pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 29. No. 3, 341~346 (2016)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2016.29.3.341

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

대식세포의 혈청으로 식균된 자이모잔의 탐식능에 대한 삼잎국화 추출물의 효과

†김 준 섭
한국교통대학교 생명공학과

Effects of *Rudbeckia laciniata* Extract on Phagocytosis of Serum-Opsonized Zymosan Particles in Macrophages

†Jun-Sub Kim
Dept. of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong-gun 368-701, Korea

Abstract

Phagocytosis is a primary and an essential step of host defense, and is triggered by the interaction of particles with specific receptor of macrophages. In this study, we investigated the effect of extracts of *Rudbeckia laciniata* (RLE) on the phagocytic activity of macrophage, by monitoring the phagocytosis-associated signal transduction. RLE markedly increased phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles (SOZ), while phagocytosis of IgG-opsonized zymosan particles (IOZ) or none-opsonized zymosan particles (NOZ) remained unaffected. However, RLE did not affect the binding of opsonized zymosan particles (OZ) with the cell surface of macrophage. This suggests that RLE may regulate SOZ-induced intracellular signaling during phagocytosis of macrophage. To confirm this hypothesis, we investigated whether RLE was involved in the RhoA-mediated signal transduction during phagocytosis of SOZ. Inhibitors of the RhoA-mediated signaling pathway, such as Y-27632 (for ROCK), ML-7 (for MLCK), and Tat-C3 (for RhoA), totally blocked phagocytosis of SOZ enhanced by RLE, as well as phagocytosis of SOZ. Additionally, RhoA activity was markedly increased when cells were treated with RLE, suggesting that RLE could increase the phagocytic activity of macrophage via RhoA-ROCK/MLCK signal pathway. Thus, RLE may be used to develop functional foods for immunity.

Key words: *Rudbeckia laciniata*, macrophage, phagocytosis, RhoA, functional food

서 론

대식세포의 탐식작용은 인체 내로 침입한 병원균을 함입하고 제거하는 매우 중요한 면역학적 생리 반응이다. 또한, 조직 내에 불필요한 단백질 및 사멸된 세포들을 제거하여 조직의 항상성을 유지하는데 반드시 필요하다(Aderem & Underhill 1999). 대식세포의 탐식작용은 면역글로블린G (immunoglobulin G, IgG)를 인지하는 Fcγ 수용체(Fc receptor, FcR)와 보체(complement)를 인지하는 보체수용체(complement receptor, CR), 그리고 만노스와 프럭토스를 인지하는 만노스 수용체(mannose receptor)에 의해 시작되고, 세포내 골격단백질인 actin과 myosin의 중합에 관여하는 신호전달 기전에 의해 탐식작용이 진행된다(Chimini & Chavrier 2000).

Rho족 guanosine-5'-triphosphate 분해효소(Rho family GTPase)들은 유전자의 전사, 세포이동, 세포성장, 세포 골격단백질의 조절 및 단백질 분비 등 매우 많은 세포 생리 기능을 조절하기 때문에 대사, 면역 및 암 등의 질환연구에도 매우 중요한 조절인자로서 연구되고 있다(Etienne-Manneville & Hall 2002),

† Corresponding author: Jun-Sub Kim, Dept. of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 368-701, Korea. Tel: +82-43-820-5253, Fax: +82-43-820-5257, E-mail: junskim@ut.ac.kr

특히, Rho family GTPase 중 Cdc42/Rac는 FcγR에 의한 탐식작용을 조절하고, RhoA는 CR에 의한 탐식작용을 조절하는 것으로 알려져 있다(Caron & Hall 1998).

Rho family GTPase는 GTP와 결합되었을 때 활성화되고, GDP와 결합되면 불활성화되는 사이클을 가지고 있다. 이러한 활성·비활성의 조절은 구아닌 뉴클레오타이드 교환인자(guanine nucleotide exchange factors, GEFs), 구아닌 뉴클레오타이드 해리 억제인자(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs), 그리고 GTPase 활성화 단백질(GTPase activating proteins, GAPs)에 의해 이루어진다(Etienne-Manneville & Hall 2002). 대식세포의 탐식작용과 세포이동 동안, GTP와 결합된 RhoA는 활성화되어 하위신호전달인자인 Rho-Kinase(ROCK)를 통해서는 actin의 중합을 촉진하고, Myosin light chain kinase(MLCK)를 통해서 myosine의 중합을 일으킨다(Castellano 등 2001).

삼잎국화(*Rudbeckia laciniata*)는 국화과의 다년생 초본으로서, 북아메리카가 원산지이고 주로 범람원이나 습지에서 발견된다. 또한, 한국, 일본, 중국의 산간지역에서는 약재로 사용되고 있고, 초봄에 나는 어린 순은 식용으로 이용되고 있다(Lee CB 1998). 이러한 삼잎국화에 대한 국내 연구는 항암효능에 대한 연구만 있을 뿐, 다른 작물에 비해 연구가 적은 편이다(An 등 2012).

본 연구에서는 삼잎국화 추출물이 대식세포의 탐식작용에 미치는 효과에 대해 조사하여 면역기능 활성화를 위한 기능성 식품의 원재료로 사용될 수 있는지 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 삼잎국화는 농업회사 법인 번영 유한회사(홍천, 강원도, 대한민국)로부터 공급받았고, 사용된 삼잎국화는 4~5월의 어린순이 달려있는 식용이 가능한 잎과 줄기만을 열수추출하여 사용하였다.

본 연구의 실험에 사용된 fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 GibcoBRL(Braunscheig, Germany)로부터 구입했고, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)와 Zymosan A, fluorescein isothiocyanate(FITC), Y27632, ML-7, Glutathione S transferase-agarose bead(GST-bead)는 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입했고, mouse serum과 anti-zymosan IgG는 Invitrogen(Camarillo, CA, USA)으로부터 구입하였다.

Tat-C3와 GST-Rho binding domain of Rhotekin(GST-RBD)는 이전 연구에서 사용하였던 것처럼, 플라스미드를 대장균에 형질전환시켜 발현된 단백질을 분리하여 사용하였다(Park 등 2003; Kim 등 2004).

2. 삼잎국화 열수추출

삼잎국화 100 g을 1 L에 약탕기(대웅, 한국)로 3시간 가열추출한 다음, 여과한 후 동결 건조하여 17.4 g의 건조 분말을 얻었으며, 실험을 위하여 4℃에 보관했다. 실험 시에는 증류수에 녹여 stock solution(100 mg/mL)을 제조하였다. 제조된 stock solution은 −20℃에 보관하면서 분석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다.

3. 세포 배양

쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 5% FBS와 1% penicillin/streptomycine을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO_2, 37℃에서 배양하면서 실험에 사용하였다. 삼잎국화 추출물을 세포에 처리하기 전 세포들을 serum-free DMEM 배지에서 16시간 동안 배양하였다.

4. 세포 독성 실험

RAW264.7 세포의 생존률은 MTT 분석법을 사용하였다. 세포들을 DMEM 배지에서 5×10^4 cells/well의 밀도로 현탁하여 0~1 mg/mL의 농도로 삼잎국화 추출물을 처리하였다. 24시간 배양 후 5 mg/mL의 농도로 MTT 용액을 첨가하고, 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO 200 μL를 첨가함으로써 용해시킨 후, spectrophotometer(moleculardevices, CA, USA)를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

5. 식균 자이모잔(Opsonized zymosan particles)의 준비

FITC가 결합되어 있는 zymosan particles(FITC-zymosan)을 PBS로 7번 이상 세척한 후, 5×10^8 zymosan particles/mL가 되게 PBS로 희석하여 −70℃에 보관 후 실험시 녹여서 사용하였다. 탐식작용 실험을 위해 자이모잔 입자(Zymosan particles)에 1 μg/mL mouse serum(serum-opsonized zymosan, SOZ) 또는 1 μg/mL mouse IgG(IgG-opsonized zymosan, IOZ)를 37℃에서 1시간 동안 처리하여 식균하였다. 혈청으로 식균하였을 경우는 혈청단백질인 보체(complement)가 자이모잔 입자에 식균된다(Park 등 2003; Kim 등 2004).

6. 대식세포의 탐식능과 자이모잔의 세포표면 결합능 조사

RAW264.7 세포를 96-well plate에 16시간 동안 배양 후, 배양액을 serum free 배양액으로 갈아주었다. 16시간이 지난 후, 2×10^4 FITC- NOZ, SOZ, 또는 IOZ을 1시간 동안 세포에 처리하였다. PBS로 5번 세척한 후, excitation 490 nm와 emission 520 nm에서 형광의 세기를 형광광도계(F4500, HITACHI, Japan)로 측정하여 대식세포의 탐식능을 정량하였다. FITC-Zymosan의 세포표면 결합능은 crystal violet이 10 μM이 되게 첨가하여 세포표면에 결합된 FITC-Zymosan의 형광을 없앤 후(quenching),

탐식작용으로 인해 세포 내에 존재하는 FITC의 형광만을 측정한 다음, 전체 형광의 세기에서 crystal violet으로 quenching 시킨 후의 형광의 세기를 빼는 방식으로 결합력을 정량하였다(Kim 등 2004). ROCK 억제제인 Y27632(50 μM), MLCK 억제제인 ML-7(30 μM) 또는 RhoA 억제제인 Tat-C3(10 μg/mL)는 대식세포에 SOZ를 처리하기 30분 전에 미리 전처리하였다.

7. 세포 분획(Subcellular fractionation)과 GST-pull down assay

배양된 RAW264.7 세포를 serum free 배양액으로 갈아주고 나서, 500 μg/mL의 삼잎국화 추출물을 24시간 동안 처리하였다. Tat-C3(10 μg/mL)는 대식세포에 SOZ를 처리하기 30분 전에 미리 전 처리하였다.

세포막과 세포질에 존재하는 RhoA 단백질을 분리하기 위하여, 1% Triton X-100이 포함된 PEM buffer(100 mM Pipes, pH 6.8, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 2 μM phalloidin, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, 10 μg/mL leupeptin)를 이용하였다(Nagata-Ohashi 등 2004). PEM buffer로 세포를 녹인 후, 원심분리(13,000 rpm, 30 min, 4℃)를 통해 얻게 된 세포질(soluble fraction)과 세포막(insoluble fraction) 단백질들은 SDS-PAGE에 의해 분리시켰고, 세포막과 세포질에 존재하는 RhoA 단백질의 양은 anti-RhoA antibody를 사용하여 immunoblotting으로 확인하였다. PEM buffer에 녹여진 세포분획물은 원심분리 전에 미리 50 μL를 분리하여 anti-β-tubulin을 이용한 western blotting의 load control로 사용하였다.

활성화된 RhoA 단백질을 확인하기 위해 GST-pull down assay를 수행하였다(Kim 등 2006). 세포를 lysis buffer(50 mm Tris-HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 500 mm NaCl, 10 mm $MgCl_2$, 5 μg/mL each of leupeptin and aprotinin, 1 mM PMSF)에 녹인 뒤 원심분리(15,000 rpm, 15 min, 4℃)하였다. 액체 층(supernatant)에 GST에 ROCK의 GTPases 결합 도메인이 연결된 GST-ROCK binding domain(GST-RBD)을 넣고 1시간 동안 결합시킨 후, SDS-PAGE에 의해 GST-RBD에 결합된 단백질들을 분리하였고, 활성화된 RhoA는 Western blotting에 의해 확인하였다(Kim 등 2006).

8. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하여 평균과 표준편차(mean±S.D.)로 나타내었으며, 각 평균값에 대한 검증은 SAS® version 9.11(SAS institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 유의수준은 $p<0.05$였다.

결과 및 고찰

1. 대식세포의 자이모젠 탐식능과 결합능에 있어서 삼잎국화 추출물의 효과

삼잎국화 추출물의 대식세포 처리를 위한 적정농도를 알아보기 위하여, 삼잎국화 추출물을 농도별(0~1,000 μg/mL)로 대식세포에 24시간 동안 처리한 후, 세포독성을 조사하였다. 삼잎국화 추출물의 0~500 μg/mL의 농도에서는 유의있는 변화가 보이지 않았지만, 1,000 μg/mL에서는 세포독성이 나타났다(Fig. 1A). 본 결과를 통해 다음으로 진행되는 실험에서는 삼잎국화 추출물의 처리농도는 대식세포에 대한 세포독성 효과가 없었던 500 μg/mL 이하에서 이루어졌다.

그 다음으로, 삼잎국화 추출물의 대식세포의 탐식작용에 대한 효과를 살펴보기 위하여, 농도별(0~500 μg/mL)로 대식세포에 24시간 동안 전처리한 후, SOZ와 IOZ를 1시간 동안 함께 배양하였다. Fig. 1B에서 보여지는 것처럼, 삼잎국화 추출물은 SOZ의 탐식능을 농도 의존적으로 증가시켰지만, IOZ의 탐식능은 유의있는 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 대식세포의 zymosan 결합능에서는 SOZ과 IOZ의 경우, 모두에서 유의있는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1C).

이러한 결과가 의미하는 것은 삼잎국화 추출물에 포함된 여러 가지 성분들이 식균된 리간드와 대식세포 수용체간의 결합에는 영향을 미치지 않고, 탐식능을 조절하는 세포내 신호전달 기전에 참여함을 알 수 있게 하였다(Kim 등 2004).

2. 삼잎국화 추출물의 ROCK와 MLCK 신호기전 활성화

대식세포는 보체단백질을 통한 탐식능과 면역글로블린G를 통한 탐식능을 조절하는 명확한 세포내 신호전달기전에 의해 이루어진다(Caron & Hall 1998). 보체가 식균된 SOZ의 탐식능에서는 RhoGTPases 중 RhoA가 참여하고, IgG가 식균된 IOZ의 탐식능에서는 Rac1/Cdc42가 각각 참여한다. 삼잎국화 추출물은 Fig. 1에서 SOZ의 탐식능을 증가시켰기 때문에 RhoA가 참여하는 신호전달기전을 활성화시킬 가능성이 있다. 결국, 이러한 가정을 확인하기 위하여 대식세포에 삼잎국화 추출물 500 μg/mL를 24 h 동안 전처리한 후, 탐식능을 조절하는 RhoA의 하위기전 단백질인 ROCK와 MLCK의 억제제(Y27632 for ROCK, ML-7 for MLCK)의 존재 하에서 SOZ를 통한 대식세포의 탐식능을 살펴보았다.

Fig. 2에서 보여지는 것처럼, 대식세포의 SOZ 탐식능을 100%로 정량하였을 때, Y27632와 ML-7의 존재 하에서는 대식세포의 SOZ 탐식능이 33.5%와 30.9%로 각각 나타났다. 억제제들이 없는 조건에서 삼잎국화 추출물(500 μg/mL) 처리에 의해 SOZ 탐식능은 224.5%였지만, 이러한 탐식능 증가효과는 억제제의 존재 하에서 56.7%(Y27632)와 44.5%(ML-7)로 저하되었다.

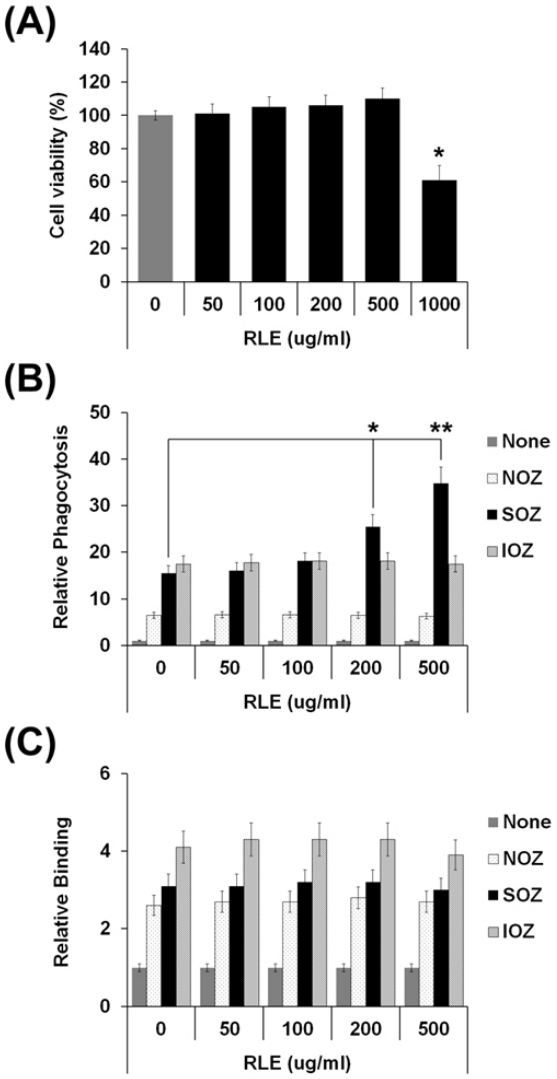

Fig. 1. Effects of RLE on the phagocytosis and binding of zyomsan particles in RAW264.7 macrophage cells. (A) Cells were treated with or without RLE as the indicated dose for 24 h and cell viabilities were determined as described in the materials and methods. The graphs represent the averaged, normalized cell viability values; the value in untreated-RAW264.7 cells is taken as 100%. Values are from three independent experiments±S.D. $^{*}P<0.05$. (B, C) Phagocytosis and binding experiments were carried out as described in materials and methods. Phagocytosis or Binding was measured by fluorescence spectrophotometry measuring the fluorescence intensity of serum-opsonized FITC zymosan particles. Cells were pretreated with RLE as the indicated dose for 24 h and then were challenged with none-opsonized zymosan (NOZ), serum-opsonized zymosan (SOZ), or IgG-opsonized zymosan (IOZ) for 1 h. Values are from three independent experiments±S.D. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

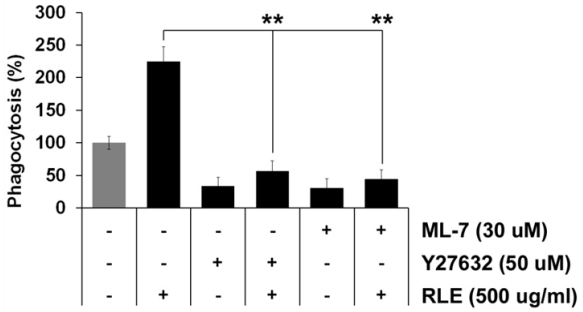

Fig. 2. Effects of RLE on the activation of ROCK and MLCK during phagocytosis of SOZ. Cells were pretreated with or without 500 μg/mL RLE for 24 h and then were challenged with SOZ for 1 h. Before SOZ stimulation, cells were treated with or without 50 uM Y27632 or 30 μM ML-7 for 30 min. The graphs represent the averaged, normalized phagocytosis values; the value in only SOZ challenged-RAW264.7 cells is taken as 100%. Values are from three independent experiments±S.D. $^{**}P<0.01$

결국, 삼잎국화 추출물 처리에 의해 대조군보다 증가되는 탐식능 효과가 억제제들의 존재 하에서는 대조군의 탐식능 이하로 저해되었기 때문에, 삼잎국화 추출물의 SOZ 탐식능 증가효과는 ROCK와 MLCK의 활성과 관련된 신호전달 기전에 영향을 준다는 것을 나타낸다.

3. 삼잎국화 추출물의 RhoA 신호기전 활성화

만약 삼잎국화 추출물이 직접 또는 ROCK와 MLCK 보다 하위신호인자를 조절하여 탐식능의 최종 세포생리작용인 actin과 myosin의 중합을 일으킬 수 있다면, ROCK와 MLCK의 억제제들의 효과는 거의 없거나 미약해야 하는데, Fig. 2에서 보여지듯이, 삼잎국화 추출물의 효과가 억제제들에 의해 거의 완벽히 억제되었기 때문에, 적어도 ROCK와 MLCK의 하위신호인자는 아니며, ROCK와 MLCK를 포함한 상위신호인자를 조절한다는 것을 의미한다.

결국, 이러한 가설을 확인하기 위하여 ROCK와 MLCK의 상위신호전달 단백질인 RhoA와 삼잎국화 추출물의 신호전달 기전 내 연관성을 살펴보았다. RhoA에 특이적인 억제제인 Tat-C3를 통해 RhoA의 활성을 억제시킨 조건 하에서 SOZ를 통한 대식세포의 탐식능을 살펴보았다.

Fig. 3에서 보여지는 것처럼, 대식세포의 SOZ 탐식능을 100% 정량하였을 때, Tat-C3의 존재 하에서 대식세포의 SOZ 탐식능이 26.7%로 나타났고, 삼잎국화 추출물을 처리한 경우에도 28.8%의 SOZ 탐식능이 나타났다. 이러한 결과는 삼잎국화 추출물의 SOZ 탐식능 증가효과가 Tat-C3에 의해 완전히 저해되는 것을 의미하며, 삼잎국화 추출물의 탐식능 증가

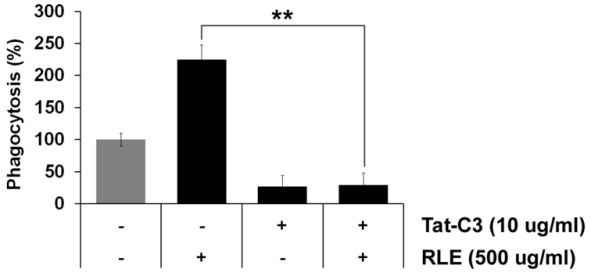

Fig. 3. Effects of RLE on the activation of RhoA during phagocytosis of SOZ. Cells were pretreated with or without 500 μg/mL RLE for 24 h and then were challenged with SOZ for 1 h. Before SOZ stimulation, cells were treated with or without 10 μg/mL Tat-C3 for 30 min. The graphs represent the averaged, normalized phagocytosis values; the value in only SOZ challenged-RAW264.7 cells is taken as 100%. Values are from three independent experiments ±SD. $^{**}P<0.01$

효과는 RhoA가 참여하는 신호전달기전에 전적으로 의존한다는 것을 알 수 있었다.

4. 삼잎국화 추출물 처리에 의한 RhoA 단백질의 활성변화

다음으로, Fig. 3의 결과와 의미를 더욱 견고히 하기 위하여, 삼잎국화 추출물의 처리에 따른 세포내 RhoA 단백질의 활성 변화를 살펴보았다. RhoA 단백질은 GTP 결합 단백질로서 GTP와 결합하였을 때 활성화되고, GDP와 결합하였을 때 활성이 억제된다. GTP와 결합하여 활성화된 RhoA는 세포질에서 세포막으로 이동하여 상위신호전달인자로 작동하고, 다음 신호전달자인 ROCK 등과 결합하여 신호를 전달한다(Castellano 등 2001; Etienne-Manneville & Hall 2002).

세포 내 RhoA의 활성변화를 조사하기 위하여, 삼잎국화 추출물을 대식세포에 24시간 동안 전처리한 후, 대식세포의 SOZ 탐식작용 동안 RhoA의 세포내 위치 변화를 western blotting 방법을 이용하여 조사하였고, RhoA 단백질의 활성은 GST-pull down assay를 이용하여 살펴보았다.

Fig. 4A에 보여지는 것처럼, 대식세포의 SOZ 탐식작용 동안 RhoA는 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였고, 이러한 이동 양상은 삼잎국화 추출물에 의해 더욱 증가하였다. 반면에, Tat-C3는 SOZ 탐식과 삼잎국화 추출물에 의한 RhoA의 이동을 억제하였다. 또한, RhoA 단백질의 활성도를 조사한 결과에서도 같은 양상이 확인되었다(Fig. 4B). 결국, 삼잎국화 추출물은 RhoA 단백질의 활성을 통한 ROCK와 MLCK를 활성화시키는 신호전달 경로에 참여하는 것으로 보인다.

요약 및 결론

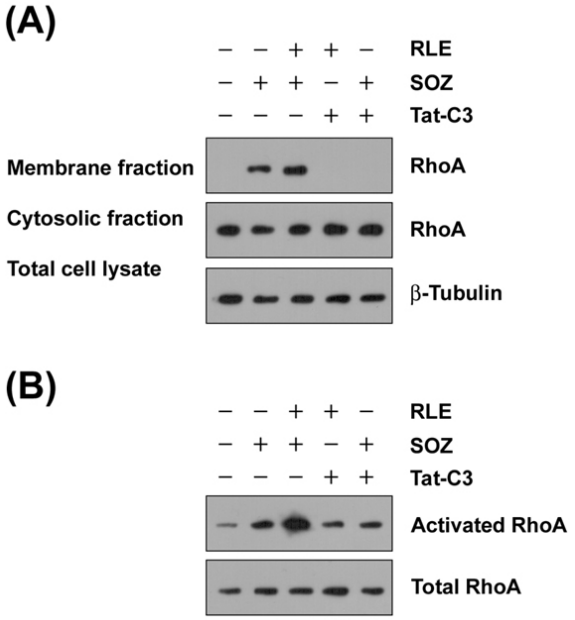

Fig. 4. Treatment of RLE activates RhoA in RAW264.7 macrophage cells (A and B). Cells were pretreated with or without 500 μg/mL RLE for 24 h and then were challenged with SOZ for 1 h. Before SOZ stimulation, cells were treated with or without 10 μg/mL Tat-C3 for 30 min and then performed subcellular fractionation (A) and GST-pull down assay (B). (A) Cell lysates were fractionated into Triton X-100-soluble (cytosolic) and -insoluble (membrane) fractions and immunoblotted with antibodies to RhoA or β-tubulin. (B) RhoA activation was analyzed using a GST-pulldown assay, as described in the materials and methods. Representative images of experiments performed at least in triplicate are shown.

본 연구는 삼잎국화의 면역학적 효과에 있어서 대식세포의 탐식작용을 이끄는 세포내 신호전달기전에 대하여 확인하고자 하였다. 결국, 이러한 결과들을 통하여, 대식세포의 명확한 보체 또는 IgG를 통한 두 가지 방식의 탐식작용에서 삼잎국화 추출물은 보체를 통한 대식세포의 탐식작용을 증가시키고, 이는 삼잎국화 추출물이 세포내 RhoA-ROCK/MLCK 신호전달 기전 활성을 통한 효과임을 확인할 수 있었다.

본 연구는 RhoA의 상위신호인자에 대한 조사는 이루어지지 못한 한계를 가지고 있다. 실제로 RhoA의 상위신호인자들인 여러 가지 GEF가 탐식능에 참여하여 RhoA 및 관련 신호기전을 조절하는 것은 확실하지만, 어떠한 GEF가 관여하는지는 아직 조사가 되어있지 않다. 그럼에도 불구하고, 삼잎국화 추출물이 세포 내 신호전달기전을 조절한다는 사실은 매우 흥미로우며, 삼잎국화 추출물이 포함하고 있는 플라보

노이드 및 폴리페놀 등의 명확한 구조분석 연구를 통해 실제 작용물질을 찾아낸다면 기초 연구뿐만 아니라, 기능성 식품 개발 등의 산업적 이용으로도 많은 가치를 창출할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구임.

References

Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623

An IJ, Kwon JK, Lee JS, Park HS, Kim DC, Choi BJ, Lee KM, Park YJ, Jung JY. 2012. Induction of apoptosis in human cancer cells with compositae extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:584-590

Caron E, Hall A. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717-1721

Castellano F, Chavrier P, Caron E. 2001. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 13:347-355

Chimini G1, Chavrier P. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2:191-196

Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635

Kim JS, Diebold BA, Kim JI, Kim J, Lee JY, Park JB. 2004. Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans. *J Biol Chem* 279:21589-21597

Kim JS, Kim JG, Moon MY, Jeon CY, Won HY, Kim HJ, Jeon YJ, Seo JY, Kim JI, Kim J, Lee JY, Kim PH, Park JB. 2006. Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood* 108:1821-1829

Lee CB. 1998. Coloured Flora of Korean Medicinal Herbs. Kyo-Hak Publishing Co. Korea

Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R, Nishita M, Ohashi K, Kousaka K, Iwamatsu A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. 2004. A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol* 165:465-471

Park J, Kim JS, Jung KC, Lee HJ, Kim JI, Kim J, Lee JY, Park JB, Choi SY. 2003. Exoenzyme Tat-C3 inhibits association of zymosan particles, phagocytosis, adhesion, and complement binding in macrophage cells. *Mol Cells* 16:216-223

Received 9 May, 2016
Revised 25 May, 2016
Accepted 1 June, 2016