

계란백유래물질로 배양한 고양이 말초혈액 단핵구세포 배양상층액중의 탐식촉진인자 검출

양만표¹ · 김기홍
충북대학교 수의과대학

Detection of Phagocytosis-Promoting Factor of Culture Supernatant from Feline Peripheral Blood Mononuclear Cells Cultured with Egg White Derivatives

Mhan-pyo Yang¹ and Ki-hong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT : The aim of this study is to determine the phagocytosis-promoting factor(s) for feline peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) by culture supernatant from mononuclear cells (MNC) treated with egg white derivatives (EWD). The phagocytic activity of PMN was analyzed by a flow cytometry system. The EWD did not show direct effect on the phagocytic response of PMN. The phagocytic activity of PMN was enhanced by culture supernatant from MNC but not PMN treated with EWD. Therefore, it was suggested that the enhanced phagocytic activity of feline PMN could be mediated by humoral factor(s) released from MNC treated with EWD. Thus, the phagocytosis-promoting factor(s) in supernatant fraction from MNC culture treated with EWD were isolated by reverse phase high pressure liquid chromatography. The resulting supernatant fraction on 29.02 minutes of retention time showed high phagocytic activity of PMN. The molecular weight of this supernatant fraction was 16 to 18 kDa when analyzed by capillary electrophoresis. The isoelectric point was pH 5.76 when assessed by ion-exchange chromatography. These results suggest that EWD stimulates feline MNC to elaborate a phagocytosis-promoting factor, 16 to 18 kDa of molecular weight, which could be an important mediator for the enhancement of phagocytic activity of feline peripheral blood phagocytes. Further study will be needed to elucidate this phagocytic factor.

Key words : cat, egg white derivatives, mononuclear cells, polymorphonuclear cells, phagocytosis-promoting factor

서 론

말초혈액 단핵구세포(mononuclear cells; MNC)에서 분비되는 물질 중 다형핵백혈구(polymorphonuclear cells; PMN) 또는 MNC의 탐식에 관여하는 물질로는 interleukin (IL)-1, IL-2, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α 등이 있다^{8,19}. IL-1은 대표적인 염증성 cytokine으로 분자량이 17 kDa이고 매우 적은

용량으로도 생물학적 활성을 나타낸다. 그리고 이것은 정상적인 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 수행하며 호중구와 단구세포의 유주성을 증강시키고 TNF- α 와 함께 탐식활성을 증가시킨다^{5,17}. IL-2는 여러가지 탐식세포와 nature killer cells의 성장과 증식에 직접적인 영향을 나타내는 cytokine이며, 분자량은 15.5 kDa이다¹⁹. IL-8의 분자량은 8-10 kDa²⁴이며, 대표적인 chemokine으로 호중구의 유주성을 촉진시킨다. IL-8은 유주성 촉진효과 외에도 흡소년화된 적혈구를 탐식하고⁶ *Candida albicans*의 증식을 억제시킨다⁴. 그리고 IL-8은 respiratory burst³를 일으키고 leukotrin의 합성³, 과립구로부터 효소의 분비², β_2

“이 논문은 1995년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음”

¹Corresponding author.

intergrin 족의 발현¹⁵ 등에 관여한다. TNF- α 는 분자량이 17 kDa이며¹⁹, 탐식활성을 증강시키며, 또한 직, 간접적으로 조혈작용을 촉진시킨다^{10,20,22}. 이와 같이 탐식활성에 관여하는 cytokines은 다양하며 자극물질에 따라 MNC가 분비하는 탐식인자 또한 다른 것 같다.

최근 계란백유래물질(egg white derivatives; EWD)은 여러동물에서 비특이적인 면역을 증강시키는 효과가 있다고 보고되었다⁷ 그리고 말초혈액 탐식세포의 유주성과 탐식능을 증강시킬 수 있는 물질로 밝혀졌다⁹. 최근 *in vitro*에서 EWD를 말초혈액탐식세포에 처리하였을 경우 MNC의 탐식활성은 증강되었고, PMN에서는 탐식활성의 증강은 관찰되지 않았다^{8,14}. 또한 EWD 첨가 MNC 배양상층액을 처리한 경우는 PMN과 MNC 모두에서 현저한 탐식활성의 증강이 관찰되었다. EWD 첨가 PMN 배양상층액을 처리하였을 때는 MNC의 탐식활성은 증강되었지만, PMN의 탐식활성은 증강되지 않았다. 이러한 관찰로부터 EWD는 MNC를 활성화시켜 액상인자를 분비시키고 이 액상인자에 의해서 PMN과 MNC의 탐식 및 유주 활성이 증강된다고 제안하였다^{8,14}.

따라서 본 연구의 목적은 고양이의 PMN을 탐식 세포로 하여 EWD로 배양한 MNC 배양상층액내에 존재하는 탐식촉진인자를 검출하는데 있다.

재료 및 방법

실험약물

EWD는 Eisai Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 제공 받았으며, 계란을 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효한 후, cation column chromatography를 이용하여 saccharose와 lysozyme, avidin을 제거시킨 다음 56°C에서 분무건조의 과정을 거쳐서 제조된 물질이다¹.

배양상층액의 제조

건강한 고양이 말초혈액에서 분리하여 제조한 5×10^6 cell/ml의 PMN 및 MNC 현탁액을 24-multiwell plate(Falcon 3047, Becton Dickson Labware, NJ, USA)의 각 well에 1ml씩 첨가하였다. 다음은 EWD를 PBS로 희석하여 농도가 2 mg/ml로 제조하여 100 μ l씩 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 배양상층액은 5,000 \times g로 30분간 원심한 후 직경이 0.45 μ m인 filter에 통과시켜 여과하였다. 제조된 배양상층액은 실험에 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

탐식능 측정

2×10^6 cells/ml로 제조된 PMN 현탁액을 24-multiwell plate의 각 well에 넣은 후 EWD 또는 EWD를 처리한 PMN 및 MNC 배양상층액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 11시간 배양하였다. 그 후 1×10^9 particles/ml로 제조된 FITC-labelled latex(latex beads; 2.0 μ m; Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA)를 20 μ l첨가하여 1시간 더 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여 2,000 \times g의 속도로 1분간 원심한 후 3 mM EDTA-2Na(Wako Pure Chemical Industries, LTD, Tokyo, Japan)가 함유된 PBS로 3회 세척하였다. 10,000개의 세포중 latex bead를 탐식한 세포를 flow cytometry(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA)로 분석하였다⁷.

탐식촉진물질의 정제

5×10^7 cells/ml로 제조된 MNC 현탁액에 200 μ g/ml의 EWD를 첨가하여 24시간 배양한 MNC 배양상층액을 5,000 \times g로 30분간 원심분리한 후 직경이 0.2 μ m인 filter를 이용하여 여과하였다. 제조된 MNC 배양상층액을 reverse phase-high pressure liquid chromatography(RP-HPLC)로 분획하기 위하여, 3 μ m-역상 C₁₈ ODS column(Bioanalytical System, IN, USA)을 이용하였다. Ultra violet 검출기(WatersTM 486 Tunable Absorbance Detector, Millipore Corporation, MA, USA)를 이용하여 280 nm를 대조파장으로 하고 215 nm 파장에서 peak가 나타나는 것을 30분에 걸쳐 검출하였다. 이동상(mobile phase) 0.1% trifluoroacetic acid(Merck, Darmstadt, Germany)가 함유된 증류수를 이동상-I, 0.07% trifluoroacetic acid가 함유된 acetonitrile(Merck, Darmstadt, Germany)를 이동상-II로 사용하였다. 두 이동상은 gradient pump(WatersTM 510 HPLC pump, Millipore Corporation, MA, USA)를 이용하여 점차적으로 각각의 농도를 변화시켰다. 이동상-I은 최초 100%에서 시작하여 30분에 0%가 되도록 조정하였고, 이동상-II는 0%에서 시작하여 30분에 100%가 되도록 하였다. RP-HPLC로 분리한 각각의 분획은 1 N NaOH로 중화하였다.

탐식촉진물질의 분자량 측정

RP-HPLC로 분리한 분획중 PMN의 탐식활성에 있어서 증강효과를 나타낸 분획을 capillary electrophoresis(CE; Spectra PHORESISTM 1000, Thermo Separation Products, FL, USA)를 이용하여 분자량을 측정하였다. Silica가 충전된 길이 70 cm, 직경이 50 μ m

인 column(Thermo Separation Products, FL, USA)을 이용하였다. 분석조건은 전압 25 kV, 전류 17.8 μ A, 220 nm 파장에서 peak가 나타나는 것을 8분간 검출하였다. 1 N NaOH, 0.1 N NaOH, 증류수, sodium tetraborate run buffer를 차례로 주입한 후 RP-HPLC로 분리한 분획을 최종 주입하였다. 표준 size marker는 protein standards(Sigma, MO, USA)를 대조로 사용하였다.

탐식촉진물질의 등전점 측정

탐식촉진물질의 등전점(isoelectric point; pI)은 ion-exchange chromatography(IEC)로 측정하였다. RP-HPLC로 분리한 분획중 탐식활성의 증강을 나타낸 분획을 10 mM citric acid가 함유된 pH 2.0 용액에 넣어 안정화시킨 후, 그 분획을 Silica가 충전된 1 \times 6 cm column(Millipore Corporation, MA, USA)에 주입하였다. 이동상-I은 pH 2.0인 10 mM sodium citratephosphate buffer, 이동상-II는 pH 8.0인 1M NaCl이 함유된 10 mM sodium citrate-phosphate buffer를 이용하였다. 28 $^{\circ}$ C에서 0.5 ml/min의 유속으로, 280 nm에서 peak가 나타나는 것을 30분간 검출하였다.

통계처리

결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 통계분석은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

EWD 첨가 MNC 배양상층액에 대한 고양이 PMN의 탐식능

EWD(200 μ g/ml)를 직접 PMN에 처리하여 탐식활

Table 1. Phagocytic response of feline PMN to EWD and culture supernatant from PMN and MNC

Cells	Supplement	Phagocytic activity (%)
PMN	medium alone	16.85 \pm 0.55
	EWD	16.41 \pm 1.78
	culture supernatant from PMN treated with EWD	17.71 \pm 2.68
	culture supernatant from MNC treated with EWD	41.48 \pm 1.47*

The values represent mean \pm SEM (n=5).

*p<0.01, when compared to medium control.

성을 측정된 결과 탐식활성의 증강은 나타나지 않았다. PMN에 EWD(200 μ g/ml)로 배양한 PMN 및 MNC 배양상층액을 처리한 결과 PMN 배양상층액(50%)을 처리하였을 때는 탐식활성의 증강이 나타나지 않았지만, MNC 배양상층액(50%)을 첨가하였을 때는 유의한(p<0.01) 탐식활성의 증강이 관찰되었다(Table 1).

EWD 첨가 MNC 배양상층액의 분획

명백한 탐식촉진 효과를 나타내는 EWD 첨가 MNC 배양상층액을 RP-HPLC로 분획한 결과 10개의 분획을 검출하였다(Fig 1). 분리된 분획은 retention time (minutes;RT) 0.41, 1.21, 1.51, 1.55, 1.94, 4.54, 6.50, 23.82, 24.51 그리고 29.02에서 검출되었다.

EWD 첨가 MNC 배양상층액 분획들에 있어서 PMN의 탐식활성

PMN을 탐식세포로 하여 RP-HPLC로 분리한 각각의 분획에 있어서 PMN의 탐식활성을 측정하였다. RT 0.41부터 24.51(분)에서 분리된 분획들에서는 탐식활성의 증강이 나타나지 않았다. 그러나 RT 29.02분에서 분리된 분획에서는 PMN에 있어서 최대 탐식활성의 증강을 나타낸 EWD 첨가 MNC 배양상층액을 처리한 것과 유사한 탐식활성의 증강이 관찰되었다(Fig 2).

탐식촉진물질의 분자량과 등전점

RP-HPLC로 분리한 분획중 탐식활성의 증강효과를 나타낸 RT 29.02분에서 분리된 분획을 CE를 이용하여 분자량을 측정하였다. 표준 size marker와 본 분획을 동일한 조건으로 전기영동하여 비교 분석한 결과, 분자량은 16에서 18 kDa 사이로 나타났으며, 이

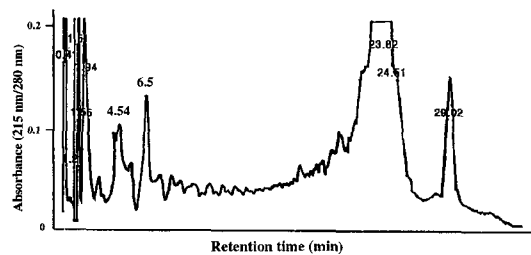


Fig 1. Purification of PMN phagocytosis-promoting factor in culture supernatant from feline MNC treated with EWD. (Column; 3 μ m-reversed phase C₁₈ ODS column, Flow rate; 1.0 ml/min, UV detectors; 215 nm and 280 nm, Temperature; 27 $^{\circ}$ C, Solution; 0.1% trifluoroacetic acid in water, 0.07% trifluoroacetic acid in acetonitrile).

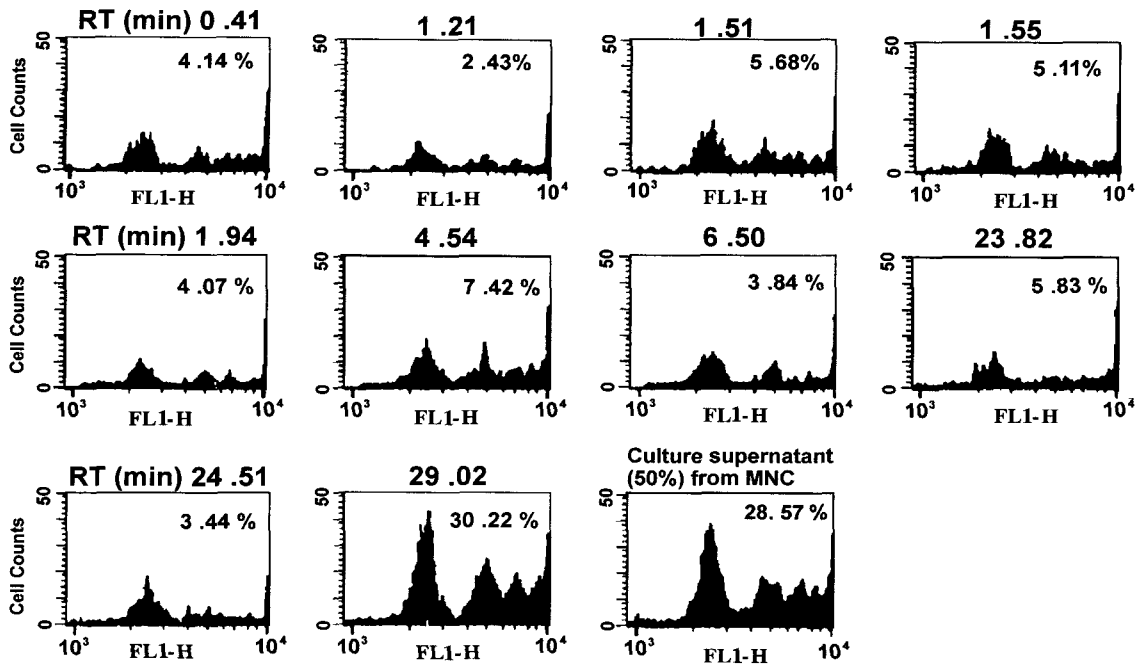


Fig 2. Profiles of phagocytized cells in feline PMN treated with fractions purified by RP-HPLC.

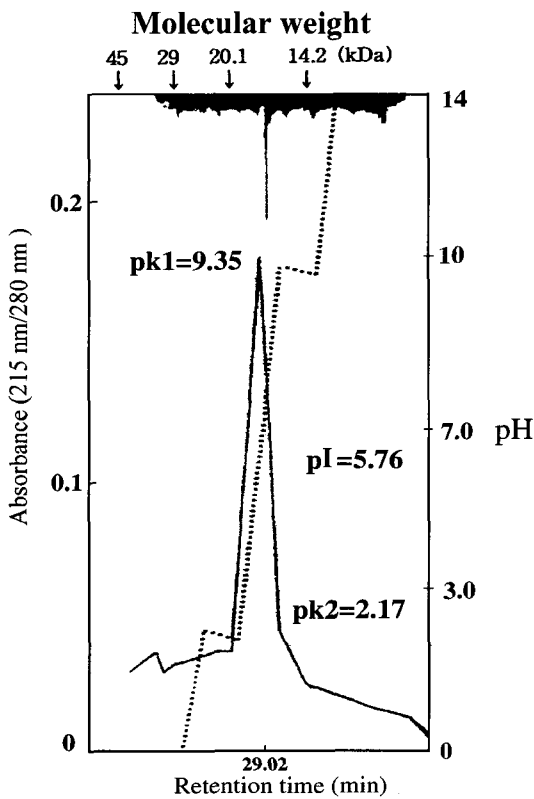


Fig 3. Capillary electrophoresis mapping of PMN.

때의 등전점은 pH 5.76이었다(Fig 3).

고 찰

활성화된 monocyte 및 lymphocyte가 분비하는 액상물질은 탐식세포의 탐식능에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 이들 세포들은 IL-1, IL-2, IL-8, interferons, TNFs, granulocyte-macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 등과 같은 다른 macro-phages나 neutrophils을 활성화시키는 cytokines을 생산함으로써 염증반응에 있어서 MNC와 몇가지 공통된 기능들을 공유하는 것으로 보인다^{8,16}. 이들 cytokines은 탐식세포의 부착²¹, 유주^{11,13}, respiratory burst¹¹, lysosomal enzyme 분비와 cell surface receptor 발현 등을 포함한 탐식세포들의 기능을 조절하고¹³, MNC를 포함한 탐식세포들은 이들 cytokines을 분비하여 자신들의 탐식능을 활성화시켜 염증부위에 있어서 병인체의 침입을 조절하는데 상호 관련되어 있을 것으로 생각된다. 특히 IL-1과 TNF- α 는 호중구와 단핵구 세포를 활성화시켜 발열과 급성 염증반응과 같은 전신적인 생리효과를 나타낸다²³.

본 연구에서 EWD 첨가 MNC 배양상층액중에 존재하는 탐식활성을 촉진시키는 물질을 알아보기 위해 RP-HPLC로 탐식활성 물질을 분리하여 CE로 분

자량을, IEC를 이용하여 등전점을 측정하였다. 본 연구에서 분리된 분획중 최대의 탐식활성을 나타낸 RT 29.02분에서의 분획을 일반적인 sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 silver stain으로 염색하였을 때는 분자량 측정이 불가능하였다. 이것은 RP-HPLC에 사용된 EWD 첨가 MNC 배양상층액의 용량이 0.025 μ l로 극소량이고, 이후 분리된 분획 또한 mobile phase로 희석되었기 때문에 탐식촉진물질의 용량과 절대농도가 매우 낮은 수준이라 측정이 불가능하였던 것으로 사료되었다. 그래서 pg/ml 수준까지도 검출이 가능한 CE를 이용하여 분자량을 측정하였다. 그 결과 본 물질의 분자량은 16~18 kDa사이로 나타났다. MNC에서 분비되는 물질 중 PMN의 탐식활성을 증강시키는 IL-1과 IL-2, 그리고 TNF- α 의 분자량과 본 탐식활성을 촉진시키는 물질을 비교하면, IL-1과 TNF- α 의 분자량이 모두 17 kDa으로 본 탐식활성을 촉진시키는 물질과 근접한 분자량을 나타냈다¹⁹. IL-1과 TNF- α 는 구조와 수용체는 전혀 다르지만 생물학적 성질에 있어서는 매우 밀접한 관계를 가지고 있다¹⁸. 두 cytokines을 병용하면 각각의 cytokine의 단독효과 보다 더 강한 탐식촉진 효과를 나타낸다고 하며, IL-1과 TNF- α 의 이러한 상승작용은 cell receptor의 upregulation에 의해서 일어나는 것이 아니라 2차적인 신호 전달 물질에 의해서 일어나는 것으로 되어있다¹⁹. 그리고 실제 IL-1은 TNF- α 의 receptor를 감소시키는 경향을 나타낸다⁷.

일반적으로 등전점의 측정은 isoelectric focusing 방법을 이용하지만 본 연구의 RT 29.02분에서 분리된 분획의 절대농도의 수준이 낮은 관계로 IEC를 이용하여 분석한 결과 본 분획의 등전점은 pH 5.76이었다. IL-1의 등전점은 major 부분이 pH 6.1이고 minor 부분이 pH 6.3과 pH 6.9이었다¹². IL-1의 등전점이 major부분과 minor 부분이 다른 이유는 IL-1을 분비하는 여러 세포기원에 따라 차이가 나타난다¹². 그렇지만 immunoblotting으로 확인한 결과는 등전점의 차이에 관계없이 17 kDa으로 동일하게 나타났다¹². 본 연구에서 검출된 16~18 kDa의 탐식촉진물질이 TNF- α 일 가능성을 조사하였으나 TNF- α 의 등전점은 아직 보고된 바가 없어 확인하기 어려웠다.

이상의 결과로부터 PMN을 탐식세포로 하여 계란의 난백에서 유래된 물질인 EWD로 배양한 MNC 배양상층액중 존재하는 탐식촉진 물질을 분획하여 검토한 결과, 분자량이 16~18 kDa이었으며, 등전점은 pH 5.76인 물질로 밝혀졌다. 또한 본 탐식촉진물

질에 대한 명확한 설명은 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

결 론

본 연구는 계란백유래물질(EWD)로 배양한 고양이 말초혈액 단핵구세포(MNC)의 배양상층액에서 다형핵 백혈구(PMN)의 탐식증강 효과 및 탐식촉진 물질에 관하여 조사하였다. 탐식능 측정은 flow cytometry를 이용하였다. PMN의 탐식능은 EWD를 직접 처리할 경우나 EWD로 배양한 PMN 배양상층액에 대해서는 탐식증강 효과가 없었다. 그러나 EWD로 배양한 MNC 배양상층액에서는 현저한 탐식증강효과가 나타났다. 이와같은 결과는 MNC 배양상층액중에 PMN으로 하여금 탐식을 촉진시키는 물질이 존재한다는 것을 시사하였다. 따라서 PMN을 탐식세포로 하여 EWD로 배양한 MNC 배양상층액중의 탐식촉진 물질을 RP-HPLC로 분획하여 검토한 결과, PMN의 탐식능은 retention time 29.02분에서 분리된 분획에서 높은 수준의 탐식촉진 활성이 나타났다. 여기서 분리된 물질을 CE로 분석한 결과, 분자량(molecular weight)이 16~18 kDa 이었으며, IEC를 이용한 등전점(isoelectric point)은 pH 5.76이었다. 이상의 결과로부터 EWD는 고양이 MNC에 작용하여 16~18 kDa의 탐식촉진 물질을 분비시켜 PMN의 탐식능을 증강시키는 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Detmers PA, Powell DE, Waltz A, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Cohn ZA. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologous on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J Immunol* 1992; 147: 4211-4217.
2. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Waltz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulating the binding activity to the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990; 171: 1156-1162.
3. Dewald B, Thelen M, Wymann MP, Baggiolini M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. *Biochem J* 1989; 264: 879-884.
4. Djeu JY, Matsushima K, Oppenheim JJ, Shiotsuki K, Blanchard DK. Functional activation of human neutrophil by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol* 1990;

- 144: 2205-2210.
5. Helmut H, David W. Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 β -phorbol-13-acetate. *J Immunol* 1987; 139: 1161-1167.
 6. Hemert FJ, Berkhout B. The tendency of lentiviral open reading frames to become A-rich: constraints imposed by viral genome organization and cellular tRNA availability. *J Molecular Evolution* 1995; 41: 132.
 7. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T, Sugii S, Akiyama K. Immunostimulating activities of chicken egg white derivatives (EWD) are recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoINF α 1) in dogs and cattle. *Bull Soc Fr Jpn Sci Vet* 1995; 6(2): 58-67.
 8. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Yoshihara K, Furusawa S, Yasuda M, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T. Enhancing effects of chicken egg white derivatives on the phagocytic response in the dog. *J Vet Med Sci* 1995; 57(5): 825-829.
 9. Hirota Y, Yang MP, Ohta Y, Araki S, Matsumoto Y, Kang CB, Mohamed A, Yoshihara K, Furusawa S, Suzuki K, Onodera T, Akiyama K, Sugii S. Usefulness of egg white derivatives (EWD) and recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoINF α 1) in veterinary medicine. In vaccines in agriculture: Immunological application to animal health and production: CSIRO press. 1994: 57-63.
 10. Jacobsen SW, Ruscetti FW, Dubois CM, Keller JR. Tumor necrosis factor α directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: Rple of colony-stimulating factor receptor modulation. *J Exp Med* 1992; 175: 1759-1772.
 11. Kowanko IC, Ferrante A. Interleukin-2 inhibits migration and stimulates the respiratory burst and degradation of human neutrophils *in vitro*. *Immunol Lett* 1987; 15: 285-289.
 12. Maria B, Torbjorn E. Purification and characterization of interleukin 1 β from human plantar stratum corneum. evidence of interleukin 1 β processing *in vitro* not involving interleukin 1 β convertase. *Cytokine* 1998; 10(7): 506-513.
 13. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987; 138: 1469-1478.
 14. Nakagawa J, Osame S, Ichijyo S, Araki S, Kimura M. Effects of active egg white product on neutrophil function in calves. *J Vet Med Sci* 1993; 52(2): 259-263.
 15. Nibbering PH, Pos O, Stevenhagen A, Furth RV. Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. *Infect Immune* 1993; 61(8): 3111-3116.
 16. Park SE, Yun YW, Yang MP. Effect of ginseng saponins on phagocytosis of feline peripheral blood phagocytes. *Korean J Vet Clin Med* 1998; 15(1): 116-123.
 17. Priestle JP, Schar HP, Grutter MG. Crystal structure of the cytokine interleukin-1 β . *EMBO J* 1988; 7: 339-343.
 18. Priestle JP, Schar HP, Grutter MG. Crystallographic refinement of interleukin 1 β at 20 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 9667-9671.
 19. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. 3rd ed. London: Mosby-year book europe. 1993: 101-108.
 20. Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland EB, Jacobsen SW. Bifunction effects of tumor necrosis factor α (TNF α) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 1994; 83(11): 3152-3159.
 21. Seow WK, Thong YH, Ferrante A. Macrophage-neutrophil interaction: contrasting effects of the monokine interleukin-1 and tumor necrosis factor (chachetin) on human neutrophil adherence. *Immunology* 1988; 82: 357-361.
 22. Shirai R, Kadota J, Tomono K. Protective effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in a granulocytopenic mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection thought enhanced phagocytosis and killing by alveolar macrophages through priming tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) production. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 73-79.
 23. Steinkamp JA, Wilson JS, Saunders GC, Stewart CC. Phagocytosis: Flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science* 1982; 215: 64-66.
 24. Thomson AW. The cytokine handbook. 2nd ed. San Diego. Academic Press. 1994: 31-80, 186-208, 289-304.