

마우스 염증성 장 질환 모델에서 G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor)에 의한 염증 완화

¹경북대학교 의과대학 생리학교실, ²원광대학교 의과대학 해부학교실, ³전북대학교 의과대학 소화기내과

최은영¹ · 전창덕¹ · 오재민² · 김유림² · 이수택³ · 김상욱³

Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) Attenuates 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-induced Colitis in Mice

Eun-Young Choi¹, Chang-Duk Jun¹, Jae-Min Oh², Yu-Rim Kim², Soo-Teik Lee³ and Sang-Wook Kim³

¹Department of Physiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, ²Department of Anatomy, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, ³Department of Internal Medicine, Chonbuk National University School of Medicine, Jeonju, Korea

ABSTRACT

Background: Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) is known as a cytokine central to the hematopoiesis of blood cells and to modulate their cellular functions. Besides granulocytes and their precursors, monocytes/macrophages and endothelial cells are direct target cells of G-CSF action. G-CSF influences immune cells in an anti-inflammatory way. **Methods:** To evaluate whether G-CSF has a potential for preventing or ameliorating diseases characterized by mucosal inflammation, we used a mouse model with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced inflammatory colitis. To the mice model G-CSF was administrated daily by intraperitoneal injection. Macroscopic evaluation and immunohistochemical analysis of colonic tissues were performed. **Results:** Recombinant human G-CSF significantly inhibited LPS-induced TNF- α mRNA expression in THP-1 cells. As for *in vivo* relevance, G-CSF dramatically reduced the weight loss of mice, colonic damage, and mucosal ulceration that characterize TNBS colitis. Moreover, G-CSF suppressed the expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and intercellular adhesion molecule-1 in TNBS colitis. **Conclusion:** Current results demonstrate that G-CSF may be an effective agent for the treatment of diseases characterized by mucosal inflammation. (**Immune Network 2006;6(1):13-19**)

Key Words: G-CSF, inflammatory bowel diseases, inflammation, TNBS

서 론

만성 염증성 장 질환(예, 크론씨 병 및 궤양성 대장염, 이하 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases, IBD)

책임저자 : 김상욱, 전북대학교 의과대학 내과학교실
☎ 561-756, 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14번지
Tel: 063-420-4815, Fax: 063-425-6778
E-mail: clickm@chonbuk.ac.kr

본 연구는 한국학술진흥재단의 지역대학우수과학자 지원연구 (R05-2004-000-11388-0)에 의해 수행되었음.

이라 칭함)은 특히 선진국에서 발병하는 심각한 공중 보건문제 중 하나이다. 현재까지 IBD는 점막 염증을 보이고, 유전적 및 환경적 영향을 받으며 면역학적 이상에 의해 발병하는 특성을 갖는 다양한 군의 질환이라고 널리 이해되고 있다(1,2). 여러 동물 모델의 개발과 면역학적 연구 기술의 발전으로 IBD는 비특이적인 염증 반응의 증폭과 면역 조절의 결함으로 장에서의 염증이 영속화되어 조직 손상과 특징적인 임상 증상을 반복적으로 보이는 질환으로 여겨지고 있다. 따라서 IBD를 치료하는 방법은 면역 및 염증성 경로를 따라 여러 부위에서

접근하고 있다. 예를 들면, 항염증성 제제 및 스테로이드 계열의 면역 억제제 등이 사용되고 있다(3,4). 그러나 많은 면역 억제제 등은 IBD 환자 치료 중 과립구 감소증을 보이는 등의 부작용을 동반할 수 있기 때문에 최근의 몇몇 보고에 의하면, IBD 유사 질환 치료에서 과립구 회복을 위한 과립구 집락 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)의 투여가 고려되고 있다(5,6).

G-CSF는 조혈세포 자극 사이토카인으로서, 골수이식이나 항암치료 후 약제로 인한 중성구의 감소 시 임상적으로 사용되고 있으며 세포의 탐식기능이나 항체 의존성 세포매개 독성(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity)을 항진시킨다(7-9). G-CSF는 세포 표면에 발현되는 특이수용체인 G-CSF 수용체를 통해 생물학적 기능을 나타내는데 G-CSF 수용체는 주로 중성구에서 발현되나 단핵구, 혈소판, 내피세포, 최근에는 림프구에서도 발현되는 것으로 알려져 있다(10-13). 더 나아가, 이러한 특이적 수용체를 통한 G-CSF의 항염증성 반응이 보고되고 있다. 예를 들면, 패혈성 쇼크(septic shock)를 유발한 마우스에 G-CSF를 투여함으로써 LPS로 유도된 독성을 감소시키고(14), *in vitro* 실험에서 사람 중성구 및 단핵구에서 G-CSF를 전처리 시 LPS로 유도된 TNF- α , IL-1 β , INF- μ 및 IL-12와 같은 염증성 사이토카인 분비의 감소를 볼 수 있었다(12).

따라서, 본 연구에서는 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)로 유도한 마우스 IBD 모델에서 G-CSF가 항염증 작용을 나타내는지 알아보기하고자 하였다. Microarray 실험을 통한 예비실험에서 IBD 환자의 말초혈액에서 G-CSF 수용체의 발현이 정상인에서보다 증가된 것을 확인한 바, TNBS로 유도한 마우스 IBD 모델에 G-CSF를 공급함으로써 IBD 예방 및 치료 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양. 사람의 단핵구 세포주인 THP-1 세포는 ATCC에서 분양 받아 사용하였으며, CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 소 태아혈청(10%), 페니실린 G (100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 mg/ml), 그리고 L-글루타민(2 mM)을 첨가한 RPMI 배지에서 배양하였다. 대수 증식기(log phase)에 해당하는 세포를 6-well에 분주하여 사용하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR. 6-well plate에서 키운 사람의 단핵구 세포주에 자극원을 처리하여 시간별로 배양시킨 후 easy-Blue™ (Intron Co., Korea)를 이용해 제조자의 방법에 따라 total RNA를 분리해 사용하였다. AccuPower RT premix (Bioneer Co., Korea)를 이용해 역전사 반응을 시켜 cDNA를 얻어내었고, 20 μ l의 cDNA 산물 중 2~5 μ l를 template로 하여, TNF- α 의 발현은 5'-AGA GGG

AAG AGT TCC CCA GGG AC-3' (sense)와 5'-TGA GTC GGT CAC CCT TCT CCA G-3' (antisense)를 이용하여(15), 그리고 GAPDH의 발현은 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGGTCG TAT-3' (sense)와 5'-AGC TTC TCC ATG GTG GTG AAG AC-3' (antisense)를 이용하여 확인하였다. PCR 온도 조건은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), 그리고 extension (72°C, 30초)으로 하여 25회 실시하였다. 예상 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여, EtBr로 염색하여 각각 그 크기를 확인하였다; 491 bp (TNF- α), 306 bp (GAPDH).

마우스 IBD 실험모델 구현. 6~8주령의 BALB/c 마우스를 구입(Damul Inc., Korea)하여, 하룻밤 동안 절식시킨 후, pentobarbital sodium (70 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시켰다. 대장염을 유발시키기 위하여, 50% 에탄올에 2 mg (100 mg/kg) TNBS (Sigma, St.Louis, CA)를 2회(7일 간격으로 2회 공급) 직장 투여하였으며, 항문으로부터 3.5 cm에 폴리에틸렌 재질의 cannula (intermedic PE-20 tubing, Becton Dickinson, San Jose, CA) 장착된 1 ml 주사기를 이용하였다. 마우스를 60초간 거꾸로 세운 다음 케이지에 두었다. 정상 대조군의 동물도 50% (vol/vol) 에탄올 단독 투여한 것을 제외하고는 이와 유사하게 처리하였다. 첫 번째 TNBS 투여한 지 9일 후(즉, 두 번째 TNBS 투여한 지 48시간 후), 각각의 마우스를 희생시켰다. 한편, G-CSF (Neutrogin, Choongwae Pharm. Co., Korea)의 효과를 조사하기 위하여, 마우스에 G-CSF (250 μ g/kg)를 첫 번째 TNBS 투여하기 하루 전부터 매일 복강 주사하여 공급하였다.

장 손상의 육안 및 조직학적 평가. 상기한 바와 같이, 마우스를 첫 번째 TNBS를 투여한 지 9일째, 각 군에서 3마리씩 무작위로 추출하여 희생시켰다. 각각의 대장을 이전에 기술한 바와 같이 반정량적(semi-quantitative) 점수 시스템에 의하여 평가하였다(16). 대장을 제거하여 무게를 잰 다음, 각 대장으로부터 멀리 떨어진 부분에서 2개의 조직 샘플을 잘라내었다. 이 조직 샘플을 상기한 바와 같이 파라핀으로 포매시켰다. 조직 단편을 마이크로톰을 이용하여 5 mm 간격으로 얇게 자른 다음, 슬라이드 위에 탑재시켜 H&E 염색을 하였다. 광학 현미경을 이용하여 이전에 기술한 분류법에 따라 blind test를 시행하여 조직학적 평가를 하였다(16).

조직학적 및 면역 조직화학 분석. 조직학적 분석을 위하여, 조직을 10% 포르말린으로 고정시킨 다음 파라핀으로 포매한 조직 단편을 표준화된 방법으로 H&E 염색하였다. 면역 조직화학 분석을 위하여, 먼저 조직 단편을 PBS에 희석된 1% 과산화수소로 20분간 처리하여 내재성 과산화효소 활성을 중화시켰다. 항원 회복(antigen retrieval)을 위하여 조직 단편이 있는 슬라이드를 10 mM 구연산 완충용액(pH 6.0)이 담긴 폴리에틸렌 chamber에

잠기게 하여 전자레인지에서 10분간 가열한 다음 10~20분간 식혔다. PBS로 3회 수세한 후, 단편을 10% 염소 혈청으로 blocking하여 비특이적 IgG 결합을 막았다. 각각의 조직 단편은 1차 항체(TNF- α , IL-1 β 및 ICAM-1, PEPROTECH Inc. Rocky Hill, NJ)으로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3회 수세하고, 2차 항체(anti-rabbit biotinylated antibody)로 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 슬라이드를 ABS 시약(Vectastain)으로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

결 과

단핵구에서 LPS에 의해 유도된 TNF- α mRNA에 대한 G-CSF의 저해 효과. 먼저, *in vitro*에서 G-CSF가 항염증 효과를 보이는 지를 알아보기 위하여, 염증세포인 단핵구에 지질 다당체인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 염증성 사이토카인의 발현을 유도하였으며 이때 G-CSF의 전처리가 LPS에 의해 유도되어지는 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현을 억제하는지를 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, LPS로 자극한 THP-1세포에서 TNF- α mRNA의 발현이 시간에 특이적으로 증가하였으나, G-CSF를 전처리한 경우에는 TNF- α 의 발현이 유의하게 억제됨을 알 수 있었다. GAPDH 유전자의 mRNA 수준에서 변화가 없음을 확인하였으므로, 이러한 결과는 G-CSF가 단핵구에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

TNBS에 의해 유도된 마우스 colitis에서 G-CSF 효과 검증. G-CSF의 상기 언급한 바와 같이 *in vitro*에서 LPS로 유도된 TNF- α 의 생성을 억제하였으므로, 실제로 *in*

*vivo*에서 대장염에 대한 항염증 효과를 발휘할 수 있는지 알아보기 위하여, 마우스에 TNBS를 7일 간격으로 2회 직장 투여함으로써 colitis를 유발시켰다. 50% 에탄올에 녹인 TNBS를 처리한 마우스는 첫 번째 TNBS를 처리한 지 9일째에 과도한 소모성 질환에 동반되는 직장 탈수 및 심각한 혈변, 설사를 보였다. 이와는 반대로, Fig. 2 및 3에서 보는 바와 같이, G-CSF (250 μ g/kg)를 공급한 마우스는 TNBS만을 투여한 마우스보다 임상적, 육안 (macroscopic) 확인 및 현미경적 분석뿐 아니라, 체중 변화를 측정하였을 때 소모성 질환의 뚜렷한 개선효과를 보였다.

TNBS에 의한 colitis의 가장 두드러진 특징은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 빠른 체중감소이다. 50% 에탄올만을 투여한 대조군 마우스는 대장염을 일으키지 않았고 건

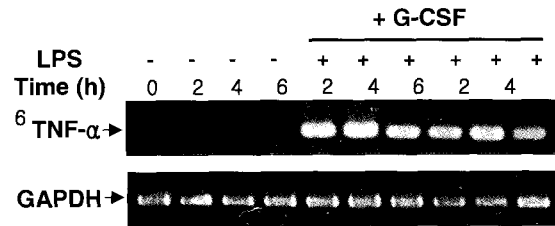


Figure 1. G-CSF inhibits the expression of TNF- α induced by LPS. THP-1 cells (5×10^5 /ml) were pretreated with G-CSF (500 ng/ml) for 1 h, and then the cells were further incubated for 16 h with LPS (10 μ g/ml). Levels of TNF- α mRNA were determined by RT-PCR. This is a representative of three separate experiments.

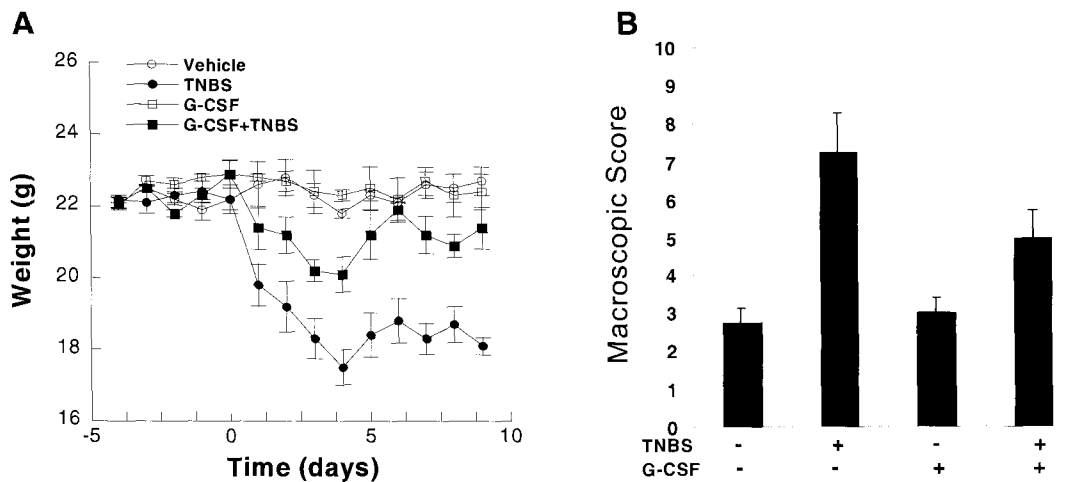


Figure 2. G-CSF ameliorates the clinical and macroscopic features of TNBS-induced colitis. Colitis was induced by rectal administration of 2 doses (separated by a 7-day interval) of TNBS in 50% ethanol. Mice treated with 50% ethanol alone were used as controls. G-CSF (250 μ g/kg) was injected intraperitoneally everyday 1 day (-1) before and after TNBS administration. All mice were sacrificed on day 9 after the first TNBS administration, and the clinical evaluation and severity were monitored by mouse weight changes. Each point represents the mean \pm SD from 5 separate experiments (5 mice/group/experiment).

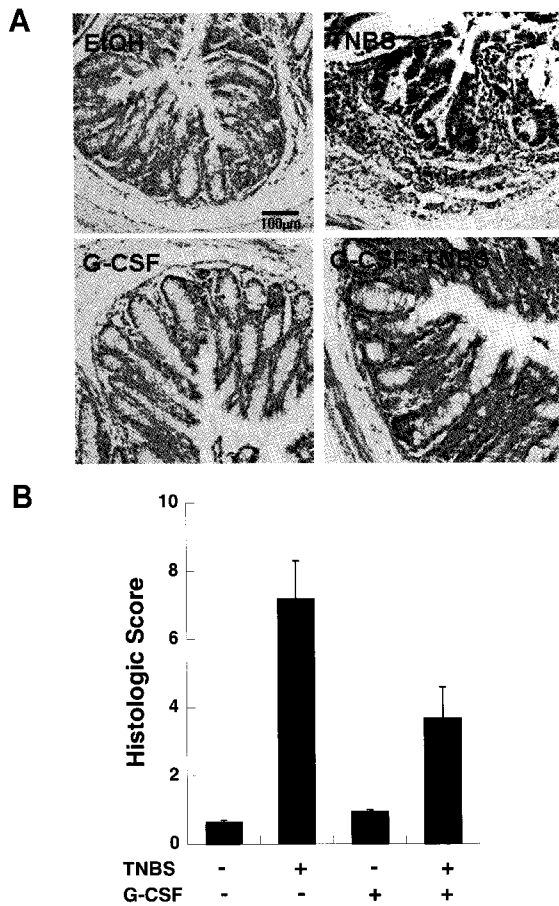


Figure 3. G-CSF ameliorates the histopathologic features of TNBS-induced colitis. The histopathologic signs were further estimated with the mice described in Figure 4. Photomicrographs of colon sections after treatment with ethanol, TNBS, G-CSF, and G-CSF+TNBS, on day 9 after the induction of colitis with TNBS are shown (original magnification 100×) (A). Histopathologic scoring is shown (B). Results are the mean±SD from 5 mice per group.

강한 외형을 보였다. 그러나 G-CSF를 공급한 마우스는 TNBS 투여로 감소된 체중을 유의하게 회복하는 것을 확인하였다(Fig. 2). TNBS를 투여한 지 9일째에 대장을 제거하여 육안으로 확인한 결과, 에탄올만을 투여한 대조군 마우스에 비하여 충혈(hyperemia), 괴사 및 염증이 두드러진 것을 확인하였다(data not shown). 한편, 조직병리학적 분석으로 TNBS에 의해 대장염이 생긴 마우스의 대장 절편에서, 만성 염증의 주요 소견으로서 상당한 면역세포의 침윤을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 반면, G-CSF를 공급한 마우스에서는 그렇지 않은 마우스에서보다 점막 및 점막하(submucosa)의 조직학적 소견을 회복함으로써 상기한 소견을 개선시킴을 알 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 G-CSF가 마우스의 대장염을 증상 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

G-CSF 투여로 염증성 단백질의 발현에 미치는 효과.

IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)은 IBD 환자의 장 조직에서 증가되어 있으며, 점막 염증의 병리에 있어서 중요한 역할을 한다(17). TNBS로 유도한 대장염에 대한 G-CSF의 경감 효과가 대장 점막조직에서 염증 관련 단백질의 발현을 저해하는 것과 관련한지를 조사하기 위하여, TNBS로 대장염을 유도한 마우스에게 G-CSF를 공급한 군과 그렇지 않은 군에서 면역 조직화학 염색을 시행하였다. TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 전염증성 사이토카인과 염증세포의 이동에 주된 역할을 하는 세포 부착분자인 ICAM-1의 발현에 차이가 있는지를 알아보았다. 첫 번째 TNBS를 투여한 지 9일째에, TNBS 단독만 투여한 마우스에서보다 G-CSF를 공급한 군의 조직 절편에서 상기한 단백질 모두의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 따라서, 이러한 결과는 G-CSF가 대장염 발병 시 증가된 염증성 단백질의 발현을 효과적으로 감소시킴으로써 IBD를 예방 및 치료할 수 있음을 암시해 준다.

고 찰

본 연구에서는 TNBS를 이용하여 대장염을 일으킨 마우스 모델에서 G-CSF가 체중 감소, 대장 손상 및 염증을 효과적으로 완화시킬 수 있다는 것을 보여준다. 또한, G-CSF가 TNBS에 의해 증가된 염증성 사이토카인 및 세포 부착분자를 억제할 수 있음을 보여준다. G-CSF는 주로 과립구의 생성, 생존, 분화 및 염증을 조절하는 사이토카인으로 알려져 있고(18-20), G-CSF 수용체를 통하여 특이적 기능을 발휘한다. 이러한 G-CSF 수용체는 과립구에 국한하지 않고 단핵구, 림프구 및 내피세포 등에서의 발현이 보고되고 있다(11-13). 이는 G-CSF가 과립구 외에 다른 염증세포의 기능에 직접적으로 혹은 간접적으로 관여할 수 있음을 설명해 준다. G-CSF는 특히, 단핵구 기능에 대하여 IL-1 β , TNF- α , IL-12 및 IL-18 등의 전염증성 사이토카인의 생성을 감소시킴으로써 항염증 반응을 나타낸다(12). 최근의 보고에서, 사람의 단핵구에서 G-CSF가 IL-10과 비슷하게 전사활성인자인 STAT3를 선택적으로 활성화시킴으로써 LPS로 유도된 TNF- α 의 생성을 억제하고, 이러한 G-CSF의 면역조절 기능은 G-CSF가 단핵구 기능에 직접적인 효과를 어느 정도 발휘할 수 있음을 제시하였다(21). 본 연구에서도 단핵구에서 LPS에 의하여 TNF- α 가 시간별로 생성이 증가된 것을 G-CSF로 전처리 시 뚜렷하게 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

G-CSF가 염증성 사이토카인의 생성을 줄이는 것을 확인하였기 때문에, 본 연구자는 TNBS로 대장염을 유도시킨 마우스에서 G-CSF의 기능을 평가하고자 하였다. 기존에 G-CSF가 항 염증적으로 작용하는 예는 여러 동물

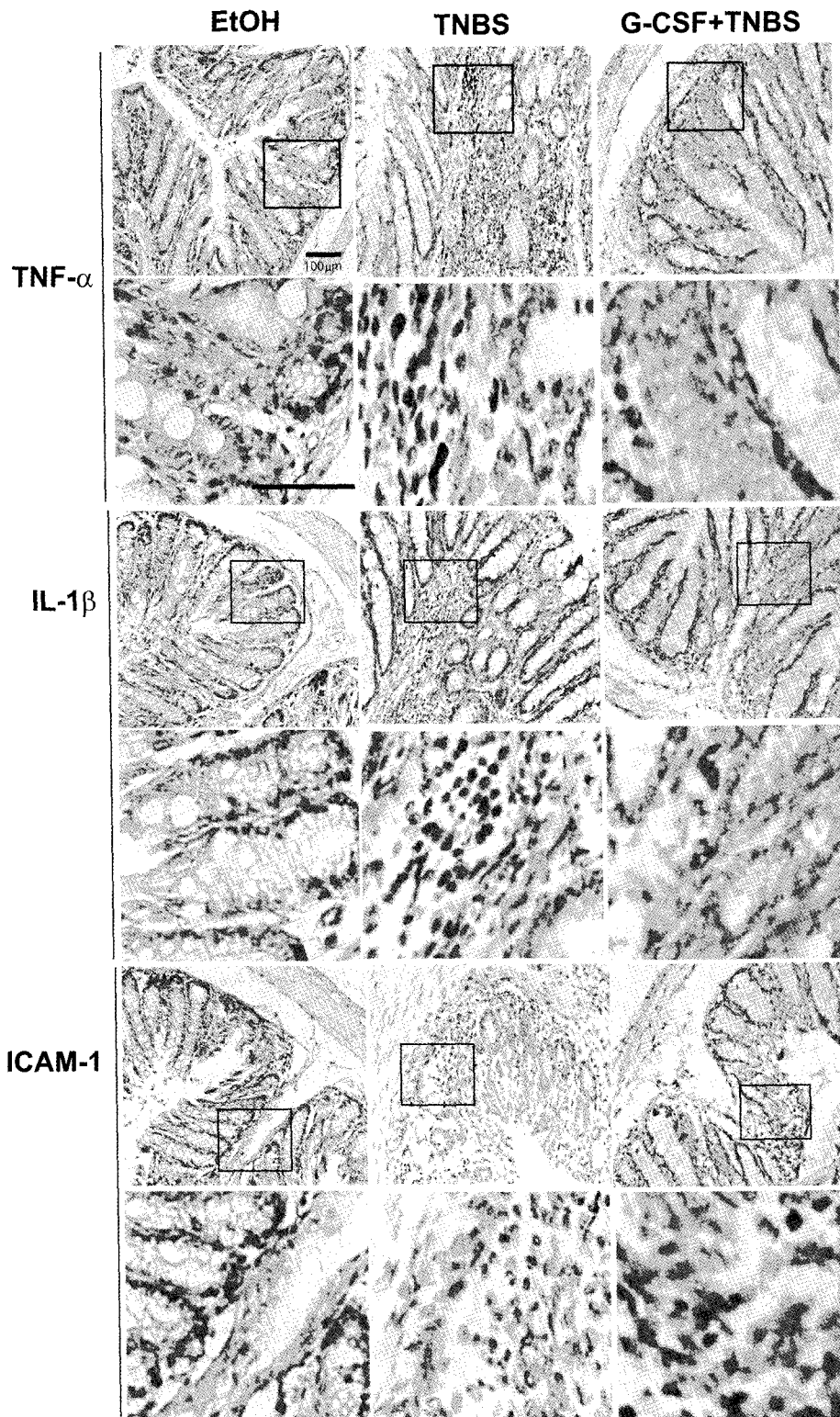


Figure 4. G-CSF reduces the expression of TNF- α , IL-1 β , and ICAM-1 in colonic mucosa of TNBS colitis. Tissue sections from experimental groups (control group, TNBS- and/or G-CSF-treated groups) were incubated with primary antibodies (α -TNF- α , α -IL-1 β , and α -ICAM-1). The slides were then incubated with anti-rabbit biotinylated secondary antibody and colorized by ABS/hematoxylin (original magnification $\times 100$).

모델을 이용한 실험에서도 증명이 되었다. 예를 들면, 랫트에서 LPS로 유도된 독성을 G-CSF가 전신성 TNF- α 를 억제함에 따라 예방할 수 있음을 보고하였다(14). 또한 마우스에서 LPS로 유도된 IL-18 및 IFN- γ 생성을 G-CSF

전처리로 감소시켰다(22). 또 다른 보고에 따르면, 마우스에서 G-CSF 전처리 시 LPS로 유도되는 IL-10 및 monocyte chemoattractant protein-1의 분비가 증가되는 반면, IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 분비에는 영향을 주지 않았다(23).

본 연구에서, G-CSF를 복강 주사하여 대장염이 있는 마우스에 공급하였을 때 대장염으로 인한 체중 감소를 완화시켰고, 점막 궤양 및 점막의 조직학적 소견을 유의하게 개선시키는 것을 확인하였다(Fig. 2, 3). 더 나아가, 면역 조직화학 분석 결과는 G-CSF가 TNBS로 유도한 대장염 마우스의 장 조직에서 IL-1 β , TNF- α 및 ICAM-1의 발현을 뚜렷하게 감소시킴을 보여주었다(Fig. 4). 따라서, G-CSF의 대장염에 대한 항염증 효과는 만성 대장염에서 볼 수 있는 면역세포의 침윤에 동반하는 염증성 사이토카인 및 세포부착 분자의 발현을 직접적으로 억제시킴으로써 나타나는 것이라고 사료된다. 즉, G-CSF의 조절 작용을 포함하는 생물학적 기능뿐 아니라 항염증 효과는 G-CSF 수용체를 통하여 나타나기 때문에, 염증을 보이는 장 조직의 상피세포의 염증 관련 단백질을 조절하는 것보다는 장 조직에 침윤해 있는 다른 염증세포 또는 내피세포의 염증성 사이토카인 및 관련 단백질을 제어하는 것으로 보인다. 흥미롭게도, 본 연구자의 예비 연구 결과, 궤양성 대장염 환자군(8명)과 정상 대조군(8명)에 대한 말초혈액 단핵구의 cDNA microarray의 유전자 발현을 비교하였을 때, 궤양성 대장염 환자 군에서 G-CSF 수용체의 발현이 유의하게 증가됨을 볼 수 있었다(data not shown). 이 외에도 TNBS로 유도한 마우스 대장염 모델에서, G-CSF 전처리로 Th1 세포의 IFN- γ 생성을 저해시킴으로써 항염증 효과를 나타내고, 이는 IL-4, TGF- α 및 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인 생성을 항진하는 것과는 무관하다는 보고가 있다(24). 또한, 최근 본 연구자는 활동성의 궤양성 대장염을 가진 40세 여자환자가 면역 억제제 치료의 부작용으로 인한 백혈구 감소증을 보여 G-CSF를 투여한 후, 백혈구 증가와 기대하지 않았던 치료 효과로 임상 증상의 호전을 보이는 것을 관찰하였다(data not shown).

결론적으로, 인간의 IBD를 예방, 치료하는 데 있어서 G-CSF의 항염증 효과가 기대해볼 만하다. 더 나아가, G-CSF 수용체의 발현조절 기전을 밝히는 연구가 진행되면 만성적 염증인 IBD 치료제를 개발하는 데 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Mascheretti S, Schreiber S: Genetic testing in Crohn disease: utility in individualizing patient management. *Am J Pharmacogenomics* 5;213-222, 2005
- Schmidt C, Stallmach A: Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 51;127-145, 2005
- Kim SW, Choi SC, Choi EY, Kim KS, Oh JM, Lee HJ, Oh HM, Kim S, Oh BS, Kimm KC, Lee MH, Seo GS, Kim TH, Oh HC, Woo WH, Kim YS, Pae HO, Park DS, Chung HT, Jun CD: Catalposide, a compound isolated from *Catalpa ovata*, attenuates induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduces the severity of trinitrobenzene sulfonic Acid-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* 10;564-572, 2004
- Lee HJ, Choi SC, Lee MH, Oh HM, Choi EY, Choi EJ, Yun KJ, Seo GS, Kim SW, Lee JG, Han WC, Park KI, Jun CD: Increased expression of MIP-3 α /CCL20 in peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and its down-regulation by sulfasalazine and glucocorticoid treatment. *Inflamm Bowel Dis* 11;1070-1079, 2005
- Yamaguchi T, Ihara K, Matsumoto T, Tsutsumi Y, Nomura A, Ohga S, Hara T: Inflammatory bowel disease-like colitis in glycogen storage disease type 1 β . *Inflamm Bowel Dis* 7;128-132, 2001
- Melis D, Parenti G, Della Casa R, Sibilio M, Berni Canani R, Terrin G, Cucchiara S, Andria G: Crohn's-like ileo-colitis in patients affected by glycogen storage disease Ib: two years' follow-up of patients with a wide spectrum of gastrointestinal signs. *Acta Paediatr* 92;1415-1421, 2003
- Baldwin GC, Chung GY, Kaslander C, Esmail T, Reisfeld RA, Golde DW: Colony-stimulating factor enhancement of myeloid effector cell cytotoxicity towards neuroectodermal tumour cells. *Br J Haematol* 83;545-553, 1993
- Carulli G: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on neutrophil phenotype and functions. *Haematologica* 82;606-616, 1997
- Tamamori Y, Sawada T, Nishihara T, Yamashita Y, Ohira M, Ho JJ, Kim YS, Hirakawa YS, Chung K: Granulocyte-colony stimulating factor enhances chimeric antibody Nd2 dependent cytotoxicity against pancreatic cancer mediated by polymorphonuclear neutrophils. *Int J Oncol* 21;649-654, 2002
- Shimoda K, Okamura S, Harada N, Kondo S, Okamura T, Niho Y: Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J Clin Invest* 91;1310-1313, 1993
- Bussolino F, Colotta F, Bocchietto E, Guglielmetti A, Mantovani A: Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells. *Int J Clin Lab Res* 23;8-12, 1993
- Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T: Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood* 95;270-276, 2000
- Morikawa K, Morikawa S, Nakamura M, Miyawaki T: Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *Br J Haematol* 118;296-304, 2002
- Gorgen I, Hartung T, Leist M, Niehorster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A: Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 149;918-924, 1992
- Niho Y, Niuro H, Tanaka Y, Nakashima H, Otsuka T: Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol* 99;165-170, 1998
- Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR: Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 31;539-544, 1990
- Rogler G, Andus T: Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 22;382-389, 1998
- Richards MK, Liu F, Iwasaki H, Akashi K, Link DC: Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* 102;3562-3568, 2003
- Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M: Regulation of mye-

- loid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28;509-554, 2004
20. Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ: G-CSF induced reactiveoxygen species involves Lyn-PI 3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood* Nov 10, 2005 [Epub ahead of print]
 21. Nishiki S, Hato F, Kamata N, Sakamoto E, Hasegawa T, Kimura-Eto A, Hino M, Kitagawa S: Selective activation of STAT3 in human monocytes stimulated by G-CSF: implication in inhibition of LPS-induced TNF-alpha production. *Am J Physiol Cell Physiol* 286;C1302-1311, 2004
 22. Shaklee CL, Guo J, Faggioni R, Fantuzzi G, Senaldi G: Pretreatment with granulocyte-colony stimulating factor decreases lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in mice in association with the production of interleukin-18. *Cytokine* 25;119-126, 2004
 23. Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y, Fujimoto J: Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp Hematol* 30;1115-1123, 2002
 24. Egi H, Hayamizu K, Yoshimitsu M, Shimamoto F, Oishi K, Ohmori I, Okajima M, Asahara T: Regulation of T helper type-1 immunity in hapten-induced colitis by host pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor. *Cytokine* 23; 23-30, 2003
-