

女貞實이 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell의 염증에 미치는 영향

¹상지대학교 한의과대학 한방부인과학교실, ²가천대학교 한의과대학 한방부인과학교실
이용현¹, 임은미²

ABSTRACT

Anti-Inflammatory Effect of *Ligustri Lucidi Fructus* Water Extract in RAW 264.7 Cells Induced by LPS

Yong-Hyun Lee¹, Eun-Mee Lim²

¹Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sang-Ji University

²Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Ga-Chon University

Purpose: This study was carried out to investigate the anti-inflammatory effects of *Ligustri Lucidi Fructus* water extract (LF) in the lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse macrophages RAW 264.7 cell.

Methods: *Ligustri Lucidi Fructus* was extracted with distilled water (2,000 ml) for 2 hours. In order to evaluate cytotoxicity of LF, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed. To investigate anti-inflammatory effects of LF, the concentration of nitric oxide (NO) was measured with NO assay, cytokine was measured by Bio-Plex cytokine assay, and intracellular calcium (Ca) was measured with Fluo-4 Ca assay in RAW 264.7 cell. And when p-value is below 0.05, it is judged to have the significant difference statistically (P<0.05).

Results:

1. LF showed no cytotoxicity.
2. LF inhibited significantly the production of NO at the concentration of 25, 50 and 100 µg/ml.
3. LF inhibited significantly the production of interleukin (IL)-4, macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) at the concentration of 25, 50, 100 and 200 µg/ml.
4. LF inhibited significantly the production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) at the concentration of 50, 100 and 200 µg/ml, the interferon (IFN)-γ at 25, 50 and 100 µg/ml respectively.
5. LF inhibited significantly the production of IL-1β at the concentration of 50 and 200 µg/ml, the IL-5 at 25 and 100 µg/ml, the IL-12p70, MIP-1β at 50 and 100 µg/ml, the regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) at 100 and 200 µg/ml respectively.
6. LF inhibited significantly the production of IL-10, interferon gamma-induced protein (IP)-10 at the concentration of 200 µg/ml.
7. LF inhibited significantly the production of intracellular Ca at the concentration of 25, 50, 100 and 200 µg/ml.

Conclusions: These results suggest that LF has anti-inflammatory effect and immuno-modulating activity.

Key Words: *Ligustri Lucidi Fructus*, NO, Cytokine, Ca, Anti-inflammation

I. 서론

염증은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 선천 면역 계통의 복합적인 반응으로¹⁾ 감염, 외상, 화학적·기계적·방사선 및 열에 의한 손상, 과민반응 등에 의해 발생한다²⁾. 국소 순환계의 순환장애와 혈액 성분의 혈관 외로 삼출 및 조직 증식이 동반되는 일련의 과정으로 나타나게 되며 발적, 종창, 발열, 동통 및 국소 기능장애 등이 나타난다³⁾. 이러한 염증 반응은 조직에 가해진 손상을 회복하기 위한 일련의 과정으로 생명체가 외부 자극에 대한 자기보호를 목적으로 혈관, 신경, 체액 및 세포를 이용하여 손상을 국소화시키고 제거하는 것을 의미한다⁴⁾.

염증 반응에 활성화된 대식세포는 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6) 등 여러 염증매개인자들을 방출한다⁵⁾. 염증매개인자들은 조직 손상의 복구와 보호에 필요한 것이기도 하지만^{6,7)}, 과량 생산되면 정상조직에도 과도한 면역 반응과 염증 반응을 일으키게 된다^{8,9)}.

여정실(女貞實; *Ligustri Lucidi Fructus*; *Ligustrum lucidum* Aiton 또는 동속식물의 성숙한 果實)은 몰푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 상록 소교목인 당광나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 苦, 甘, 涼, 無毒하고 肝·腎 二經에 작용한다. 그리고 補肝益腎, 淸熱明目 등의 효능을 지니고 있어 頭暈, 耳鳴, 明暗不明, 腰膝痠軟, 鬚髮早白, 骨蒸勞熱 등의 병증을 치료한다¹⁰⁾.

女貞實에 관한 실험으로는 이 등¹¹⁾은 여정자가 NO, TNF- α 의 생성을 증가함

으로써 대식세포의 탐식기능을 촉진시킴을 밝혔고, 송¹²⁾은 여정자가 활성화된 대식세포로부터 NO, TNF- α , IL-6의 생성을 억제하고 IL-12의 생성을 증가함으로써 염증성 세포활성물질들의 생성을 억제시킴을 밝혔으며, 전¹³⁾은 여정자가 NO, PGE2, nitric oxide synthases(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 있음을 밝혔고 나¹⁴⁾는 여정자가 Hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의한 NO, iNOS, COX-2의 생성을 억제하여 염증 반응에 대한 억제 효능이 있음을 밝혀 항염 작용에 대한 선행연구가 진행된 바 있다. 하지만 현재까지 女貞實에 관한 여러 연구가 있지만 다양한 염증매개인자들에 대한 연구는 미비한 실정이다.

이에 저자는 女貞實의 滋陰, 補肝益腎하는 扶正의 효능이 면역기능을 증강시킴으로서 염증을 대하여도 효능이 있을 것으로 사료되어 다양한 염증매개인자들에 대한 연구를 위해 女貞實을 열수추출하여 제조한 LF를 대상으로 RAW 264.7 cell의 cell viability와 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell의 NO 생성, IL과 chemokine 및 growth factor 등의 cytokines 생성, 세포내 Ca 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용된 女貞實은 한국 대구의 움니허브 주식회사로부터 2012년 6월에 구입(NO: 2012-0602)하였으며, 모든 약

재는 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 사용하였다.

2) Cell lines

실험에 사용된 세포는 mouse macrophage RAW 264.7 cell line으로 한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

본 실험을 위해서 FBS(Sigma, USA), ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), methyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), 1×PBS(Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), MTT assay kit(Sigma, USA), Fluo-4 Ca assay kit(Molecular Probes, USA), NO assay kit(Sigma, USA), Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge(Hanil, Korea), CO₂ incubator(NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(O-mni, USA), research microscope(Olympus, Japan), fume hood(Hanil, Korea), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA), deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), microplate reader(Bio-Rad, USA), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(In-Tron biotech., Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), spectrofluorometer(Dynex, UK) 등이다.

2. 방 법

1) 시료의 제조

女貞實 30 g을 정확하게 중량을 측정 한 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기로 건조하여 얻은 분말을 LF로 사용하였다. 동결건조 분말은 2.60 g을 얻었으며, 수율은 8.67%였다.

2) 세포 배양

RAW 264.7 cell은 37°C, 5% carbon dioxide(CO₂) 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/ml, streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. 세포들은 75 cm² flask에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 50 ml의 배양 용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포생존을 검사

세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 264.7 cell에 MTT assay를 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10⁵ cells/well이 되게 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양 세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 다양

한 농도의 LF를 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 mg/ml MTT를 100 μ l씩 각 well에 처리하여 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μ l 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정, 세포 생존율을 비교하였다.

4) NO 생성 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 Nitrogen dioxide(NO_2), Nitrite, Nitrate로 변한다. 그리스 시약(griess reagent: 0.5%의 sulfanilamide, 2.5%의 phosphoric acid 및 0.5%의 naphthylethyleneamine)은 MINO_2 와 화학 반응하여 보라색의 azo-dye를 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, azo-dye의 농도로부터 Nitrite의 농도를 측정하기 위해 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS 1 μ g/ml를 단독 혹은 다양한 농도의 LF와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 100 μ l를 채취하여 여기에 그리스 시약 100 μ l을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정, NO 생성을 비교하였다.

5) Cytokines 생성 측정

면역단백질 분비와 관련된 LF의 영향을 알아보기 위해 Politch 등^{15,16)}을 참조하여 실험하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10^5 cells/well이 되게 분

주하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 $1 \times \text{PBS}$ 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 μ g/ml를 단독 혹은 다양한 농도의 LF와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을 채취하여 96 well filter plate에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시켰다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 μ l의 wash buffer로 세척하였다. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 streptavidin-phycoerythrin을 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30분간 진동배양한다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3회 세척한 뒤 각 well에 120 μ l의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5분간 진동배양한 후 Bio-Plex array reader를 이용, 측정하고자 하는 cytokine의 양을 조사, 비교하였다.

6) 세포내 Ca 측정

RAW 264.7의 세포내 Ca 방출에 미치는 LF의 영향을 알아보기 위하여 Fluo-4 Ca assay를 실시하였다. 96 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10^5 cells/well이 되게 분주하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 배양세포 표면을 $1 \times \text{PBS}$ 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 μ g/ml를 단독 혹은 다양한 농도의 LF와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well의 배지를 제거하고 100 ml의 Fluo-4 dye solution을 각 well에 처리한

후, 30분 동안 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 배양, 상온에서 30분 동안 추가 배양 하였다. 배양이 끝난 후, spectrofluorometer (485 nm excitation filter; 535 nm emission filter)를 이용하여 각 well의 형광강도를 측정, 비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test와 ANOVA test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포생존율의 변화

LF가 RAW 264.7 cell의 세포생존율에 미치는 영향을 측정한 결과 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

2. LPS로 유발된 NO 생성의 변화

LF는 NO 생성을 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

3. LPS로 유발된 cytokine 생성의 변화

1) IL-4

LF는 IL-4 생성을 25 µg/ml 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

2) MIP-1α

LF는 MIP-1α 생성을 25 µg/ml 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 4).

3) G-CSF

LF는 G-CSF 생성을 25 µg/ml 이상의 모

든 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

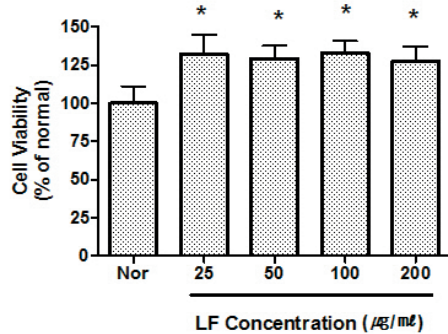


Fig. 1. Effect of LF on Cell Viability in RAW 264.7 Cell.

LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract
 Nor : Normal. Treated with media only.
 Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.
 Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.01 compared to the normal.

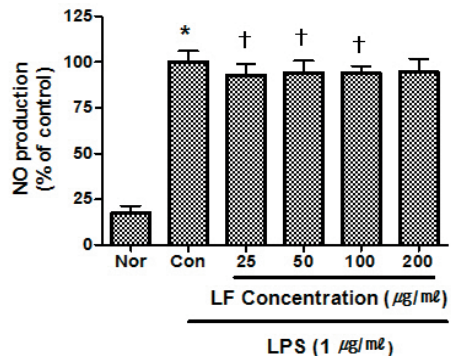


Fig. 2. Effect of LF on NO Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract
 Nor : Normal. Treated with media only.
 Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only.
 LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.

† : represents P<0.05 compared to the control.

‡ : represents P<0.01 compared to the control.

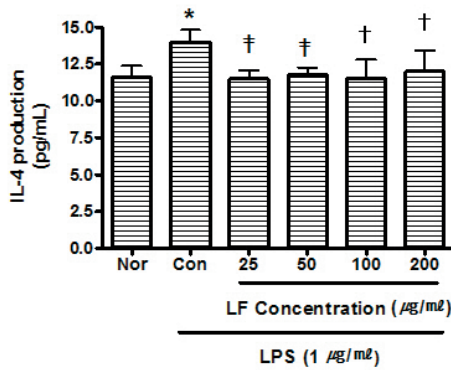


Fig. 3. Effect of LF on IL-4 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

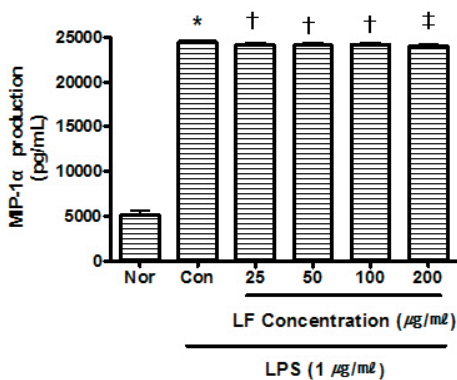


Fig. 4. Effect of LF on MIP-1α Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

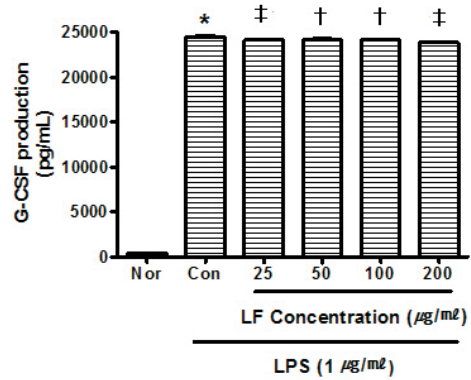


Fig. 5. Effect of LF on G-CSF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

4) GM-CSF

LF는 GM-CSF 생성을 50 µg/ml 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제하였다 (Fig. 6).

5) VEGF

LF는 VEGF 생성을 50 µg/ml 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 7).

6) IFN-γ

LF는 IFN-γ 생성을 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 8).

7) IL-1β

LF는 IL-1β 생성을 50, 200 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 9).

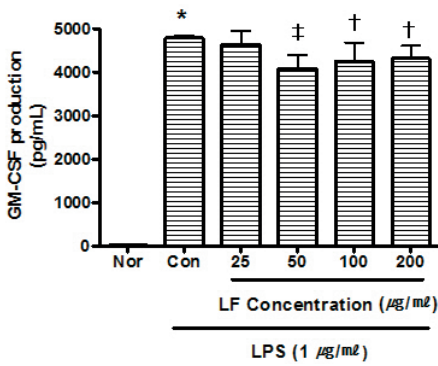


Fig. 6. Effect of LF on GM-CSF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

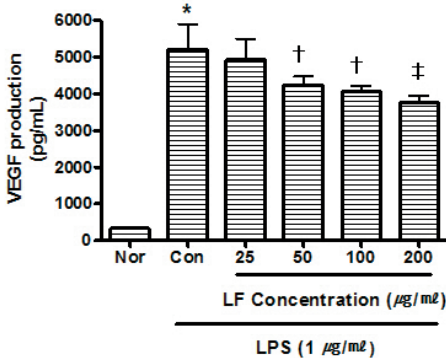


Fig. 7. Effect of LF on VEGF Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

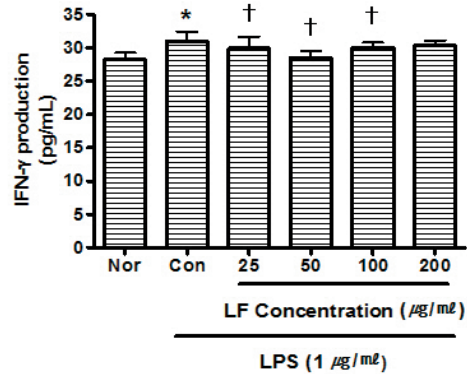


Fig. 8. Effect of LF on IFN-γ Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

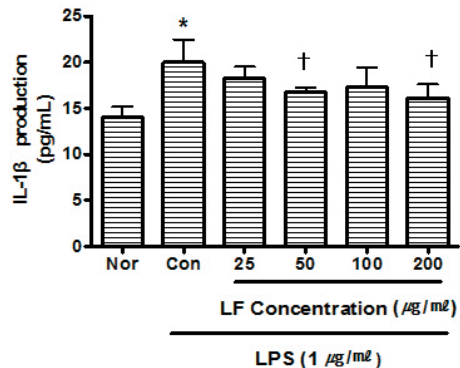


Fig. 9. Effect of LF on IL-1β Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

8) IL-5

LF는 IL-5 생성을 25, 100 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 10).

9) IL-12p70

LF는 IL-12p70 생성을 50, 200 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 11).

10) MIP-1β

LF는 MIP-1β 생성을 50, 100 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 12).

11) RANTES

LF는 RANTES 생성을 100, 200 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 13).

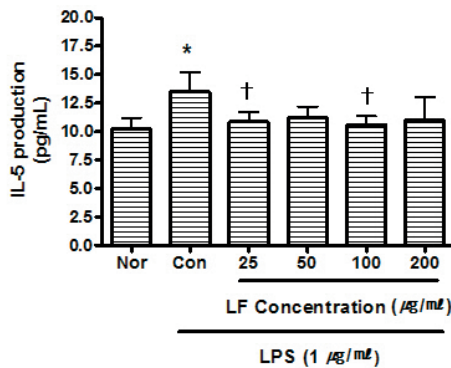


Fig. 10. Effect of LF on IL-5 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

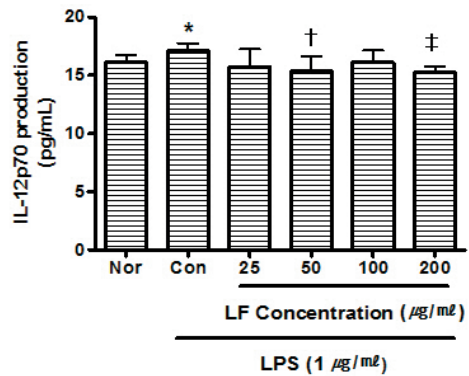


Fig. 11. Effect of LF on IL-12p70 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

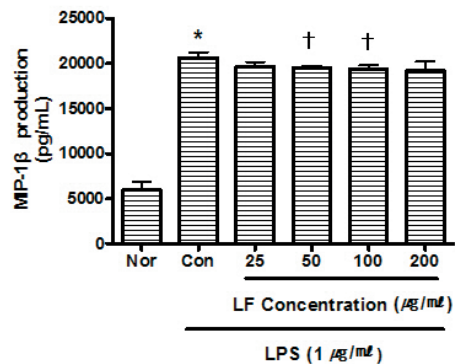


Fig. 12. Effect of LF on MIP-1β Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract Nor : Normal. Treated with media only. Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
 † : represents P<0.05 compared to the control.
 ‡ : represents P<0.01 compared to the control.

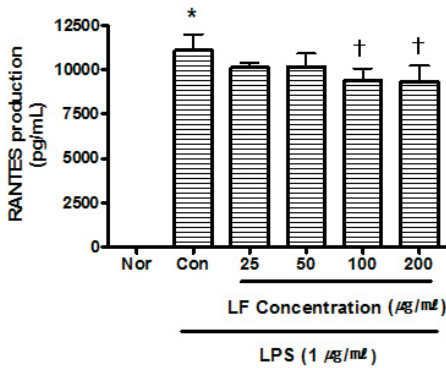


Fig. 13. Effect of LF on RANTES Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract
Nor : Normal. Treated with media only.
Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
† : represents P<0.05 compared to the control.
‡ : represents P<0.01 compared to the control.

12) IL-10

LF는 IL-10 생성을 200 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 14).

13) IP-10

LF는 IP-10 생성을 200 µg/ml의 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 15).

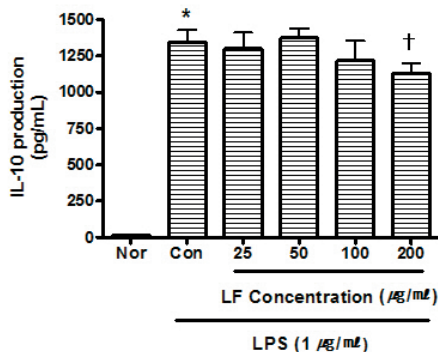


Fig. 14. Effect of LF on IL-10 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract

Nor : Normal. Treated with media only.
Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
† : represents P<0.05 compared to the control.

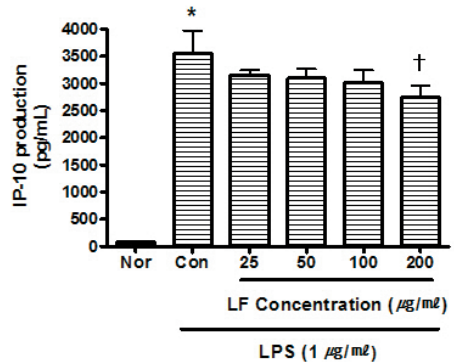


Fig. 15. Effect of LF on IP-10 Production of RAW 264.7 Cell Treated with LPS. LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract

Nor : Normal. Treated with media only.
Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only. LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.
† : represents P<0.05 compared to the control.

4. LPS로 유발된 세포내 Ca 생성의 변화

LF는 세포내 Ca 생성을 25 µg/ml 이상의 모든 농도에서 유의하게 억제하였다(Fig. 16).

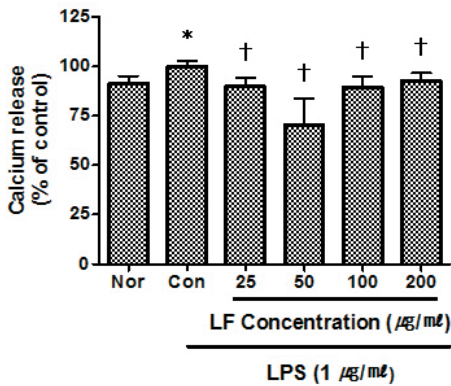


Fig. 16. Effect of LF on Ca Release of RAW 264.7 Cell Treated with LPS.

LF : *Ligustri Lucidi Fructus* water extract
 Nor : Normal. Treated with media only.
 Con : Control. Treated with LPS (1 µg/ml) only.
 LPS-induced Cells were incubated with LF at the concentration of 25, 50, 100, 200 µg/ml for 24 hrs.

Results are represented as mean±SD of three independent experiments.

* : represents P<0.05 compared to the normal.

† : represents P<0.01 compared to the control.

IV. 고찰

염증은 조직이 손상되거나 세균의 감염으로 인하여 발생하는 것으로 생체조직이 생물학적, 물리적, 화학적, 면역학적인 원인에 의하여 손상을 받았을 때 이 손상을 국소화시키고 손상된 부위를 정상상태로 되돌리려는 면역과정의 일부 분이다. 손상부위의 혈관, 신경, 세포, 체액 등에서 나타나는 염증반응은 살아있는 조직, 즉 혈관이 있는 조직에서만 일어나는 특징이 있다. 즉 염증은 미세혈관계를 통하여 나타나는 생체의 방어기전이다²⁾.

염증 반응시 면역세포인 대식세포는 동물체내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적인 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나

세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용을 하는 고전적인 기능과 함께 다양한 염증매개인자들을 분비하여 초기 염증반응에서 핵심적인 역할을 한다¹⁷⁾.

대식세포는 IL-1β나 TNF-α와 같은 cytokines 또는 NO나 PG 등의 다른 염증매개인자들을 생산함으로써 반응진행 과정에서 중요한 역할을 수행한다¹⁸⁻²¹⁾. 대식세포에 의한 이런 매개인자들의 생산은 많은 염증성 조직에서 발견되며, 염증매개인자들의 과생산은 염증성 질환의 병리현상에 대한 주요인이 된다^{22,23)}.

따라서 염증매개인자들은 염증, 통증 조절, 세포사멸, 종양생성, 자가면역반응 등의 약리학적 또는 생리학적 생체반응에서 중요한 역할을 수행하므로 이러한 염증매개인자들에 대한 유전자 발현의 저해방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료방법이 될 수 있다^{24,25)}.

염증성 질환에서는 증상을 호전시키고 과도한 염증반응에 의한 조직손상을 억제하기 위한 목적으로 항염제 사용이 필요하게 된다. 현재 사용되는 가장 강력한 항염제 중 하나인 스테로이드는 신속한 염증 억제를 기대할 수 있으나 감염, 골다공증, 혈압상승, 쿠싱증후군 등의 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾. 또한 가장 널리 사용되고 있는 항염제 중 하나인 NSAIDs는 위장관 합병증 빈도가 높고²⁷⁾ 이를 극복하기 위해 개발된 COX-2 선택적 길항제도 혈전증의 위험이 있는 환자의 경우 뇌졸중, 심근경색증 등 심혈관계 부작용을 초래할 수 있음이 밝혀지면서²⁸⁾ 기존의 항염제가 지닌 부작용을 극복하고 장기적으로 안전

하게 사용할 수 있는 항염 약물의 개발이 요구된다.

한의학에서는 《素問》〈上古天真論〉²⁹⁾에서 “眞氣從之 精神內守 病安從來”, 〈刺法論〉²⁹⁾에서 “正氣存內 邪不可干”, 〈評熱病論〉²⁹⁾에서 “邪之所湊 其氣必虛”, 《靈樞》〈百丙始生篇〉³⁰⁾에서 “風雨寒熱 不得虛邪 不能獨傷人”이라 하여, 질병의 발생과 진행의 원리를 인체의 正氣와 발병인자인 邪氣의 상호투쟁 및 消長進退에 의한 것으로 보았는데, 이러한 正邪의 개념은 면역학 이론과 유사한 개념으로 볼 수 있다³¹⁾. 正氣를 외부의 邪氣에 대항하는 면역기능과 관련된 개념으로 보고 正氣不足을 면역기능저하와 관련지어 그 중요성을 설명하였는데, 補氣血하고 인체의 陰陽과 臟腑의 기능실조를 조정함으로써 扶正하는 것이 질병에 대한 저항력을 증강시켜 질병발생과 치료에 중요한 요소임을 강조하였다³²⁾.

女貞實은 《神農本草經》³³⁾에 “女貞實 味苦平 主補中 安五臟 養精神 除百疾 久服肥健 輕身不老 生山谷”이라고 처음으로 수록된 한약재이며, 性味が 甘苦하고 涼하여 肝腎을 淸補하는 良品으로 肝腎의 陰을 滋養하고 鬚髮을 검게 하며 明目하는 효능이 있어 肝腎陰虛病證, 陰虛內熱病證, 陰虛視力減退를 主治한다¹⁰⁾.

女貞實의 성분으로는 oleanolic acid, nuzhenide, butulin, salidroside, palmitic acid, acetyloleanolic acid, uruson, glucose, mannitol, 지방유 등을 함유한다¹⁰⁾. 그 중 oleanolic acid는 強心, 利尿 작용이 있고 mannitol은 緩下 작용이 있으며 다량의 glucose는 強壯 작용과 관계가 있는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

따라서 여정실의 補肝益腎하는 효능이

일차적으로 면역기능저하를 회복하게 할 뿐만 아니라 항염 작용에 대한 여러 연구¹¹⁻¹⁴⁾를 통해 이차적으로 염증 질환에 활용될 수 있음을 시사한다.

이에 본 연구에서는 염증 기전에 대하여 세밀하게 알아보기 위해 기존 연구들 보다는 다양한 염증매개인자들을 보기도 하여 女貞實의 물추출물인 LF를 대상으로 cell viability와 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell의 NO 생성, IL-4, MIP-1a, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , VEGF, IL-1 β , IL-5, IL-12p70, MIP-1 β , RANTES, IL-10, IP-10 등의 다양한 Cytokines 생성, 세포내 증가된 Ca 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

LF의 세포독성여부를 판단하기 위해 세포생존율을 측정한 결과 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 정상군에 비해 증가하여 LF가 세포독성이 없다는 것을 알 수 있었다.

NO는 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포 및 심근세포 등 여러 세포에서 LPS, IFN- γ , IL-1 및 TNF- α 등의 자극에 의해 생성되어 혈관투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개인자의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는데³⁵⁾, LF를 처리한 결과 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제하였다.

다양한 Cytokines는 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70의 interleukins와 MIP-1a, MIP-1 β , RANTES, IP-10의 chemokines와 G-CSF, GM-CSF, VEGF의 성장인자들 및 IFN- γ 의 interferon으로 나누어서 볼 수 있다.

IL-1 β 는 림프구와 대식세포를 활성화하고 호중구의 내피세포 접착을 향진시키

며 급성기 단백질 합성과 분비를 유도하며 발열과도 연관성이 있으며 chemokines를 유도함에 따라 염증 부위에 호산구, 단핵구 혹은 림프구를 유주시켜 염증을 유발하는 작용이 있는데³⁶⁾, LF를 처리한 결과 50, 200 µg/ml의 농도에서 IL-1β 생성을 유의하게 억제하였다.

IL-4는 Th2 cell의 분화, IgE 생산, 호산구 모집에 영향을 미치는 Th2 cytokine으로 IL-4의 발현은 항원 침입의 증가와 함께 방어막에 결함을 초래한다³⁷⁾. LF를 처리한 결과 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 IL-4 생성을 유의하게 억제하였다.

IL-5는 대식세포와 T 림프구의 활성화로 인해 분비되며 B 림프구와 호산구의 분화 및 성장에 관여하고 호산구 생성과 성숙, 활성화의 중요 조절인자로 작용하는데³⁸⁾, LF를 처리한 결과 25, 100 µg/ml의 농도에서 LPS에 의한 IL-5 생성을 유의하게 억제하였다.

IL-10은 단핵구, 비만세포, 대식세포, Th cell 및 B cell 등에 의해 분비되어 IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α, GM-CSF 등의 생성을 억제하는 반면에 B cell, 비만세포 및 일부 T cell의 생성과 활성화에 관여하여 면역활성을 저지하는데³⁹⁾, LF를 처리한 결과 200 µg/ml의 농도에서 IL-10 생성을 유의하게 억제하였다.

IL-12는 수지상세포와 대식세포 및 B cell 등에서 분비되어 T cell과 B cell을 활성화시켜 IFN-γ와 NK cell의 활동성을 증가시키고 그 중 IL-12p40은 면역반응에 있어서 더욱 중요한데⁴⁰⁾, LF를 처리한 결과 50, 200 µg/ml의 농도에서 IL-12p70 생성을 유의하게 억제하였다.

MIP-1α와 MIP-1β는 CC Chemokine

으로 많은 세포 특히 대식세포, 수지상세포와 림프구에 의해 분비되어 급성 호중구 염증으로 이어질 수 있는 과립구를 활성화시키고 섬유아세포와 대식세포에서 IL-1, IL-6, TNF-α 등의 염증성 cytokines의 합성 및 방출을 유도하여 면역반응에 있어서 아주 중요한데⁴¹⁻⁴³⁾, LF를 처리한 결과 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 MIP-1α 생성을 유의하게 억제하였으며 50, 100 µg/ml의 농도에서 MIP-1β 생성을 유의하게 억제하였다.

RANTES는 CC Chemokine으로 T cell, 호산구, 호염구에 화학주성을 가지고 염증 분위에서 백혈구를 모으는데 적극적인 역할을 하며 IL-2, IFN-γ와 같은 특정 cytokines의 도움으로 T cell에서 분비되어 CHAK cell을 형성하기 위해 특정 NK cell의 증식과 활성화를 유도하는데⁴⁴⁾, LF를 처리한 결과 100, 200 µg/ml의 농도에서 RANTES 생성을 유의하게 억제하였다.

IP-10은 CXC Chemokine으로 IFN-γ에 반응하여 단핵구, 내피세포, 섬유아세포에서 분비되어 다양한 염증세포를 염증 부위로 불러들일 뿐 아니라 Th1 림프구, NK cell, 대식세포와 같은 백혈구에서 CXCR3 receptor에 연결시키는 기능을 하는데⁴⁵⁻⁴⁷⁾, LF를 처리한 결과 200 µg/ml의 농도에서 IP-10 생성을 유의하게 억제하였다.

G-CSF는 대식세포, 내피세포, 섬유아세포에서 분비되어 주로 과립구의 생성, 생존, 분화 및 염증을 조절하는 것으로 알려져 있고 G-CSF 수용체를 통하여 과립구에 국한하지 않고 단핵구, 림프구 및 내피세포 등에서 발현이 보고되고 있으며 전염증성 cytokines의 생성을 감소

시킴으로써 항염증 반응을 나타내는데⁴⁸⁻⁵¹), LF를 처리한 결과 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 G-CSF 생성을 유의하게 억제하였다.

GM-CSF는 대식세포, T cell, 비만세포, NK cell, 내피세포, 섬유아세포에서 분비되어 과립구의 성장과 감염부위에서 대식세포가 군집화 되도록 자극하는데⁵²), LF를 처리한 결과 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 GM-CSF 생성을 유의하게 억제하였다.

VEGF는 맥관형성과 혈관투과성을 조절하는 물질로서 초기 염증 반응 및 병리적 맥관형성, 종양성장 등에 관여하는데⁵³), LF를 처리한 결과 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 VEGF 생성을 유의하게 억제하였다.

IFN- γ 는 T cell과 NK cell에서 분비되어 MHC 항원발현, 대식세포 활성화, NK 세포활성화, IgG isotype의 조절, 항바이러스활성, NOS 유도 등에 관여하는데⁵⁴), LF를 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 IFN- γ 생성을 유의하게 억제하였다.

Ca는 Toll-like receptor 신호전달체계의 활성화로 대식세포 내 Ca 생성이 증가되어 다양한 염증매개인자들의 생성증가로 이어지는데⁵⁵), LF를 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 모든 농도에서 세포내 Ca 생성을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과, LF는 세포독성을 나타내지 않았고 NO를 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 억제하였고 Ca를 모든 농도에서 억제함으로써 세포내의 항염반응의 증진과 면역반응의 안정을 도모하는 효과⁵⁶)가 있을 것으로 생각된다.

또한 LF는 IL-4, MIP-1 α , G-CSF를 모든 농도에서 유의하게 억제시켰고 IL-1 β ,

IL-5, IL-10, IL-12p70, MIP-1 β , RANTES, IP-10, GM-CSF, VEGF, IFN- γ 를 일정 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이로써 女貞實의 補肝益腎하는 효능이 면역기능의 향상을 통한 염증매개인자들의 억제효과를 가져오리라 예상을 하였으나 면역기능의 향상에 대한 결과는 유의하지 않았으며 염증매개인자들의 억제효과는 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

V. 결 론

女貞實을 열수추출하여 얻은 LF를 대상으로 RAW 264.7 cell의 세포생존율과 LPS로 유발된 RAW 264.7 cell의 NO 생성, 그리고 IL-4, MIP-1 α , G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , VEGF, IL-1 β , IL-5, IL-12p70, MIP-1 β , RANTES, IL-10, IP-10 등의 다양한 cytokines의 생성, 세포내 Ca 생성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LF는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. LF는 NO의 생성을 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 유의하게 억제시켰다.
3. LF는 IL-4, MIP-1 α , G-CSF의 생성을 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.
4. LF는 GM-CSF, VEGF의 생성을 50, 100, 200 µg/ml 농도에서, IFN- γ 는 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 유의하게 억제시켰다.
5. LF는 IL-1 β 의 생성을 50, 200 µg/ml 농도에서, IL-5는 25, 100 µg/ml 농도에서, IL-12p70, MIP-1 β 는 50, 100 µg/ml 농도에서, RANTES는 100, 200 µg/ml 농도에서 유의하게 억제시켰다.
6. LF는 IL-10, IP-10의 생성을 200 µg/ml

농도에서 유의하게 억제시켰다.

7. LF는 세포내 Ca의 생성을 모든 농도에서 유의하게 억제시켰다.

이상의 결과, 女貞實이 RAW 264.7 cell의 염증매개인자 생성을 억제함으로써 과잉염증반응을 조절할 수 있는 항염 효과가 있음을 의미한다.

□ 투 고 일 : 2013년 10월 21일

□ 심 사 일 : 2013년 10월 29일

□ 게재확정일 : 2013년 11월 8일

참고문헌

1. 김각균. 최신 면역학. 입문 2판. 서울: 범문사. 2005:1-39, 263-89.
2. 대한병리학회. 병리학. 5판. 서울:고문사. 2003:67-94.
3. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심 병리학. 서울:고려의학. 1998:63-4.
4. 고려대학교 의과대학 병리학교실. 병리학. 서울:신광출판사. 2001:28-31.
5. Wu MJ, et al. Glossogyne tenuifolia acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF-κB. J Biomed Sci. 2004;11(2):186-99.
6. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol. 1998; 16(5-6):457 - 99.
7. Nathan C. Natural resistance and nitric oxide. Cell. 1995;82(6):873-6.
8. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. J Leukoc Biol. 1998;64(1):25-32.
9. Glauser MP. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. Drugs. 1996;52(2):9-17.
10. 서부일 등. 본초학. 서울:영림사. 2012: 937-9.
11. 이광석 등. 여정자가 대식세포 탐식능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1996;17(2):227-36.
12. 송제문. 활성화된 대식세포로부터 일산화질소 및 염증성 세포활성물질들의 생성에 대한 여정자의 효과. 원광대학교 대학원 석사학위논문. 2003.
13. 전춘산. 二至丸과 그 구성약재의 항산화 및 항염증 효과. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 2009.
14. 나유진. H₂O₂에 노출된 LLC-PK1 세포에서 redox status 및 NF-κB signaling에 미치는 여정자의 효과. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 2009.
15. Politch JA, et al. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod. 2007;22(11):2928-35.
16. Lee KS, et al. Bioplex analysis of plasma cytokines in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Immunol Lett. 2008;121(2):105-9.
17. Guo LY, et al. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of schisandra chinensis baill. Eur J Pharmacol. 2008;591(1-3):293-9.
18. Bosca L, et al. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and

- fate. *Toxicology*. 2005;208(2):249-58.
19. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6(12):3051-64.
 20. Wei W, et al. *Anti-inflammatory and immunopharmacology*. 1st ed. Beijing: Renmin weisheng chubanshe. 2004:10-7.
 21. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002;53:35-57.
 22. Tilg H, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103(1):264-74.
 23. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
 24. Kim KM, et al. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF-kappaB activation. *Toxicol Appl pharmacol*. 2003;190(1):1-8.
 25. 염미정 등. RAW 264.7 면역세포에서 염증유발인자의 유전자 발현에 대한 연옥수와 연옥분의 억제효과. *동의생리병리학회지*. 2004;18(6):1622-7.
 26. Greenstein B, Wood D. *The endocrine system at a glance*. 2nd ed. Maiden: Blackwell publishing Ltd. 2008:98-101.
 27. Lefkowitz JB. Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications. *American Journal of Medicine*. 1999;106(5):43-50.
 28. Solomon SD. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(6):613-7.
 29. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원출판사. 1985:38, 55, 78, 86-8, 104, 107, 110, 116-24, 213, 233, 247, 256, 273.
 30. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 서울:동양의학연구원출판사. 1981:317, 347.
 31. 채우석. 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. *대한한의학회지*. 1990;11(2):54-8.
 32. 조종관. 면역에 관한 동양의학적 고찰. *동양의학*. 1986;12(1):19-23.
 33. 吳普述著, 孫星衍 孫馮翼 輯錄. 神農本草經. 北京:人民衛生出版社. 1982:43.
 34. 송석복, 안덕균. 여성질류의 효능에 관한 비교연구. *본초분류학회지*. 1991;6(1):13-9.
 35. McCann SM, et al. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1057:64-84.
 36. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 6th ed. London: Mosby. 2001:119, 128, 441.
 37. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol*. 2011;2(3):110-24.
 38. van Driel WJ, et al. Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. *Gynecol Oncol*. 1999;74(2):188-95.
 39. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Immunology*. 5th ed. New York: WH Freeman and Company. 2005:281.
 40. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-46.
 41. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem*

- Cell Biol. 2004;36(10):1882-6.
42. Irving SG, et al. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(11):3261-70.
 43. Ren M, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine(CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 2010;29(23):3952-66.
 44. Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(2):315-9.
 45. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature.* 1985;315(6021):672-6.
 46. Agostini C, et al. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J immunol.* 1998;161(11):6413-20.
 47. Agostini C, et al. CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8+/CXCR3+ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4):1466-73.
 48. Richards MK, et al. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 2003;102(10):3562-8.
 49. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(5):509-54.
 50. Zhu QS, et al. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood.* 2006;107(5):1847-56.
 51. Morikawa K, et al. Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *Br J Haematol.* 2002;118(1):296-304.
 52. Geijsen N, Koenderman L, Coffey PJ. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):19-25.
 53. Tischer E, et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(3):1198-206.
 54. Mire-Sluis AR, Thrope R. *Cytokines.* San Diego:Academic Press. 1998:19-400.
 55. Martin L, et al. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(1):71-8.
 56. Fehsel K, et al. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol.* 1995;155(6):2858-65.