과 소수성 결합을 하여 대식세포의 탐식반응을 용이하게 하고, 대식세포와 직접 결합하여 자극을 유도하기도 한다⁷. 이러한 자극으로 인해 혈액에서 순환중인 단핵세포 역시 손상된 조직으로 유주하여 분화하고 증식한다²⁷. 대식세포는 정상적으로 단백분해작용을 갖지만, 이 역할은 염증반응이 일어난 경우에 증가한다³.

¹Corresponding author.
E-mail : mpyang@cbnu.ac.kr

최근 1,2-benzopyrone은 말초혈액 탐식세포에 대해 탐식증강효과가 있는 것으로 밝혀졌다²⁴. 본 연구의 목적은 개의 말초혈액 탐식세포의 탐식반응에 따른 OBA에 있어서 1,2-benzopyrone의 면역증강 효과를 검토하는데 있다.

재료 및 방법

실험동물

임상적으로 건강한 평균 1.5세의 비글견들을 실온 (22±2°C)에서 낮 (12시간)과 밤 (12시간)의 리듬을 유지하면서 개장에서 개별 사육하였다. 사료는 펠렛 사료 (Fildmaster, Purina Korea, Seoul, Korea)를 급여하였다.

세포분리

혜파린을 처리한 주사기로 채혈한 말초혈액을 동량의 Histopaque (specific gravity, 1.077; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 위에 중층시킨 후, 실온에서 400×g로 30분 동안 원심분리를 하였다. 혈장과 Histopaque 층 사이에 있는 세포를 회수한 후, 0.83% NH₄Cl Tris-base buffer (pH 7.2)로 5분간 처리하고 phosphate-buffered saline (PBS; NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g/L, pH 7.6)으로 3회 세척하여 PBMC로 사용하였다. PBMC는 modified Wright-Giemsa 염색 후 감별계산을 한 결과, 림프구가 약 70%, 그리고 단구가 약 30%로 나타났다. Histopaque 층 아래의 적혈구와 혼합되어 있는 PMN은 1.5% dextran (분자량, 200,000; Wako Ltd., Osaka, Japan)에 현탁하여 45분간 정치시켜 적혈구를 침강시켰다. 그 후 부유된 세포를 회수하여 400×g로 5분간 원심분리하고 0.83% NH₄Cl Tris-base buffer로 용혈시킨 후, PBS로 3번 세척하여 PMN으로 사용하였다. PMN은 cytospin 원심 후, Diff-Quick 염색으로 확인한 결과 96% 이상이 호중구였다. PBMC 및 PMN의 세포생존율은 trypan blue exclusion test를 통해 검사한 결과, 항상 98% 이상이었다. 분리된 PBMC와 PMN은 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco Brl, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 gentamicin이 ml 당 0.02 mg 함유된 RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co.)에 현탁시켜 사용하였다.

배양상층액 및 TNF- α 희석액 제조

PBMC 및 PMN 현탁액을 24-multiwell plate (Nunc Co., Naperville, IL, USA)의 각 well에 2×10⁶개/ml씩 첨가하고 1,2-benzopyrone (Sigma-Aldrich Co.)을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Co.)에 녹인 후 PBS에 희석하여 최종농도가 100 μ M이 되도록 한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양상층액을 회수하여 5000×g로 3분간 원심분리한 후, 직경이 0.45 μ m인 filter를 이용하여 여과하였다. 제조된 배양상층액은 실험에 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다. Human recombinant (hr) TNF- α (Antigenix America Inc., NY, USA)는 0.5%

bovine serum albumin이 함유된 PBS로 녹인 다음 -70°C에서 보관하였다. 그 중 일부를 40 ng/ml이 되도록 RPMI 1640으로 희석하여 4°C에 보관하였고, 사용할 때 최종농도 1 ng/ml로 희석하여 사용하였다.

OBA 측정

제조된 PMN 및 PBMC 현탁액을 24-well plate에 1×10⁶개/500 μ l/well로 첨가하고, 1,2-benzopyrone 및 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC와 PMN 배양상층액을 다양한 농도로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 11시간 동안 배양하였다. 대조세포에는 동량의 1,2-benzopyrone의 희석액인 DMSO를 대신 첨가하였다. Latex bead 비첨가군 세포는 그대로 45분간 더 배양하고, latex bead 첨가군 세포에는 carboxylate-modified polystyrene latex bead (Sigma-Aldrich Co.)를 1×10⁹ particle/ml로 제조하여 20 μ l를 첨가하고 45분 동안 배양하여 탐식반응이 일어나게 하였다. 배양 마지막 15분에 두 군 모두 1 μ M의 dihydrorhodamine 123 (DHR) (Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하였다. 배양한 세포를 회수하여 400×g로 5분간 냉장 원심분리한 후, 3 mM EDTA-2Na (Sigma-Aldrich Co.)가 함유된 PBS로 3회 세척하였다. Latex bead를 첨가하지 않은 세포는 negative control로 사용하였다. Flow cytometer (BRYTE HS, Bio-Rad Microscience Ltd., Hertfordshire, England)의 cytography상에서 약 10,000개의 세포들 중 OBA를 나타내는 세포들의 rhodamine 형광강도를 측정하였다. Monocyte-rich cell은 PBMC의 flow cytometry cytography상에서 dot plot profile로부터 PBMC의 세포 크기를 확인하여 분류한 후, 약 3,000개 세포에서 OBA의 형광강도를 분석하였다. Rhodamine의 형광은 488 nm에서 excitation 되었고, 525 nm band-pass filter를 통해 FL1 channel에서 측정하였다. OBA는 각 세포들의 형광강도를 평균으로 산출하여 나타내었다.

통계처리

결과는 평균±표준오차로 표현하였고, 통계분석은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

PMN의 OBA에 있어서 1,2-benzopyrone의 효과

1,2-benzopyrone을 직접 PMN에 처리하여 12시간 배양하고 배양 마지막 1시간 전에 latex bead를 첨가하여 OBA의 형광강도를 측정하였다. Latex bead 비첨가 (Fig 1A) 및 첨가 (Fig 1B)군 모두 1,2-benzopyrone의 농도증가에 따른 형광강도의 증가는 나타나지 않았지만, latex bead 첨가군이 비첨가군에 비해 다소 높은 OBA 형광강도를 나타내었다. 다음은 1,2-benzopyrone으로 배양한 PBMC 배양상층액을 PMN에 첨가하여 12시간 배양 후 OBA를 측정하였다. Latex bead 비첨가군 (Fig 2A)은 PBMC 배양상층액의 농도증가와 관계없이 OBA 증가를 보이지 않은 반면, latex

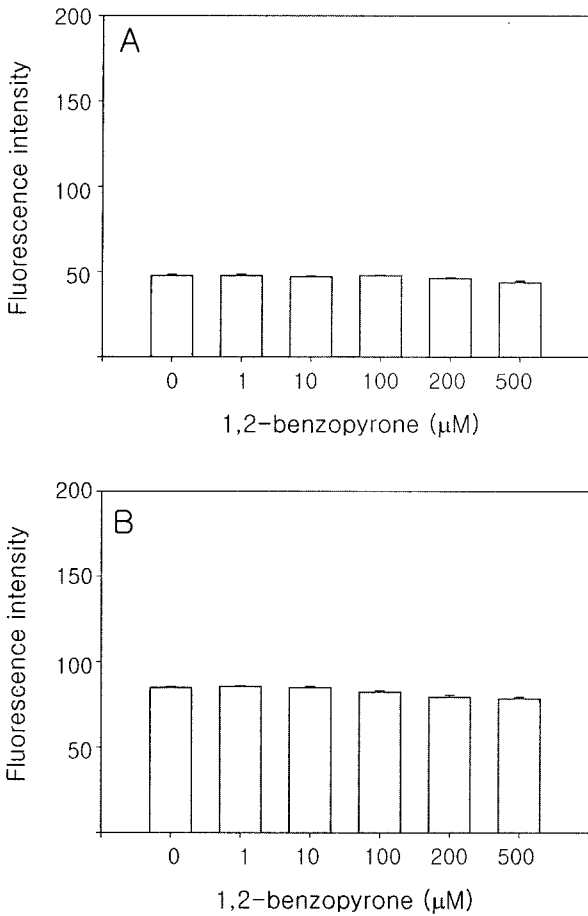


Fig 1. The direct effects of 1,2-benzopyrone on the OBA of PMN. A, PMN without latex beads. B, PMN phagocytized with latex beads. The data represent mean ± SE (n=3).

beads 첨가군 (Fig 2B)의 OBA는 PBMC 배양상층액 무첨가 대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.001$) 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 PBMC 배양상층액의 농도가 25%일 때 가장 높은 OBA 활성을 보였다. 이상의 PMN에서 latex bead를 첨가하지 않은 군에서는 1,2-benzopyrone을 직접 또는 간접 자극을 하더라도 OBA 활성에 변화가 없었으므로 이후의 실험부터는 latex bead 존재 하에서만 OBA를 측정하였다. 또한 1,2-benzopyrone으로 배양한 PMN 배양상층액을 latex bead 첨가군의 PMN과 함께 배양한 후 OBA를 측정한 결과, PMN 배양상층액의 농도 증가에 따른 OBA의 증가는 나타나지 않았다 (Fig 3).

PBMC와 monocyte-rich cell의 OBA에 있어서 1,2-benzopyrone의 효과

PBMC (Fig 4A) 및 monocyte-rich cell (Fig 4B)에서 1,2-benzopyrone의 직접효과를 알아보았다. PBMC와 monocyte-rich cell에서 모두 1,2-benzopyrone의 농도 증가에 따른 형광강도의 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 monocyte-rich cell의 OBA 형광강도는 PBMC의 그것보다

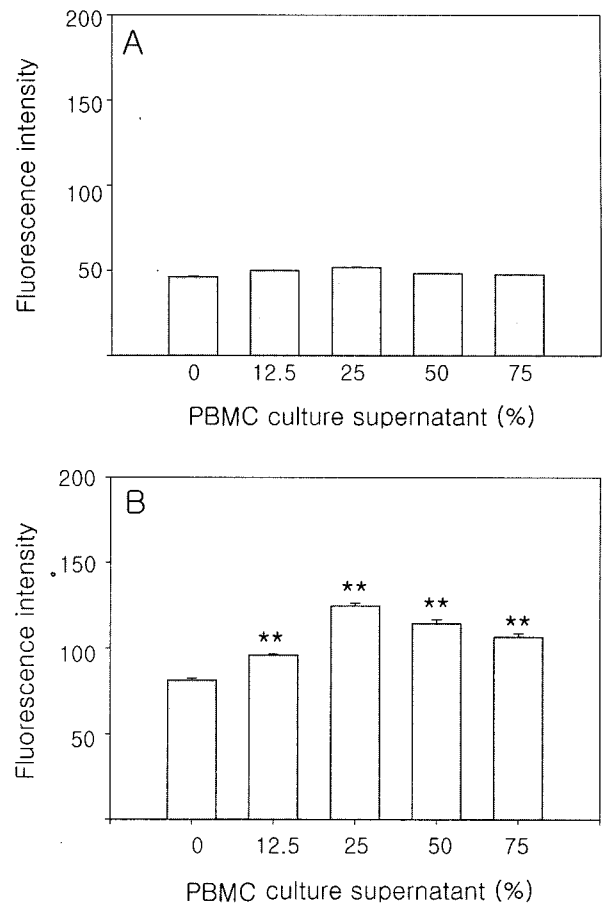


Fig 2. The OBA of PMN by culture supernatant from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. A, PMN without latex beads. B, PMN phagocytized with latex beads. The data represent mean ± SE (n=3). ** $p < 0.01$, compared to control (0%).

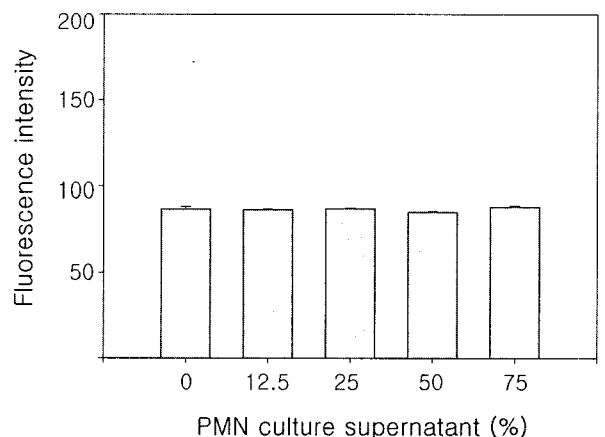


Fig 3. The OBA of latex beads-phagocytized PMN by culture supernatant from PMN treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean ± SE (n=3).

약간 높게 나타났다. 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양상층액 25%를 PBMC (Fig 5A)와 monocyte-rich cell (Fig

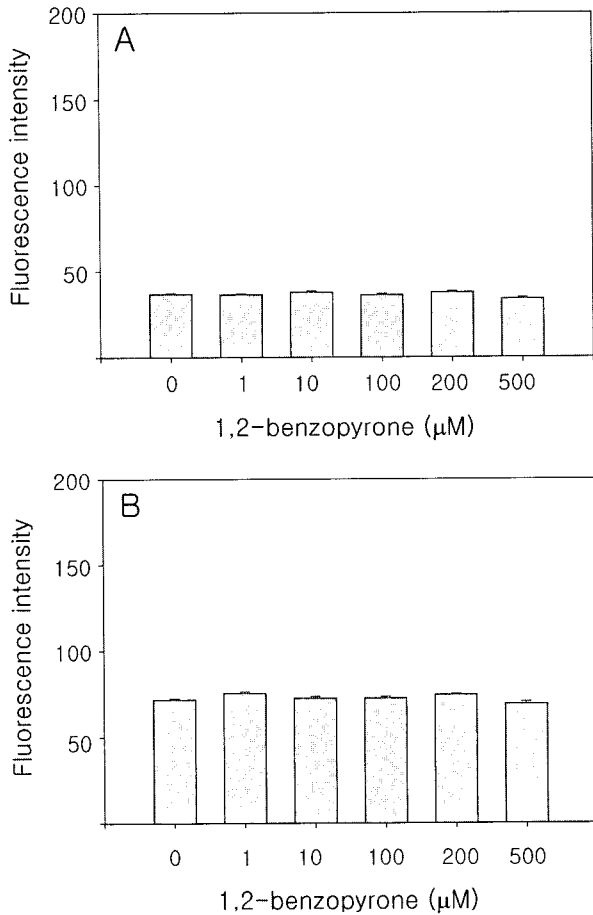


Fig 4. The direct effects of 1,2-benzopyrone on the OBA of latex beads-phagocytized PBMC (A) and monocyte-rich cells (B). The data represent mean±SE (n=3).

5B)에 첨가하여 탐식반응에 따른 OBA 반응에 있어서는 두 군 모두 대조군에 비해 뚜렷한 OBA 증가는 나타내지 않았지만 monocyte-rich cell의 OBA 형광강도가 PBMC의 그것보다 높게 나타났다. 동일한 방법으로 1,2-benzopyrone을 처리한 PMN 배양상층액 (25%)에 대한 PBMC (Fig 6A)와 monocyte-rich cell (Fig 6B)의 OBA 반응을 조사한 결과, PMN 배양상층액 역시 OBA 반응에 큰 영향을 주지 않았다.

PMN의 OBA에 있어서 TNF-α의 효과

PMN의 탐식반응에 따른 OBA에 있어 TNF-α의 효과를 검토하기 위해 PMN에 1,2-benzopyrone 첨가 및 무첨가 PBMC 배양상층액 (25%)과 hr TNF-α (1 ng/ml)를 각각 첨가하고 12시간 배양하여 OBA 활성을 관찰하였다. Latex bead 비첨가군 (Fig 7A)은 hr TNF-α에 반응을 보이지 않았다. 그러나 latex bead 존재 하 (Fig 7B)에서는 대조군에 비해 1,2-benzopyrone 첨가 PBMC 배양상층액 (25%)을 처리한 PMN의 OBA가 명료하게 ($p < 0.001$) 증가하였고, hr TNF-α를 첨가한 세포도 현저하게 ($p < 0.001$) 증가하였다.

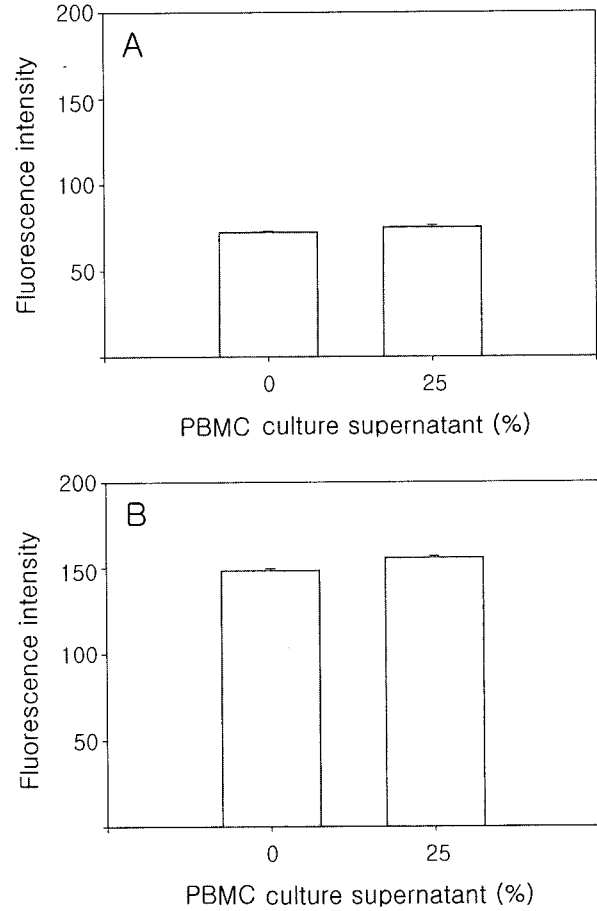


Fig 5. The OBA of latex beads-phagocytized PBMC (A) and monocyte-rich cells (B) by culture supernatant (25%) from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean±SE (n=3).

고찰

OBA를 측정하기 위해서는 특별한 시료를 선택해야 한다. DHR은 flow cytometry를 이용하여 OBA를 측정할 때 가장 민감하고 안정한 laser 염색 시료라고 보고되었다²². 비형광물질인 DHR이 자유로이 세포막을 통과하여 H₂O₂에 특이적으로 반응하면, 형광물질인 rhodamine 123 (RHO)로 산화되어 세포질 내 mitochondria에 축적되기 때문에 녹색의 형광신호는 오직 세포 내에서만 나타나게 된다^{9,14}. Latex bead 비첨가 탐식세포는 탐식물질의 부재로 인해 탐식반응이 일어날 수 없고 그에 따라 OBA에도 전혀 영향을 미치지 않았다. 그러나 DHR은 세포막을 자유로이 통과하기 때문에 탐식이 일어나지 않은 세포의 활성화로도 RHO로 산화되는 반응이 자발적으로 일어난다²³. 따라서 탐식세포는 탐식반응이 일어나지 않을 때, 최소한의 OBA 값을 나타내는 것으로 보인다.

본 연구의 결과에서 PBMC는 탐식반응에 있어 monocyte-rich cell 보다 낮은 OBA치를 보였다. 이것은 PBMC 분획에 탐식작용에 관여하지 않는 림프구가 70% 정도 많이 포

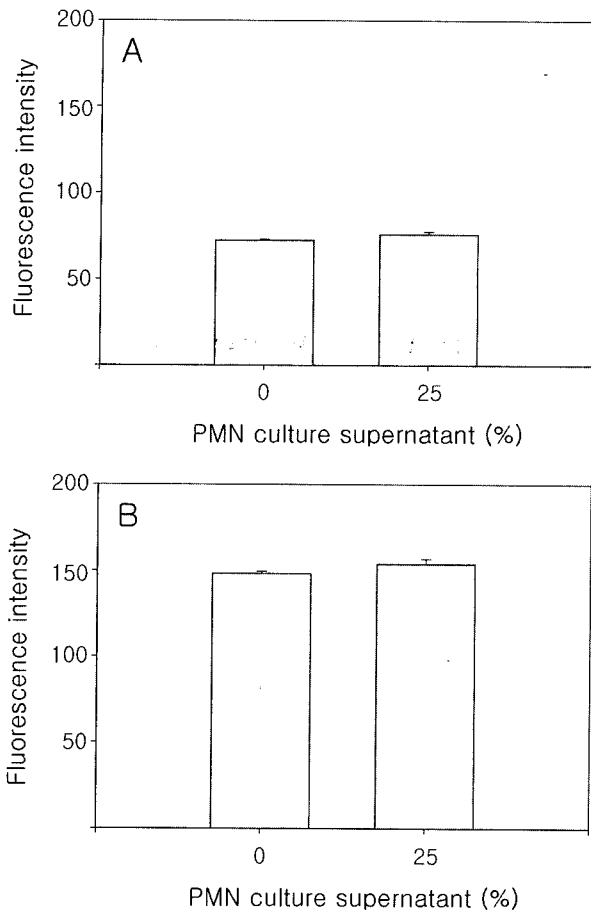


Fig 6. The OBA of latex beads-phagocytized PBMC (A) and monocyte-rich cells (B) by culture supernatant from PMN treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean±SE (n=3).

함되어 있기 때문인 것으로 판단되었다. 1,2-benzopyrone을 PMN (96% 이상 호중구)에 직접 처리했을 때에는 OBA에 전혀 영향을 미치지 못했으며, 또한 1,2-benzopyrone을 처리한 PMN 배양상층액 역시 호중구의 OBA를 변화시키지 않았다. 이것은 1,2-benzopyrone 자체에 호중구의 OBA를 자극시키는 작용이 없는 것으로 보이며 또한 호중구는 OBA에 영향을 주는 인자들을 분비하지 않는 것으로 추측된다. 그러나 1,2-benzopyrone으로 배양한 PBMC 배양상층액은 호중구 탐식반응에 있어 OBA 수준을 현저하게 증가시켰다. 이 결과는 1,2-benzopyrone으로 배양한 PBMC 배양상층액 중에는 호중구의 탐식반응이 일어날 때 OBA를 증가시키는 물질이 존재한다는 것을 의미한다. 또한 본 연구자들의 최근 연구에서 1,2-benzopyrone 처리 PBMC 배양상층액은 말초혈액 호중구와 단구의 탐식반응을 증가시켰다²⁴. 1,2-benzopyrone을 *in vitro*에서 사람의 PBMC에 endotoxin과 함께 처리한 결과, 탐식에 관여하는 인자들인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등이 생성되었다²⁵. 이러한 사실들은 1,2-benzopyrone이 PBMC로부터 가용성 물질을 분비시켜 면역반응을 조절하는 것으로

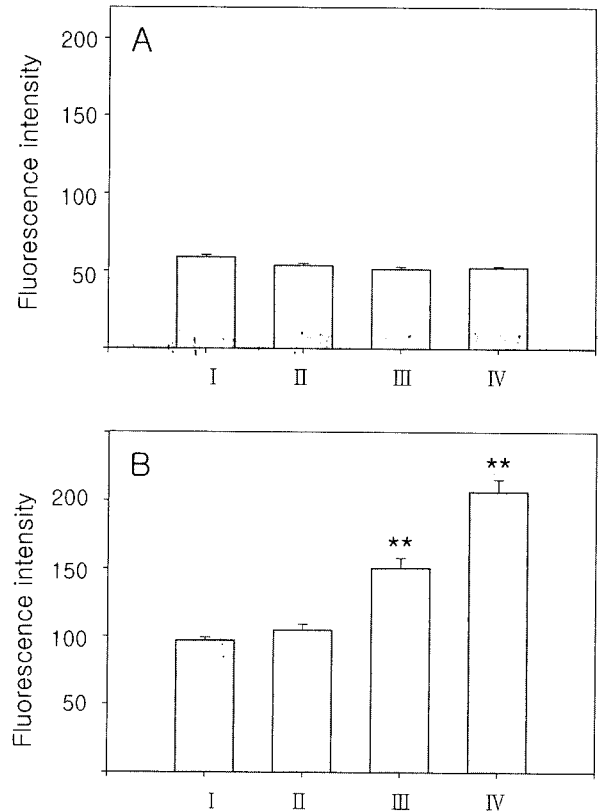


Fig 7. The OBA of PMN by TNF- α (1 ng/ml) and culture supernatant (25%) from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. A, PMN without latex beads. B, PMN phagocytized with latex beads. I: Control cells (medium alone), II: Culture supernatant (25%) from PBMC treated without 1,2-benzopyrone, III: Culture supernatant (25%) from PBMC treated with 1,2-benzopyrone, IV: hr TNF- α (1 ng/ml). The data represent mean±SE(n=3). ***p* < 0.001, compared to control.

사료되었다.

PBMC에서 분비되는 가용성 물질 중에 특히, TNF- α 는 호중구의 OBA에도 영향을 미치는 것으로 보인다. 세균에 존재하는 N-formyl peptide를 사람의 PMN에 첨가하고 여러 가지 물질로 자극시켜 OBA를 측정 한 결과, TNF- α , GM-CSF, IL-8에 의해서 OBA 증강효과를 나타내었다¹³. 그리고 lipopolysacchride (LPS)로 자극시킨 사람의 호중구에서도 역시 TNF- α 에 의해 활성산소종의 생성이 증가하였고¹⁷, pentoxifylline을 PMN에 처리했을 때에도 TNF- α 에 의해 ROS의 생성이 증가하였다¹². 본 연구에서도 hr TNF- α 를 처리하여 호중구의 OBA를 측정하였을 때 OBA 수준이 증가하였다. 이 결과는 TNF- α 가 탐식세포의 탐식능 증강에 작용할 뿐만 아니라 호중구의 OBA의 증가에도 관여한다는 것을 제시하고 있다. 따라서 호중구의 OBA를 증가시킨 1,2-benzopyrone 처리 PBMC 배양상층액에는 TNF- α 또는 이것과 비슷한 작용을 하는 가용성 물질의 존재를 시사하였다.

한편 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양상층액은 단

구의 탐식반응에 따른 OBA를 증가시키지 않았다. 이 현상은 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양상층액에 존재하는 TNF- α 와 같은 가용성 물질은 단구 자신을 포함하는 autocrine 보다는 주로 paracrine 형태로 호중구의 OBA를 증가시킨 것으로 생각되어졌다. 또 하나의 가능성은 호중구와 단구의 살균기전의 형태가 일부 다르다는 점이다. 산소의존성 살균기전인 OBA는 활성산소종과 활성질소종(reactive nitrogen species)을 생성하여 탐식물질을 파괴하는 것으로, 단구보다 호중구에서 더욱 활발하게 이루어지지만 산소 비의존성 살균기전은 산소는 전혀 이용되지 않고, 탐식세포가 hydrolytic enzyme와 lysozyme을 합성하여 탐식물질을 제거한다⁹. 이 외에도, 활성화된 대식세포는 defensins라는 cytotoxic peptide를 생성하여 다양한 종류의 세균에 대해 살균작용을 갖는 것으로 알려져 있다¹⁵.

이상의 연구로부터 1,2-benzopyrone은 호중구의 탐식반응이 일어날 때 OBA를 증가시켜 면역증강효과를 나타내며, 이러한 효과는 1,2-benzopyrone의 자극으로 인해 PBMC에서 분비된 TNF- α 와 같은 액상물질에 의해 매개된다는 사실을 강력하게 시사하였다.

결론

개 말초혈액 탐식세포의 탐식반응에 따른 OBA에 있어 1,2-benzopyrone의 면역증강 효과를 검토하였다. 탐식세포에서 일어나는 OBA 반응을 알아보기 위해 탐식물질로써 latex bead를 사용하였고, 활성산소종의 발생 여부는 DHR을 첨가하여 flow cytometry를 통해 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 1,2-benzopyrone의 직접처리는 PBMC, 호중구, 단구의 OBA에 있어서 탐식여부와 관계없이 증강효과가 나타나지 않았다.

2. Latex bead를 첨가한 호중구의 OBA는 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양 상층액과 hr TNF- α 에 의해 현저하게 증가되었다.

3. 그러나 latex bead를 첨가하지 않은 호중구의 OBA는 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양상층액과 PMN 배양상층액에 의해 증강효과가 나타나지 않았다.

4. 또한 latex bead를 첨가한 PBMC와 단구의 OBA는 1,2-benzopyrone을 처리한 PBMC 배양상층액과 PMN 배양상층액에 의해 어떠한 증강효과도 보이지 않았다.

이상의 결과로부터, 1,2-benzopyrone은 호중구의 탐식반응이 일어날 때에 OBA를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 증강효과는 1,2-benzopyrone의 자극으로 TNF- α 와 같은 PBMC에서 분비되는 가용성 인자에 의해 paracrine 형태로 나타나는 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구

비 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

1. Aggarwal BB, Pocsik E. Cytokines: from clone to clinic. Arch Biochem Biophys 1992; 292: 335-359.
2. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. J Clin Invest 1984; 73: 599-601.
3. Bolton T, Casley-Smith JR. The *in vitro* demonstration of proteolysis by macrophages and its increase by coumarin. Experientia 1975; 31: 271-273.
4. Borregaard N. The respiratory burst of phagocytosis: biochemistry and subcellular localization. Immunol Lett 1985; 11: 165-171.
5. Borzeix MG, Angignard J, Dedieu F, Dupont JM, Miloradovich T, Leutenegger E. Effect of a combination of coumarin derivatives and rutoside on venous and lymphatic circulations during severe constriction of the caudal vena cava in rabbits. Arzneimittelforschung 1995; 45: 262-266.
6. Casimir CM, Teahan CG. The respiratory burst of neutrophils and its deficiency. In: Immunopharmacology of neutrophils. London: Academic Press. 1994: 27-55.
7. Casley-Smith JR, Judith R. High protein oedemas and the benzopyrones. Sydney: Lippincott. 1986: 95-152.
8. Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. Food Chem Toxicol 1979; 17: 277-289.
9. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric Oxide 1997; 1: 145-157.
10. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. J Immunol Methods 1999; 232: 3-14.
11. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Babbolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein/interleukin-8 stimulates the binding activity of the leukocytes adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. J Exp Med 1990; 171: 1155-1162.
12. Duzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Pentoxifylline differentially regulates migration and respiratory burst activity of the neutrophil. Ann N Y Acad Sci 1997; 832: 330-340.
13. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocedalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. Infect Immun 1994; 62: 2195-2201.
14. Emmendoerfer A, Hecht M, Lohmann-Matthes M, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. J Immunol Methods 1990; 131: 269-275.
15. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cells and organs of the immune system. In: Kuby Immunology, 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company. 2000: 42-44.
16. Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen Pharmacol 1996; 27: 713-722.

17. Jersmann HP, Rathjen DA, Ferrante A. Enhancement of lipopolysaccharide -induced neutrophil oxygen radical production by tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1998; 66: 1744-1747.
18. Kang JH, Lee JY, Han SH, Son SM, Na KJ, Mo IP, and Yang MP. A case of malignant lymphedema in a dog. *J Vet Clin* 2002; 19: 450-454.
19. Ottonello L, Dapino P, Amelotti M, Barbera P, Arduino N, Bertolotto M, Dallegri F. Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants. Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. *Inflamm Res* 1998; 47: 345-350.
20. Prosper NB, Jerry GM. Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Drug Deliv* 2001; 51: 71-79.
21. Rossi F, Della Bianca V, de Togni P. Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985; 8: 187-204.
22. Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 440-448.
23. Royal JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 348-355.
24. Sin JH, Na KJ, Yang MP. Immunostimulating effect of 1,2-benzopyrone on phagocytic response of canine peripheral blood phagocytes. *J Vet Clin* 2004; 21: 23-28.
25. Stuhlmeier K, Theyer G, Baumgartner G, Zlabinger GJ. Synergistic effect of coumarin (1,2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 317-323.
26. Trinchieri G. A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-276.
27. Wilkinson PC. Surface and cell membrane activities of leucocyte chemotactic factors. *Nature* 1974; 251: 58-59.
28. Wuyts A, Proost P, Put W, Lenaerts JP, Paemen L, Van Damme J. Leukocyte recruitment by monocyte chemotactic proteins (MCPs) secreted by human phagocytes. *J Immunol Methods* 1994; 174: 251-276.
29. Zhao B, Collins MT, Czuprinsky CJ. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with bovine monocytes. *Infect Immun* 1997; 65: 1761-1766.