

개 말초혈액 탐식세포의 탐식반응에 대한 1,2-benzopyrone의 면역자극 효과

신정화 · 나기정 · 양만표¹

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Immunostimulating Effect of 1,2-Benzopyrone on Phagocytic Response of Canine Peripheral Blood Phagocytes

Jung-hwa Sin, Ki-jeong Na and Mhan-pyo Yang¹

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

Abstract : 1,2-benzopyrone has been shown to affect on the activation and stimulation of macrophage. To examine the immunostimulating effect of 1,2-benzopyrone on the phagocytic response of canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as well as polymorphonuclear cells (PMN), the phagocytic activity of phagocytes was analyzed by flow cytometry system using FITC-labelled latex. The 1,2-benzopyrone did not show any direct effect on phagocytic response of PBMC and PMN. But it showed an enhanced effect on the phagocytic response of monocyte-rich cells fractioned by cell size from dot plot profile in flowcytometric cytography of PBMC. The phagocytic activity of these cells was also enhanced by addition of culture supernatant from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. Similarly, the phagocytic activity of PMN but not PBMC in the same procedures was enhanced by culture supernatant from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. However, the culture supernatant from PMN treated with 1,2-benzopyrone did not show the enhancing effect on phagocytic activity for monocyte-rich cells and PMN. These results, therefore, suggested that enhanced phagocytic activity of canine peripheral blood PMN and monocytes may be mainly mediated by humoral factor(s) released from PBMC treated with 1,2-benzopyrone.

Key words : 1,2-benzopyrone, dog, immunostimulation, peripheral blood phagocytes, phagocytosis

서 론

탐식작용은 탐식세포가 세균이나 바이러스 또는 죽은 조직 파편 등의 이물이 접근하여 세포막으로 둘러싸서 세포내로 끌어들이고 후 공포를 형성하여 lysosome과 융합시켜 phagolysosome을 생성한 후 가수분해 효소로 탐식된 이물을 소화하는 과정이며 주로 세막내피계에 속하는 간장, 비장, 림프절, 골수 등이 탐식세포를 많이 가지고 있다⁶.

1,2-benzopyrone(C₉H₆O₂)은 통카콩이나 라벤더유와 같은 정유(essential oil)에 함유된 성분으로 benzene과 α-pyrone rings의 축합으로 구성되어 있으며¹¹, 간 cytochrome P450 효소에 의해 대사되어 수산화 대사물을 생성하고 glucuronide 포함체를 형성한다¹⁹. 생성되는 대사물 중에서도 7-hydroxycoumarin은 높은 형광을 발하여 쉽게 그 양을 잴 수 있기 때문에 7-hydroxycoumarin을 통한 연구가 활발히 이루어져 있다. 사람에서 1,2-benzopyrone은 CYP2A6에 의해 7-hydroxycoumarin으로 전환되며 이 7-hydroxycoumarin은 glucuronide, sulfate와 포함되어 요 중으로 배출된다¹⁵. 임상적 사용은 림프관 폐쇄에 의해 발생한 국소 부종의 감소에

효과적이다⁴. 부종을 감소시키는 1,2-benzopyrone의 효과는 세막내피계에 존재하는 대식세포를 포함한 탐식세포들에 대해 활성작용을 하기 때문인 것으로 알려져 있다¹³. 이것은 모세혈관 투과성을 감소시키지는 않으며 그 대신 혈장 단백질이나 조직 단백질과 결합한다¹⁵. 혈장 단백질과 결합한 1,2-benzopyrone은 모세혈관을 통해 누출되어 조직내로 이동한 후 단백질이 축적된 부위에 존재하는 대식세포를 활성화시켜 대식세포로부터 여러가지 효소들을 분비시키며 운동성과 유주성 또는 탐식능을 향상시킨다¹⁸. 또한 단백질과 결합한 1,2-benzopyrone은 탐식세포에 좀 더 탐식이 잘 되도록 유인 역할을 한다⁹. 활성화된 탐식세포는 간질액내에 축적된 거대분자 단백질이나 hyaluronian을 줄여 결과적으로 삼투압을 낮추어 부종을 경감시키는데 일조한다¹². 이와 같이 부종에서 1,2-benzopyrone의 효과는 대식세포로 하여금 단백질분해를 촉진시키고 그것의 탐식효과를 증가시킨다는 것으로 제안되어져 있다²⁰.

최근 유약동물과 노령동물의 생체내 방어기능을 향상시키기 위한 생물활성물질이나 면역자극제에 의한 비특이적 면역자극제의 사용이 급격히 대두되고 있다^{5,16,21}. 이것뿐 만 아니라 면역증강제의 사용은 면역계 탐식세포들의 면역기능 강화나 각종 감염에 대한 예방 및 치료 대책의 일환으로 면역자극제 사용에 기대가 높은 것은 사실이며, 항생제만으로 치

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

료가 어려운 기회감염증 등에 있어서 병용투여로 예방과 치료효과를 높일 수 있을 것이다.

부종감소의 치료제로 사용되는 1,2-benzopyrone 자체의 면역자극작용이나 그 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구의 목적은 개 말초혈액 탐식세포의 탐식반응에 대한 1,2-benzopyrone의 면역자극작용을 알아보는데 있다.

재료 및 방법

실험 동물

임상적으로 건강한 평균 1.5년령의 비글견들을 실온($22\pm 2^\circ\text{C}$)에서 낮(12시간)과 밤(12시간)의 리듬을 유지하여, 개장에서 개별 사육하였다. 사료는 pellet 사료(Fildmaster, Purina Korea, Seoul, Korea)를 급여하였다.

단핵구세포 및 다형핵백혈구의 분리

헤파린 처리된 주사기를 이용하여 경정맥으로부터 채혈한 혈액을 동량의 Histopaque®-1077(specific gravity, 1.077; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 위에 층층 시킨 후 실온에서 $400\times g$ 로 30분간 원심분리를 하였다. 혈장과 Histopaque®층 사이에 있는 세포를 회수한 후 0.83% NH_4Cl Tris-base buffer(pH 7.2)에서 5분간 처리한 세포를 PBS로 3회 세척하여 말초혈액 단핵구세포(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)로 사용하였다. PBMC는 Wright-Giemsa 염색 후 감별계산을 한 결과 단구세포가 약 30% 그리고 림프구가 약 70%로 나타났다. 다형핵백혈구(polymorphonuclear cells; PMN)의 분리는 Histopaque®층 아래의 적혈구와 PMN이 혼합된 층을 1.5% dextran(분자량, 200,000; Wako Ltd., Osaka, Japan)이 함유된 PBS 10 ml을 처리하여 45분간 정지 후 부유되는 세포를 회수하고, $400\times g$ 로 5분간 원심분리 하였다. 남아있는 적혈구는 0.83% NH_4Cl Tris-base buffer로 처리한 후 PBS로 3회 세척하여 회수한 세포를 PMN으로 탐식능 실험에 제공하였다. PMN은 cytopsin 원심 후 Diff-Quick 염색으로 확인한 결과 96% 이상이 호중구이었다. 분리한 PBMC 및 PMN의 세포 생존율은 trypan blue exclusion test를 통해 검사한 결과 항상 98% 이상이었다. 제조된 PBMC와 PMN은 5% fetal bovine serum(FBS; Gibco Brl, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 gentamicin이 ml당 0.02 mg 함유된 RPMI-1640(Sigma-Aldrich Co.)에 현탁시켜 사용하였다.

배양상층액의 제조

PBMC 및 PMN 현탁액을 24-multiwell plate(Nunc Co., Naperville, IL, USA)의 각 well에 2×10^6 개/ml씩 첨가하였다. 다음은 1,2-benzopyrone(Sigma-Aldrich Co.)을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Co.)에 희석하여 최종농도가 $100\mu\text{M}$ 이 되도록 첨가한 후, 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 24시간 배양 후 배양 상층액을 회수하여 $5000\times g$ 의 속도로 3분간 원심분리 한 후 직경이 $0.45\mu\text{m}$ 인

filter에 통과시켜 여과하였다. 제조된 배양상층액은 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

탐식능 측정

PMN과 PBMC의 탐식활성은 이전에 기술되었던 방법²²에 따라 측정하였다. 간단히 서술하면, 24-multiwell plate에 1×10^6 개/500 μl /well로 첨가된 PMN 및 PBMC에 1,2-benzopyrone 및 1,2-benzopyrone으로 배양한 PBMC와 PMN의 배양상층액을 다양한 농도로 첨가하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 11시간 동안 배양하였다. 대조군에는 동량의 1,2-benzopyrone의 희석액인 DMSO를 대신 첨가하였다. 그 후 1×10^9 particles/ml로 제조된 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled latex (bead size, $2.0\mu\text{m}$; Polysciences Inc., Warrington, PA, USA)를 20 μl 첨가하여 1시간 더 배양하였다. 배양한 세포는 가볍게 피펫팅하여 회수한 후, $2000\times g$ 의 속도로 3분 간 원심분리하고 3 mM EDTA-2Na(Sigma-Aldrich Co.)가 함유된 PBS로 3회 세척하였다. FITC-labelled latex를 첨가하지 않은 세포를 negative control로 사용하였다. Flow cytometer(BRYTE HS, Bio-Rad Microscience Ltd, Hertfordshire, UK)의 cytography상에 약 10,000개의 세포를 띄워 FITC-labelled latex를 탐식한 세포의 형광값으로 탐식능을 분석하였다. Monocyte-rich cells은 PBMC의 flowcytometric cytography상에서 dot plot profile로부터 PBMC의 cell size를 확인하여 분획한 후 탐식능을 측정하였다. Monocyte-rich cells 분획에서 3,000개의 세포 중 FITC-labelled latex를 탐식한 세포수의 비율을 측정하였다. 탐식활성은 절대치를 백분율로 표현하였다.

통계처리

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

결 과

PMBC와 PMN의 세포 생존율

1,2-benzopyrone을 첨가하여 24시간 배양한 PBMC 및 PMN을 trypan blue로 염색하여 viability를 측정하였다. Table 1에 나타낸 것처럼 PBMC의 경우 1,2-benzopyrone $500\mu\text{M}$ 농도에서 세포 생존율이 약간 감소하였으나, PMN의 경우에는 농도증가에 큰 변화가 없었다.

탐식세포의 탐식능에 대한 1,2-benzopyrone의 직접 효과

개 말초혈액 PMN과 PBMC의 탐식활성에 있어 1,2-benzopyrone의 직접 효과를 알아보기 위해, 1,2-benzopyrone을 첨가하여 12시간 배양하였다. PMN (Fig 1A)과 PBMC (Fig 1B)의 탐식활성은 1,2-benzopyrone의 농도를 증가시켜도 무처리 대조군에 비하여 탐식활성의 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 monocyte-rich cells(Fig 1C)에서는 1,2-benzopyrone의 첨가농도에 의존하여 탐식활성이 증가하였으며, 1,2-

Table 1. Cell viability of PBMC and PMN treated with 1,2-benzopyrone for 24 hours

	Concentration (μM)					
	0	25	50	100	200	500
PBMC	96.7 \pm 1.85	95.3 \pm 2.33	95.7 \pm 2.02	95.7 \pm 1.20	94.3 \pm 1.45	93.0 \pm 2.00
PMN	99.3 \pm 0.33	98.0 \pm 1.52	98.7 \pm 0.88	98.7 \pm 0.88	98.3 \pm 0.88	97.3 \pm 0.88

The values represent mean \pm SEM (n=3).

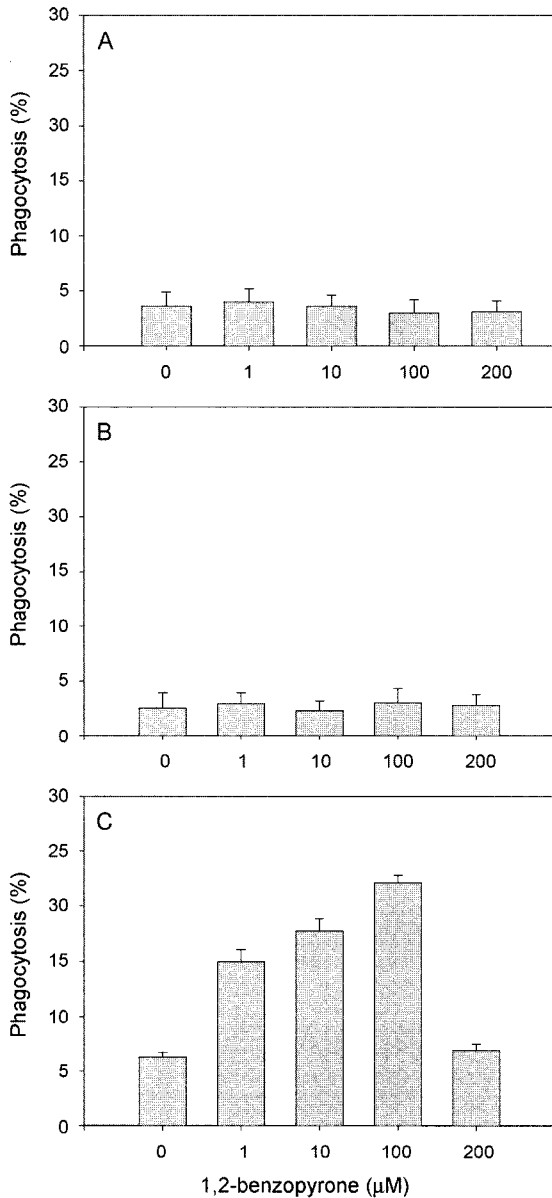


Fig 1. The direct effects of 1,2-benzopyrone on phagocytosis of canine PMN (A), PBMC (B) and monocyte-rich cells (C). The data represent mean \pm SEM (n=3). ** $p < 0.01$, compared to control (0 μM).

benzopyrone 농도 100 μM 에서 최대의 탐식활성을 나타내었다. 따라서 이후 1,2-benzopyrone은 세포 생존율과 탐식활성을 고려하여 100 μM 을 첨가농도로 하였다.

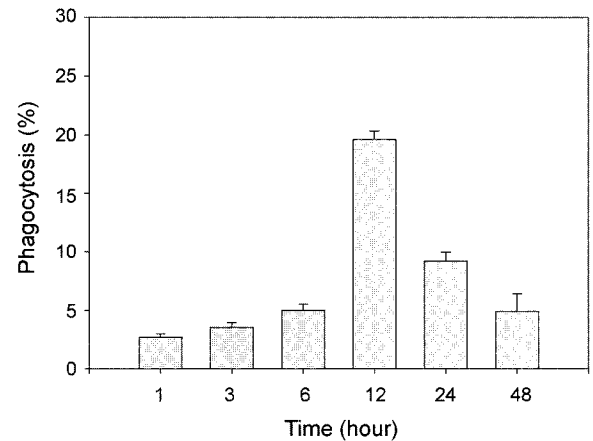


Fig 2. Time-course of phagocytic response for PMN by culture supernatant from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean \pm SEM (n=3).

탐식세포의 탐식능에 대한 1,2-benzopyrone 첨가 PBMC 배양상층액의 효과

1,2-benzopyrone(100 μM)으로 24시간 배양한 PBMC(2×10^6 cells/ml)의 배양 상층액을 PMN에 첨가하여 탐식활성을 경시적으로 측정된 결과, PBMC 배양상층액(25%)으로 12시간 배양하였을 경우 가장 높은 활성을 보였다(Fig 2). PBMC 배양상층액의 농도변화에 따른 탐식반응은 12시간 배양에서 무첨가 PMN에 비해 PBMC 배양상층액의 농도증가에 따라 PMN의 탐식활성이 증가하였으며 25%에서 가장 높은 활성($p < 0.01$)을 나타내었다(Fig 3A). 그러나 PBMC의 경우는 PBMC 배양상층액에 반응하여 탐식활성이 증가하지 않았다(Fig 3B). 따라서 PBMC를 flowcytometric cytography 상의 dot plot profile로부터 monocyte-rich cells 분획을 정하여 그 분획에서 탐식활성을 측정하였다. 그 결과 PBMC 배양상층액(25%) 첨가는 무첨가 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 monocyte-rich cells 탐식활성 증가를 나타내었다(Fig 3C).

탐식세포의 탐식능에 대한 1,2-benzopyrone 첨가 PMN 배양상층액의 효과

1,2-benzopyrone으로 배양한 PMN 배양상층액을 PMN(Fig 4A), PBMC(Fig 4B) 및 monocyte-rich cells(Fig 4C)에 첨가하여 탐식활성을 측정된 결과 어느 세포의 경우에도 무첨가 대조군에 비해 유의성 있는 증가는 보이지 않았다.

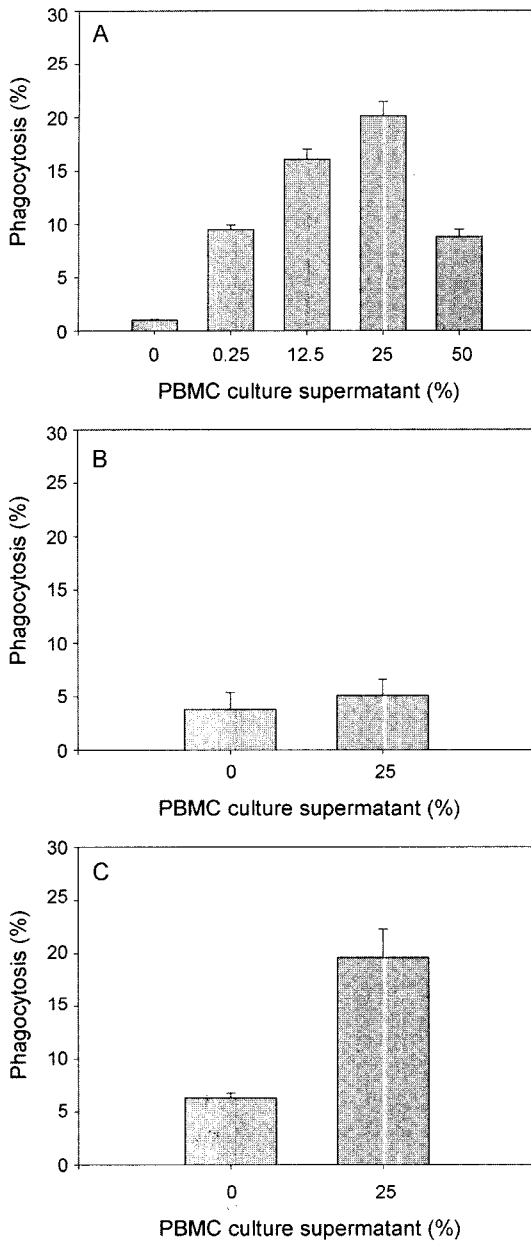


Fig 3. Phagocytic responses for PMN (A), PBMC (B) and monocyte-rich cells (C) by culture supernatant from PBMC treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean±SEM (n=3). **p < 0.01, compared to control (0%).

고 찰

본 연구의 결과는 *in vitro*에서 1,2-benzopyrone이 PMN과 PBMC의 세포 생존을 감소에는 크게 영향을 주지 못함을 보여주고 있다. 마우스의 복강 대식세포에서도 고농도의 1,2-benzopyrone을 사용한 경우 세포독성 효과가 나타나지 않았다고 하였다⁹. 그러나 개에서 장기간 고농도로 1,2-benzopyrone을 투여할 경우에는 신 독성 및 간 독성이 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁵.

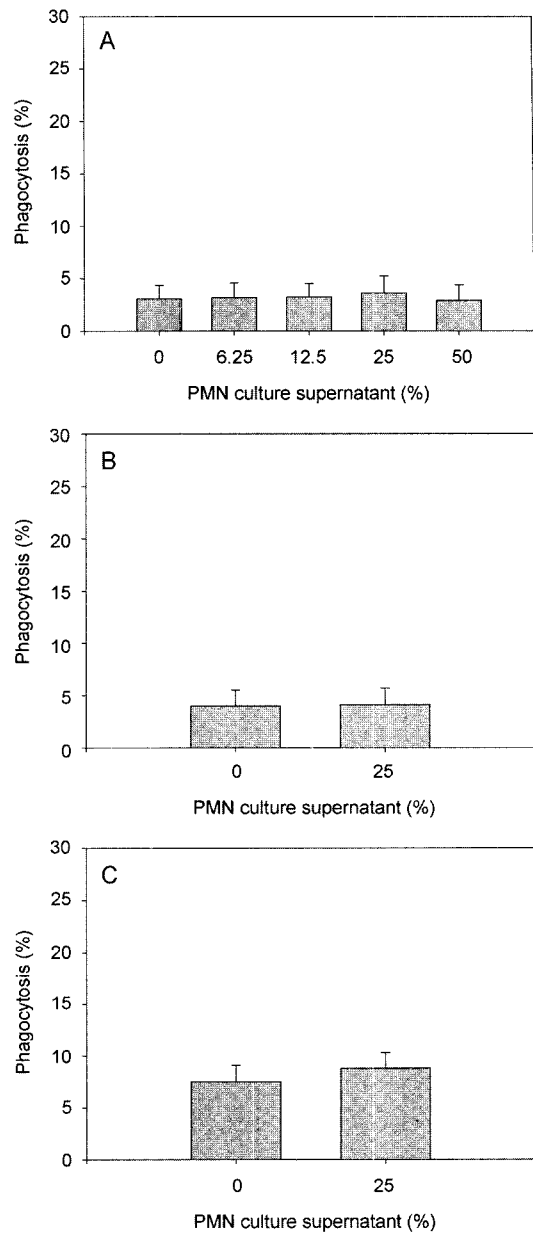


Fig 4. Phagocytic responses for PMN (A), PBMC (B) and monocyte-rich cells (C) by culture supernatant from PMN treated with 1,2-benzopyrone. The data represent mean±SEM (n=3).

본 연구에서 1,2-benzopyrone을 첨가한 PBMC 배양상층액은 단구세포와 대략 96%의 호중구로 구성된 PMN의 탐식 활성화에 있어 면역증강 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 이전의 conjugated linoleic acid(CLA)를 처리한 돼지 PBMC⁸, egg white derivatives(EWD)를 처리한 개¹⁰와 고양이²⁴의 PBMC 및 홍삼 사포닌을 처리한 고양이의 PBMC¹⁷ 배양상층액들이 각각의 PMN의 탐식반응을 증가시켰던 것과 일치한다. 즉 림프구 70%와 단구세포 30%로 구성되어 있는 개 말초혈액 PBMC는 1,2-benzopyrone의 자극을 받아 가용성

물질을 생성 분비하여 단구세포나 호중구 등의 탐식세포의 활성을 증강시켰을 것으로 추정된다. 이전의 연구에 따르면 EWD에 반응하여 고양이 PBMC에서 생성된 탐식촉진인자로는 16-18 kDa의 가용성 물질인 것으로 제시되었으며³, EWD를 처리한 PBMC 배양상층액에서 돼지 PMN의 탐식반응을 촉진시킨 물질은 IL-1이 아닌 분자량 16-18 kDa의 TNF- α 로 확인되었다⁴. TNF- α 는 단구세포를 포함한 단핵구세포에 의하여 주로 생산되며, 당초 암세포에 대한 독성으로 인하여 발견되었으나 다양한 작용이 있는 것으로 밝혀졌다^{1,2}. 따라서 1,2-benzopyrone은 PBMC를 자극하여 가용성 탐식촉진 인자들을 분비하여 탐식세포의 탐식능을 증강시킨 것으로 사료되었으며, 이에 대한 계속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구의 결과에서 1,2-benzopyrone을 PBMC에 직접적으로 첨가한 후 12시간 배양하였을 경우에도 단구세포의 탐식활성이 증가하였다. 이와 유사하게 마우스에 있어서도 복강 대식세포의 탐식활성을 1,2-benzopyrone이 직접적으로 증가시켰던 경우가 있다⁹. 이러한 결과는 1,2-benzopyrone의 자극을 받은 PBMC는 가용성 물질을 분비하여 단구세포인 자기 자신에 대해 탐식활성을 증가시키는 소위 autocrine¹⁰ 작용을 보인 것으로 사료되었다. 그러나 PBMC에 1,2-benzopyrone을 직접 첨가하였을 경우 PBMC의 탐식반응에는 그다지 영향을 미치지 못했다. 이것은 아마도 PBMC세포의 population 중 70%가 림프구인 것과 관련이 있는 것으로 추정된다. 또한 현재의 결과에서 1,2-benzopyrone을 처리한 PMN의 배양상층액은 탐식세포에 대한 탐식활성이 없는 것으로 나타났으며, 1,2-benzopyrone을 직접 처리하였을 경우에도 PMN의 탐식활성은 증가하지 않았다. 이것은 1,2-benzopyrone의 항원으로써의 자극은 PMN 세포에는 직접적인 활성이 없으며 또한 PMN은 어떠한 탐식인자도 분비시키지 않는다는 것으로 사료된다.

이 밖에도 용량, 배양시간, 탐식물질, 배지 상태 등 많은 인자들이 탐식성을 좌우할 수 있는 요인으로 생각된다. 1,2-benzopyrone은 대식세포의 protein에 대한 affinity에 영향을 준다고 제시되어 있다. 왜냐하면 대식세포는 손상되거나 변성된 protein이 아닌 native protein에는 유주성이 없는데³, 1,2-benzopyrone은 native protein에도 잘 결합하기 때문이다. 1,2-benzopyrone처럼 protein과 잘 결합하는 물질들은 protein 분자에 약간의 변화를 주어 탐식세포에 좀 더 탐식이 잘 되도록 한다⁹. 즉 대식세포에 대한 활성이 protein과 1,2-benzopyrone complex를 통해서도 이루어졌을 것이라 추정된다. 그러나 bovine albumin이 배지에 첨가되었으므로 1,2-benzopyrone과 protein complex의 효과에 대해서는 아직 확인하지 못하였다.

이상의 연구결과로부터 1,2-benzopyrone은 개 말초혈액 탐식세포의 탐식성에 대해서 면역자극 효과를 가지는 것으로 사료된다. 또한 이것은 1,2-benzopyrone에 의해 자극된 PBMC로부터 분비된 활성 체액성 인자들에 의해서 주로 매개된 것으로 시사되었다.

결 론

개 말초혈액 탐식세포(PMN 및 monocytes)의 탐식성에 있어서 1,2-benzopyrone의 면역자극 효과를 검토하였다. 탐식세포의 탐식성은 flow cytometer로 분석하였으며 결과는 다음과 같다.

1. 1,2-benzopyrone을 첨가하여 배양한 PMN과 PBMC에서는 탐식증강 효과가 없었다. 그러나 flow cytometer cytography에서 cell size에 의해서 분획한 monocyte-rich cells에서는 탐식증강 효과가 나타났다.

2. 1,2-benzopyrone으로 배양한 PBMC의 배양상층액은 PMN과 monocyte-rich cells의 탐식활성에 있어서 현저한 증강효과를 나타내었다. 그러나 PBMC에서는 탐식활성 증강효과는 관찰되지 않았다.

3. 1,2-benzopyrone으로 배양한 PMN의 배양상층액에 있어서는 PBMC와 PMN 그리고 monocyte-rich cells의 탐식성을 측정할 결과, 어느 경우에도 증강효과는 나타나지 않았다.

이상의 결과로부터 1,2-benzopyrone은 개 말초혈액 탐식세포에 대하여 탐식증강 효과를 가지고 있으며, 이러한 증강효과는 1,2-benzopyrone에 의해 활성화된 PBMC에서 분비되는 탐식촉진인자를 함유한 가용성 물질에 의해 autocrine 또는 paracrine 양상으로 탐식세포에 작용한 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 β and tumor necrosis factor- α . J Immunol 1992; 149: 2358-2366.
2. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. N Engl J Med 1987; 316: 379-384.
3. Borelli P, Souza IP, Borojevic R, Dagli ML, Kang HC. Protein malnutrition: some aspects of the *in vitro* adhesion of peritoneal mouse macrophages. Ann Nutr Metab 1998; 42: 367-373.
4. Casley-Smith JR, Wang CT, Zi-hai C. Treatment of filarial lymphoedema and elephantiasis with 5,6 benzo- α -pyrone (coumarin). BMJ 1993; 307: 1037-1041.
5. Chang HR, Grau GE, Pechere JC. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. Immunology 1990; 69: 33-37.
6. Comazzi S, Paltrinieri S, Spagnolo V, Sartorelli P. Evaluation *in vitro* of canine neutrophil function. Vet J 2001; 162: 219-225.
7. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Generation of B-cell and T-cell responses. In: Kuby immunology, 4th ed. New York: WH Freeman and Company. 2000: 215-239.
8. Han SC, Kang JH, Son SM, Chung CS, Lee CY, Yang MP. Supplement of conjugated linoleic acid increases neutrophil phagocytosis in pigs. J Vet Clin 2003; 20: 431-436.
9. Hardt TJ, Ritschel WA. The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on *in vitro* macrophage phagocytosis of latex particles. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1983; 5: 39-

- 43.
10. 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: 825-829.
 11. Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 713-722.
 12. Kang JH, Lee JY, Han SC, Son SM, Na KJ, Mo IP, Yang MP. A case of malignant lymphedema in a dog. *J Vet Clin* 2002; 19: 450-454.
 13. Knight KR, Khazanchi RK, Pederson WC, McCann JJ, Coe SA, O'Brien BM. Coumarin and 7-hydroxycoumarin treatment of canine obstructive lymphoedema. *Clin Sci* 1989; 77: 69-76.
 14. Ko IK. Tumor necrosis factor- α expression of porcine peripheral blood mononuclear cells induced by egg white derivatives. In thesis of master degree, Dept. Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 2000.
 15. Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 423-453.
 16. Lloberas J, Celada A. Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1325-1331.
 17. Park SH, Yun YW, Yang MP. Effect of ginseng saponins on phagocytosis of feline peripheral blood phagocytes. *J Vet Clin* 1998; 15: 116-123.
 18. Piller NB. Lymphoedema, macrophages and benzopyrones. *Lymphology* 1980; 13: 109-119.
 19. Ritschel WA, Vachharajani NN, Johnson RD, Hussain AS. Interspecies scaling of the pharmacokinetic parameters of coumarin among six different mammalian species. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1991; 13: 697-702.
 20. Rockson SG. Lymphedema. *Am J Med* 2001; 110: 288-295.
 21. Schroder AK, Rink L. Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 419-425.
 22. van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 1999; 232: 23-43.
 23. Yang MP, Kim KH. Detection of phagocytosis-promoting factor of culture supernatant from feline peripheral blood mononuclear cells cultured with egg white derivatives. *J Vet Clin* 1999; 16: 31-36.
 24. Yang MP, Kim KH. Effect of egg white derivatives on phagocytic response of feline peripheral blood phagocytes. *J Vet Clin* 1999; 16: 37-41.