

鬱金에 의한 血管內皮細胞 보호 효과에 대한 연구

서은아 · 정현택¹ · 고광학² · 권강범^{2*}

원광대학교 생활과학대학 식품영양학과, 1: 원광대학교 의과대학 면역유전체질환 연구센터, 2: 원광대학교 한의과대학 생리학교실

Cytoprotective Effects of *Radix Curcumae Aromatica*e in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Eun A Seo, Hun Taeg Chung¹, Kwang Hak Ko², Kang Beom Kwon^{2*}

Department of Food and Nutrition, School of Human Environmental Science,
1: Genome Research Center for Immune Disorders, School of Medicine,
2: Department of Physiology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to validate the use of *Radix Curcumae Aromatica*e as an anti-inflammatory drug in the traditional Korean medicine, I have investigated the effect of water-soluble extract of *Radix Curcumae Aromatica*e (ECA) on the expression of inducible heme oxygenase-1 (HO-1), which has anti-inflammatory and cytoprotective effects stimulates, in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) stimulated with a high dose of pro-inflammatory tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). The extract protected dose-dependently HUVECs against TNF-α-induced apoptosis, as measured qualitatively by a nuclear staining method using the fluorescence DAPI and quantitatively by a flow cytometry using fluoresce-enhanced Annexin V antibody, and significantly increased HO-1 expression, as determined by Western blotting analysis using anti-HO-1 antibody. Blockage of HO-1 activity by a pharmacological inhibitor reversed cytoprotection afforded by the extract, and treatment with carbon monoxide, one of HO-1 metabolites, resulted in cytoprotection comparable to the extract. These results suggest that ECA may have therapeutic potential in the control of endothelial disorders caused by inflammatory cytokines.

Key words : *Radix Curcumae Aromatica*e, cytokines, tumor necrosis factor-alpha Human umbilical vein endothelial cells, Heme Oxygenase-1

서 론

鬱金(鬱金, *Radix Curcumae Aromatica*e)은 生薑科(생강과, Zingiberaceae)에 속한 다년생초본의 塊根¹⁾으로 性味는 辛 · 苦, 寒 無毒하고 心, 膽, 肝經에 歸經하며 涼血清心, 行氣解鬱, 祛瘀止痛, 利膽退黃 등의 효능으로 神志不淸, 驚癇, 癲狂, 脇痛, 痛經, 月經不調, 癥瘕積塊, 吐衄血, 濕熱黃疸 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 鬱金の 구성성분인 curcumin과 정유를 분리하여 방향성건위약, 이뇨약, 해열약, 소화제, 급만성 담낭염 치료약, 담도염약, 카타르성황달약, 담석증, 급성간염약 등에 사용되고 있다²⁻⁶⁾.

혈관염은 혈관에 염증이 발생하여 혈관내경이 좁아지고 조직의 허혈 및 괴사를 초래하는 질환으로 크기, 위치 및 형태에 관계없이 모든 혈관을 침범하여 다양한 증상을 나타낸다^{7,8)}. 면역학적 기전이 혈관염의 발병에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되며, 면역복합체의 형성과 침착 및 그에 따른 보체와 중성구의 활성화, 중성구 라이소자임 효소에 대한 항체, 항내피세포 항체, 세포면역과 육아종 형성, 감염, 종양 및 독소에 의한 혈관 손상 및 수반된 혈관 기능의 장애 등이 혈관염의 발병기전에 관여하는 것으로 사료된다⁷⁾.

대식세포, 혈관 평활근세포, T-림프구, B-림프구 등의 여러 세포들과 여기에서 분비되는 TNF-α, interleukin 등의 여러 cytokine, 성장인자 및 화학주성인자들이 복합적으로 혈관에서의 염증발생에 관여하는 것으로 보인다⁹⁻¹³⁾. 특히, TNF-α는 혈관 내피세포를 자극하여 다량의 혈관 손상을 유도하는 세포괴사를 유

* 교신저자 : 권강범, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : desson@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6917

· 접수 : 2004/09/26 · 수정 : 2004/11/01 · 채택 : 2004/11/30

발한다. 최근 연구결과에 의하면 혈관 내피세포에서 HO-1 발현은 TNF- α 에 의한 혈관세포 손상을 완화시키고 또한 혈관 내피세포의 증식을 증가시켜 혈관 염증반응을 완화시킬 수 있다¹⁴⁻¹⁷.

본 연구에서는 인체 내피세포(HUVEC)에서 鬱金 추출물(ECA, extract of Radix Curcumae Aromaticae)에 의한 유의성 있는 세포 보호효과를 얻은 바 이를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

배양배지 (RPMI 1640), antibiotic/antimycotic 및 Trypsin-EDTA 는 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl-indole)는 Molecular Probe 사 (Willow Creek Re., OR, USA)로부터 그리고 FBS (fetal bovine serum)는 U.S. Bio-Technologies 사로부터 구입하여 사용하였다. TNF- α (tumor necrosis factor- α) cytokine은 R&D (Minneapolis, MN, USA) 사로부터 구입하였고 HO-1 (heme oxygenase-1) 및 β -actin 항체는 Santa Cruz 사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. ActD (actinomycin D), sodium bicarbonate 및 기본 시약들은 Sigma 사 (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 세포배양 용기 및 튜브는 Falcon 사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인체 배꼽정맥 내피세포 (human umbilical vein endothelial cells ; HUVEC)를 Clonetics 사 (Cambrex Bio Science Rockland, USA)로부터 구입하여 10% FBS, antibiotic/antimycotic (100 U/mL penicillin, 25 μ g/mL amphotericin D, 100 μ g/mL streptomycin) 및 1.5% sodium bicarbonate가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 95% 공기, 5% CO₂, 습기가 충분한 37 °C의 대기로 배양하였다. 세포는 10 cm 배양접시에 2 × 10⁶ 개가 되도록 2~3일에 한 번씩 분주하여 배양하였다.

3. 약물 및 추출

본 연구에 사용된 鬱金은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 약제 100 g과 3차 증류수 0.9 L를 둥근바닥 플라스크에 넣고 냉각기를 부착한 다음 3시간 동안 전탕한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 상층액을 취해 회전 진공 농축기로 감압 농축하였다. 농축된 시료는 동결 건조기에서 건조한 다음 DMSO에 녹여 사용하였다.

4. 세포 생존율 분석

ECA에 의한 HUVEC의 세포 생존율을 MTT (2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 이용하여 분석하였다. 간기하면, HUVEC 세포를 96-well plate에 well당 1 × 10⁴ 개가 되도록 seeding한 다음 TNF- α /ActD 및 약제를 24 시간 처리하고 새로운 배지에 50 μ g/mL이

되도록 MTT를 첨가하여 2~4시간 동안 반응시켰다. MTT와 생존 세포로부터 생성된 보라색 불용성 formazan을 DMSO로 용해하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

5. HO 효소 활성도

HO (heme oxygenase) 효소 활성도는 배양된 세포로부터 얻은 마이크로솜을 NADPH, biliverdin reductase의 소스로서 rat liver cytosol 및 hemin을 포함하는 반응 혼합물에 첨가한 다음 빛이 차단된 37 °C incubator에서 1시간 동안 반응시키고 1 mL의 chloroform을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 추출된 bilirubin을 464 nm와 530 nm 사이의 흡광도의 차이로부터 효소 활성도를 결정하였다.

6. Western Blotting

포집된 세포를 PBS (phosphate-buffered saline)으로 세척한 다음 세포 파쇄용액 (50 mM Tris, pH 8.0, 110 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, PMSF 100 μ g/mL)으로 용혈시킨 다음 원심분리하여 단백질 용액을 얻는다. Bradford 분석 방법을 이용하여 정량한 다음 60 μ g을 취하여 동량의 sample buffer (125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 혼합한 다음 100 °C에서 5분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 변성된 단백질을 12% acrylamide gel에서 전기영동을 수행한 다음 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia 사)으로 전위시키고 5% skim milk/TBS-T로 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. HO-1 및 β -actin에 대한 1차 항체 (primary antibody)를 3% skim milk/TBS-T에서 1:1,000으로 희석하여 membrane과 상온에서 1시간 30분 동안 반응시키고 세척한 다음 anti-goat IgG conjugated Horseradish peroxidase 이차 항체 (secondary antibody)를 1% skim milk/TBS-T에서 1:5,000으로 희석하여 membrane과 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. TBS-T로 세척한 다음 ECL reagent (ECL, Amersham, Buckinghamshire, England)로 발색시킨 다음 X-ray film에 감광시키는 방법으로 분석하였다.

7. 유세포 분석

아플토티스에 있는 세포의 수를 측정하기 위하여 FACS vantage flow cytometer와 CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하였다. 처리된 세포를 2% paraformaldehyde로 37 °C에서 10분 동안 incubation 하여 고정시킨 다음 PBS로 세척하고 propidium iodide (PI)/NP40으로 세포의 DNA를 염색하였다. 염색된 세포를 다시 PBS로 세척한 다음 flow cytometer로 분석하였다.

8. DAPI를 이용한 세포염색

HUVEC 세포를 well 당 1 × 10⁵ 개가 되도록 계속하여 4-well에 seeding한 다음 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 배양한다. 자극 처리 후 70% Ethanol로 세포를 고정한

다음 PBS로 세척하고 DAPI를 처리하여 상온에서 10분 동안 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 다시 PBS로 세척한 다음 형광 현미경을 이용하여 조사하였다(PALM, Microlaser Technologies, Bernried, Germany).

9. 통계분석

실험 결과는 mean ± S.D.로 표시하였으며 유의성 검정은 student's t-test에 의하였으며 p 값이 0.01 이하인 것만 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. ECA의 혈관세포 보호 효과

HUVEC 세포에서 鬱金 물 추출물(ECA)의 세포독성을 조사해 보았지만 농도 200 µg/mL에서 어떠한 세포독성 효과도 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 대표적인 세포독성 물질 TNF-α 과량 처리결과 혈관내피세포의 세포고사가 관찰되었다(Fig. 1). TNF-α에 의한 세포고사 효과는 ECA의 전처리에 의해 감소되었다(Fig. 1). 이러한 실험결과로부터 ECA는 세포고사 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

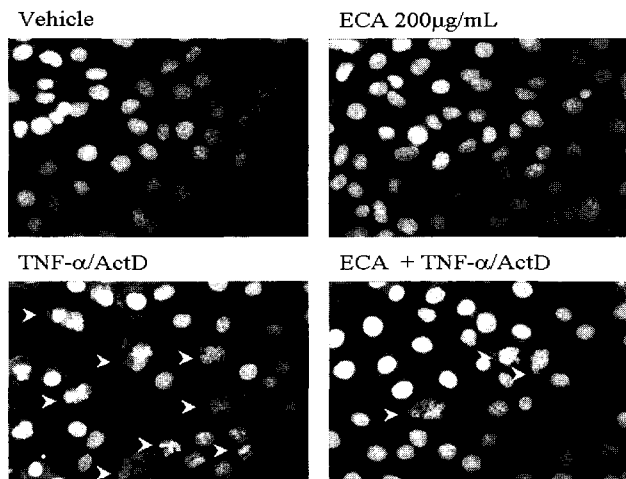


Fig. 1. Cytoprotective effects of ECA on HUVEC cells. The cells were cultured for 24 h in the absence or presence of ECA (200 µg/mL). After 24-h treatment, the cells were treated for 8 h with 200 ng/mL of TNF-α plus 1 µg/mL of ActD, stained with DAPI, and then examined under a fluorescence microscope. Apoptotic nuclei (arrow heads) were observed in the cells treated with TNF-α/ActD. A significant decrease in apoptotic nuclei was found when the cells were pre-incubated with ECA. Similar results were observed in three independent experiments.

2. ECA가 HO-1 발현에 미치는 효과

ECA를 농도별로 HUVEC 세포에 24 시간 처리한 다음 HO-1 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. Fig. 2A에 보인 결과와 같이 ECA는 HO-1 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 최대 HO-1 발현은 ECA 농도 200 µg/mL에서 발견되었다. HO-1 발현에 기인하는 HO 활성 또한 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2B). ECA에 의한 HO-1 발현 증가 효과는 ECA 처리시간에 영향을 받고, 최대 HO-1 발현 증가 효과는 24 시간 ECA 처리에 의해 관찰되었다(Fig. 3A). 최대 HO 활성 역시 ECA 처리 24 시간 후에 관찰되었으며, 48 시간 후에 감소하였다(Fig. 3B).

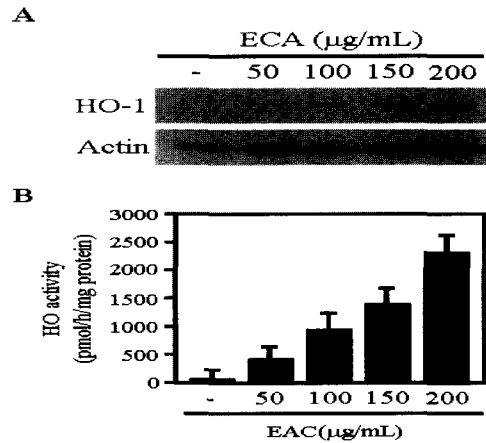


Fig. 2. Effects of ECA on HO-1 expression in HUVEC cells. The cells were treated for 24 h with either PBS or ECA at the concentrations ranging from 50 µg/mL to 200 µg/mL. HO-1 expression (A) and HO activity (B) were determined by Western blot analysis and by measuring synthesized bilirubin content, respectively. Values are the mean ± S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

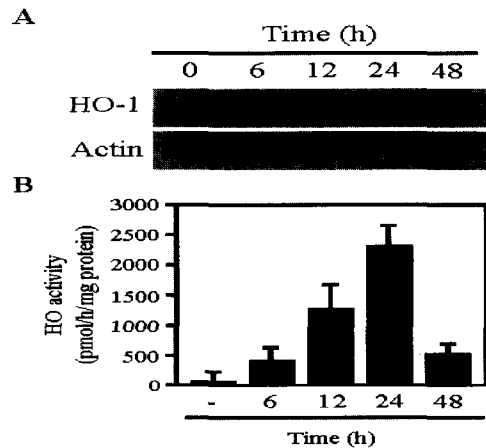


Fig. 3. Effects of ECA treatment on HO-1 expression in HUVEC cells. The cells were treated for indicated times with either PBS or ECA at 200 µg/mL. HO-1 expression (A) and HO activity (B) were determined by Western blot analysis and by measuring synthesized bilirubin content, respectively. Values are the mean ± S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

3. ECA가 TNF-α 유도 세포고사에 미치는 효과

ECA를 농도별로 HUVEC 세포에 24 시간 전처리한 다음 8 시간 TNF-α/ActD로 자극하여 세포 생존율 및 세포고사 정도를 MTT 및 FACS 분석법으로 각각 조사하였다. Fig. 4A에 보인 결과와 같이 ECA는 TNF-α/ActD 자극에 의한 세포생존율 감소를 농도 의존적으로 억제시켰다. Fig. 4B는 ECA에 의한 세포고사 억제 효과를 보인 것으로, ECA는 TNF-α/ActD에 의한 세포고사를 농도 의존적으로 억제시켰다.

4. ECA 유도 HO-1이 혈관 내피세포 세포고사에 미치는 효과

ECA에 의한 HO-1 발현 증가가 TNF-α/ActD 유도 세포고사에 어떤 영향을 주는지 조사하였다(Fig. 5). SnPP는 HO 활성 억제제로 ECA에 의한 세포고사 억제 효과를 역전시켰다. CoPP는 HO-1 발현 유도제로 ECA와 동일한 세포고사 억제 효과를 보였다. 또한, HO-1 대사물질인 CO 역시 ECA와 동일한 세포고사 억제 효과를 보였다.

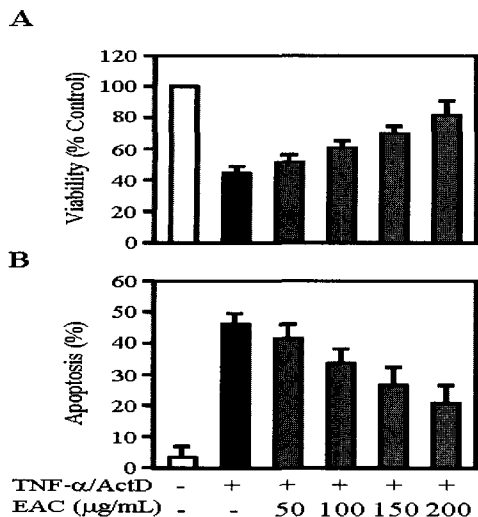


Fig. 4. Effects of ECA on viability and apoptosis of HUVEC cells. The cells were pre-treated for 24 h with either PBS or ECA at the concentrations ranging from 50 μ g/mL to 200 μ g/mL, and then stimulated for 8 h with 200 ng/mL of TNF- α plus 1 μ g/mL of ActD. The viability and apoptosis were measured by determining reduced MTT content (A) and by calculating Annexin V-positive cells using FACS (B), respectively. Values are the mean \pm S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

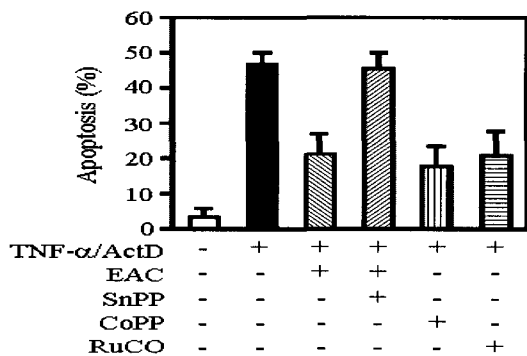


Fig. 5. Effects of EAC-induced HO-1 on apoptosis of HUVEC cells. The cells were pre-treated for 24 h with PBS, 10 μ g/mL of CoPP, 10 μ g/mL of RuCO, or 200 μ g/mL of EAC in the absence or presence of SnPP (10 μ g/mL), and then stimulated for 8 h with 200 ng/mL of TNF- α plus 1 μ g/mL of ActD. Apoptosis were measured by determining Annexin V-positive cells using FACS. Values are the mean \pm S.E. of duplicate determinations from three separated experiments.

고찰 및 결론

鬱金은 涼血清心, 行氣解鬱, 祛瘀止痛, 利膽退黃 등의 효능으로 神志不清, 驚癇, 癲狂, 脇痛, 痛經, 月經不調, 癥瘕積塊, 吐血衄血, 濕熱黃疸 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있으며¹⁾ 실험적으로 구강암²⁾, gastrin 수용체³⁾, 신경세포 독성⁴⁾, 만성 간질환⁵⁾, 담즙 분비⁶⁾에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는鬱金の 사이토카인에 의한 혈관내피세포 독성에 대한 보호 효과와 그 기전을 연구하였다.

혈관염은 혈관에 염증이 발생하여 혈관내경이 좁아지고 조직의 허혈 및 괴사를 초래하는 질환으로 대식세포, 혈관 평활근 세포, T-림프구, B-림프구 등의 여러 세포들과 여기에서 분비되는 TNF- α , interleukin 등의 여러 cytokine, 여러 성장인자, 화학주성인자들이 복합적으로 혈관에서의 염증발생에 관여하는 것으로 보인다⁷⁻¹³⁾. 특히, TNF- α 는 혈관 내피세포를 자극하여 다량의

혈관 손상을 유도하는 세포괴사를 유발한다. Fig. 1과 Fig. 4에서 나타났듯이鬱金 추출물은 TNF- α 에 의한 혈관내피세포 괴사를 유의하게 방어하였다. 이러한 결과는鬱金 추출물의 혈관염에 대한 항염증 효과를 시사한다 하겠다. 대부분 혈관염 치료는 충분한 용량의 스테로이드 호르몬 제제를 사용하는 것이 원칙이며, 임상 및 검사 소견에 따라 점차 용량을 줄여 나가게 된다. 스테로이드의 사용 기간이나 부작용을 줄이기 위하여, 염증성 cytokine에 의한 혈관 내피세포의 손상을 차단시킬 수 있는 여러 가지 제제들이 병합 투여되기도 한다. 최근 연구결과에 의하면 혈관 내피세포에서 HO-1 발현은 TNF- α 에 의한 혈관세포 손상을 완화시키고 또한 혈관 내피세포의 증식을 증가시켜 혈관 염증반응을 완화시킬 수 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. HO-1은 염증성 heme을 분해하여 철, bilirubin 및 CO를 생성한다. 최근 연구에 의하면 CO는 TNF- α 에 의한 혈관 내피세포의 손상을 억제시킨다. HO-1 발현은 유전자 수준에서 조절되며, 이 유전자가 결여된 인간 또는 실험동물은 혈관염 및 과다 염증질환에 의해 장기간 생존하지 못한다. 일부 혈관염 치료제는 이 유전자의 발현을 효과적으로 유도하여 치료 효과를 나타낸다¹⁸⁻²²⁾. HO-1 (heme oxygenase-1)은 스트레스 유발성 효소로서 heme의 산화반응에 관여하여 생물학적으로 활성이 있는 분자들, CO (carbon monoxide), 철 및 bilirubin을 생성시킨다. HO-1은 염증반응의 조절, 산화적 스트레스의 완화 혹은 내피세포 아포토시스의 억제 등의 방법으로 세포 보존적 역할을 하고 있다. 최근 연구 결과에 의하면 HO-1의 생성물 중 CO는 TNF- α 에 의한 혈관 내피세포의 손상을 억제시킨다. HO-1 발현은 유전자 수준에서 조절될 수 있으며, 이 유전자가 결여된 인간 또는 실험동물은 혈관 내 염증 및 과다한 염증질환에 의해 장기간 생존할 수 없게 된다. 일부의 혈관 염증질환 치료제는 위와 같은 유전자의 발현을 효과적으로 유도하여 치료 효과를 나타낸다¹⁸⁻²⁵⁾.鬱金 추출물을 혈관내피세포에 처리했을 경우 HO-1 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2, Fig. 3, Fig. 5). 이런 결과로鬱金 추출물의 TNF- α 에 의한 혈관 내피세포 독성에 대한 방어효과 기전에 HO-1 단백질의 발현이 관여함을 시사한다 하겠다.

본 실험 결과에 의하면鬱金 물 추출물은 TNF- α 에 의한 혈관 내피세포의 세포괴사를 효과적으로 억제시켰으며鬱金の 이러한 세포괴사 억제 효과는鬱金에 의해 발현된 HO-1과 관련이 있었다.

참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울. 남산당. pp.473-474, 1997.
2. Zhang WX, Hu HF, Li WG, Zhou ZT. Intercepting effects of seven Chinese herb drugs on experimental oral carcinogenesis. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 13(1):34-37, 2004.
3. Xiao X, Zhao Y, Yuan H, Xia W, Zhao J, Wang X. Study on the effect of Rhizoma Curcuma Longa on gastrin receptor. Zhong Yao Cai. 25(3):184-185, 2002.
4. Irie Y, Keung WM. Rhizoma acori graminei and its active

- principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide. *Brain Res.* 963(1-2):282-289, 2003.
5. Xie F, Li X, Sun K, Chu Y, Cao H, Chen N, Wang W, Liu M, Liu W, Mao D. An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage. *J Tradit Chin Med.* 21(3):225-231, 2001.
 6. Matzkies F, Webs B. Effect of a plant extract combination preparation on gastrointestinal transit time and bile acid excretion. *Fortschr Med., German.* 101(27-28):1304-1306, 1983.
 7. Tay SS, McCormack A, Rose ML. Effect of cognate human CD4+ T cell and endothelial cell interactions upon chemokine production. *Transplantation.* 78(7):987-994, 2004.
 8. Uzel G, Pachman LM. Cytokines in juvenile dermatomyositis pathophysiology: potential and challenge. *Curr Opin Rheumatol.* 15(6):691-697, 2003 .
 9. Alessandri G, Fiorentini S, Licenziati S, Bonafede M, Monini P, Ensoli B, Caruso A. CD8(+)/CD28(-) T lymphocytes from HIV-1-infected patients secrete factors that induce endothelial cell proliferation and acquisition of Kaposi's sarcoma cell features. *J Interferon Cytokine Res.* 23(9):523-531, 2003.
 10. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 99(8):2913-2921, 2002.
 11. Sireci G, Dieli F, Salerno A. T cells recognize an immunodominant epitope of heat shock protein 65 in Kawasaki disease. *Mol Med.* 6(7):581-590, 2000.
 12. Munakata Y, Iwata S, Dobers J, Ishii T, Nori M, Tanaka H, Morimoto C. Novel in vitro effects of bucillamine: inhibitory effects on proinflammatory cytokine production and transendothelial migration of T cells. *Arthritis Rheum.* 43(7):1616-1623, 2000.
 13. Ascherl G, Hohenadl C, Schatz O, Shumay E, Bogner J, Eckhart L, Tschachler E, Monini P, Ensoli B, Sturzl M. Infection with human immunodeficiency virus-1 increases expression of vascular endothelial cell growth factor in T cells: implications for acquired immunodeficiency syndrome-associated vasculopathy. *Blood.* 93(12):4232-4241, 1999.
 14. Amberger A, Hala M, Saurwein-Teissl M, Metzler B, Grubeck-Loebenstein B, Xu Q, Wick G. Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins. *Mol Med.* 5(2):117-128, 1999.
 15. Oliver SJ, Cheng TP, Banquerigo ML, Brahn E. Suppression of collagen-induced arthritis by an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, in combination with cyclosporin: reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cell Immunol.* 166(2):196-206, 1995.
 16. Gamble JR, Vadas MA. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol.* 146(4):1149-1154, 1991.
 17. Suzuki H, Akama T, Okane M, Kono I, Matsui Y, Yamane K, Kashiwagi H. Interleukin-1-inhibitory IgG in sera from some patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32(12):1528-1538, 1989.
 18. Sass G, Seyfried S, Parreira Soares M, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, Tiegs G. Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology.* 40(5):1128-1135, 2004.
 19. Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol.* 172(6):3553-3563, 2004.
 20. Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology.* 38(4):909-918, 2003.
 21. Song Y, Shi Y, Ao LH, Harken AH, Meng XZ. TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta. *World J Gastroenterol.* 9(8):1799-1803, 2003.
 22. Oh GS, Pae HO, Moon MK, Choi BM, Yun YG, Rim JS, Chung HT. Pentoxifylline protects L929 fibroblasts from TNF-alpha toxicity via the induction of heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 302(1):109-113, 2003.
 23. Panahian N, Maines MD. Site of injury-directed induction of heme oxygenase-1 and -2 in experimental spinal cord injury : differential functions in neuronal defense mechanisms. *J Neurochem.* 76(2):539-554, 2001.
 24. Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278(2):L312-319, 2000.
 25. Takahashi K, Nakayama M, Takeda K, Fujia H, Shibahara S. Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon-gamma in human glioblastoma cells. *J Neurochem.* 72(6):2356-2361, 1999.