

골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행 과정에서 류코트리엔 B₄ 역할과 활성산소종 억제제의 영향*

이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실, 소아청소년과학교실**
문영철 · 오수아 · 이경은 · 유은선** · 최문영 · 안지영 · 성주명

= Abstract =

Effects of Transmigration of Bone Marrow Nuclear Cells Through Endothelial Cell and Stromal Cell by Leukotriene B₄ and Inhibition of Reactive Oxygen Species*

Yeung-Chul Mun · Soo A Oh · Kyoung-Eun Lee · Eun-Sun Yoo**
Moon Young Choi · Jee-Young Ahn · Chu-Myong Seong

*Department of Internal Medicine, Pediatrics,** School of Medicine, Ewha Womans University*

Objectives : Leukotriene B₄ (LTB₄) is lipid mediator derived from membrane phospholipids during the process of inflammation, having many roles (ie ; inducer of chemotaxis, the production of nitric oxide, transepithelial migration of neutrophil). The major activities of LTB₄ include the recruitment and activation of leukocytes, suggesting that it may involve the process for transendothelial migration of nuclear cells in bone marrow environment. Reactive Oxygen Species (ROS) have a cell signaling roles that are involved in signal transduction cascades of numerous growth factor-, cytokine-, and hormone-mediated pathways, and regulate many biological systems. In this present study, we focused on the role of LTB₄ and ROS on transmigration of bone marrow nuclear cells across endothelial or stromal cell monolayer.

Methods : MS-5, murine stromal cell line cells, or bEnd.3, murine microvascular cell line cells, were grown to confluence on microporous transwell membrane. Murine marrow cells were placed on top of the prepared transwell membrane. The transwells were then seated in wells containing media and LTB₄ with or without pretreatment of N-acetylcysteine (NAC), an oxygen free radical scavenger, or diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase-like flavoproteins. Cells that migrated through the stromal or endothelial layer into the wells were assayed for transendothelial migration.

Results : The numbers of migrated bone marrow nuclear cells through the bEnd.3 were increased by treatment of LTB₄ (control, 12.5 ± 0.2% ; 50nM, 22.7 ± 0.9% ; 100nM, 44.3 ± 1.4% ; 200 nM, 36.3 ± 0.9% ; p<0.05). The numbers of migrated bone marrow nuclear cells through the MS-5 were also increased by treatment of LTB₄ (control, 11.0 ± 0.9% ; 50nM, 25.7 ± 0.9% ; 100nM, 35.8 ± 1.8% ; 200nM, 32.1 ± 0.9% ; p<0.05). However, increasing effect of LTB₄ to the transmi-

*이 연구는 2005학년도 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의한 연구임.

gration of bone marrow nuclear cells through the MS-5 or bEnd.3 were inhibited by pretreatment of NAC or DPI.

Conclusion : Through our data, it is suggested that LTB4 could induce the transmigration of bone marrow nuclear cells and ROS might be involved on the transendothelial migration of bone marrow nuclear cells by LTB4. It would be very interesting to test the effects of LTB4 and ROS on stem cell mobilization and homing in the future.

KEY WORDS : Leukotriene B₄ · Reactive Oxygen Species · Transmigration · Bone marrow nuclear cells · Endothelial cell · Stromal cell.

서 론

류코트리엔 B₄(LTB₄)는 세포막 인지질로부터 유래된 염증과정에 관여하는 지방매개체이다¹⁻³). LTB₄의 주된 역할은 화학주성의 유도, 활성산소의 생산, 백혈구, 특히, 호중구 및 호산구의 이동에 관여하고 있으며, 내피세포와 백혈구의 부착에 중요한 역할을 하는데, 이러한 LTB₄의 역할은 케모카인에 의한 백혈구의 이동과 화학주성과 많은 부분에서 유사한 특성을 가진다⁴⁻⁷). 염증반응과 백혈구 이동과 연관된 LTB₄의 역할들은 골수내 세포들의 이동 과정에서 다른 시토카인이나 성장인자 혹은 케모카인의 역할과 유사한 점이 많다. LTB₄와 비슷한 작용을 가진 여러 케모카인들이 조혈모세포를 포함한 골수내 세포들의 이동과 연관이 있음이 최근 밝혀짐에 따라, LTB₄도 골수내 세포의 이동에 관련이 있을 가능성이 있다⁸⁻¹⁴).

활성산소종(ROS)은 여러 종류의 성장인자, 시토카인, 혹은 호르몬 등으로 유도된 조혈세포내 신호전달체계에 중요한 역할을 하고, 조혈세포내 여러 생명현상의 조절과 관련이 있다¹⁵⁻¹⁸).

특히, 염증세포에서 분비된 시토카인 혹은 케모카인들이 세포내 ROS를 증가시키고, 이때 증가된 ROS는 혈관내피세포 단층의 투과성을 증가시켜 백혈구의 경내피세포 이행을 용이하게 한다¹⁹⁻²²).

조혈모세포 이식 후 조혈모세포가 말초혈액에서 골수내로 자리잡는 귀소나, 골수내 조혈모세포를 혈액으로 나오게 하는 가동화의 과정은 매우 복잡하여, 여러 다양한 기전들이 관련이 있지만, 혈관내피세포 및 기질세포와 골수 조혈세포들과의 유기적인 반응과 골수 조혈세포의 경내피세포 이행이 중요한 역할을 한다²³⁾²⁴). 본 연구에서는 골수유핵세포의 경내피세포 및 기질세포 이행에 LTB₄와 ROS가 어떻게 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 골수유핵세포의 획득

생후 6~8주된 수컷의 C57BL/6 마우스를 에테르로 마취시켜 안락사 시킨 후, 대퇴골과 경골을 분리하고, 각각 뼈 한쪽의 골수내강 입구에 8mL의 0.1% BSA가 섞인 Hank's Balanced Salt Solution(JBI, WELGENE Inc., KOREA)를 주사기와 24G의 주사바늘을 이용하여 천천히 분사한 다음, 반대편 골수내강에서 흘러나오는 골수현탁액을 받아 뼈를 제거한 다음, 원심분리(930g, 15분, 18~20℃)에 의해 골수세포를 얻었다. 적혈구 제거 완충제(Ammonium Chloride lysis buffer, NH₄Cl 8.29g, KHCO₃ 1g, EDTA 0.037g, 1L distilled water, 4℃보관) 1mL에다가 골수세포를 부유 시키고 2분간 실온에서 배양한 뒤, phosphate-buffered saline(PBS)을 이용하여 1회 세척 후 원심분리하여(140g, 7분, 4℃) 적혈구를 제거함으로써 골수유핵세포를 최종적으로 얻었다.

2. Transmigration assay

1) 골수유핵세포의 경내피세포 및 기질세포 이행에 대한 LTB₄의 역할

5 μm Polycarbonate Membrane의 미세공막이 있는 24 insert TranwellTM(costar, corning Inc., USA)의 상방에 생쥐 미세혈관세포주인 bEnd.3²⁵) 혹은 생쥐 골수 기질세포주인 MS-5²⁶)를 혈(well) 당 5×10³개의 세포를 넣고 3일간 배양하여 단층을 형성한 후, 하방에 각각 50, 100, 200 nM의 농도로 LTB₄(SIGMA-ALDRICH Inc., USA)를 처리한 다음, C57BL/6 마우스로부터 얻은 1×10⁶개의 골수세포를 상방에 넣어 37℃, 5% CO₂, 완전 습윤상태에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 상방을 제거한 뒤, 하방으로 이행한 골수세포를 trypan blue 로 염색하여 그 수를 센 다음 상방에 넣은 세포 수에 대

한 이행한 골수세포의 비율을 측정하였다. bEnd.3 및 MS-5의 단층이 없는 상태로 같은 실험을 반복하여 bEnd.3 및 MS-5의 단층이 있었던 경우와 비교하였다. 각각의 실험당 한마리의 마우스에서 얻은 골수세포를 이용하였으며, 4회의 실험을 반복하여 데이터를 얻었다.

2) 골수유핵세포의 LTB4 매개 경내피세포 및 경기질세포 이행에 대한 ROS 억제제의 영향

5 μ m Polycarbonate Membrane의 미세공막이 있는 24 insert Tranwell™(costar, corning Inc., USA)의 상방에 bEnd.3 혹은 MS-5를 혈(well) 당 5×10^3 개의 세포를 넣고 3일간 배양하여 단층을 형성한 후, 하방에 각각 100nM의 농도로 LTB4를 처리한 다음, C57BL/6 마우스로부터 얻은 1×10^6 개의 골수세포를 상방에 넣어 37°C, 5% CO₂, 완전 습윤상태에서 4시간 동안 배양한 뒤 하방으로 이행한 골수세포의 비율을 측정하였다. ROS의 억제제 LTB4 매개 경내피세포 혹은 경기질세포 골수세포 이행에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, N-acetylcysteine (NAC, an oxygen free radical scavenger, SIGMA-ALDRICH Inc., USA) 혹은 diphenylene iodonium (DPI, an inhibitor of NADPH oxidase-like flavoproteins, SIGMA-ALDRICH Inc., USA)을 LTB4 처리 20분전에 여러 농도로 처리하여, LTB4만 처리한 경우와 비교하였다. 각각의 실험당 한마리의 마우스에서 얻은 골수세포를 이용하였으며, 4회의 실험을 반복하여 데이터를 얻었다.

3. 통계처리

통계량은 Student t-test로 검정하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의미가 있다고 판정하였다.

결 과

1. 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행에 대한 LTB4의 영향

bEnd.3 단층을 통한 골수유핵세포의 경내피세포 이행 실험에서 LTB4의 처리를 한 경우, LTB4를 처리하지 않은 대조군 $12.5 \pm 0.2\%$ 보다 골수유핵세포의 경내피세포 이행을 촉진하였고, LTB4의 여러농도 중 100nM에서 대조군에 비해 3.54배가 증가한 가장 높은 골수유핵세포의 이행이 관찰되었다(50nM, $22.7 \pm 0.9\%$; 100nM, $44.3 \pm 1.4\%$; 200nM, $36.3 \pm 0.9\%$; $p < 0.05$). 그러나, bEnd.3

단층없이 시행한 골수유핵세포의 이동은 LTB4의 처리에도 불구하고 증가하지 않았다(대조군, $13.3 \pm 0.9\%$; 100 nM, $15.9 \pm 0.9\%$; $p = 0.220$, Fig. 1). MS-5 단층을 통한 골수유핵세포의 경기질세포 이행 실험에서도 LTB4의 처리를 한 경우, LTB4를 처리하지 않은 대조군 $11.0 \pm 0.9\%$ 보다 골수유핵세포의 경기질세포 이행을 촉진하였고, bEnd.3와 마찬가지로 LTB4의 농도가 100nM일 경우 대조군에 비해 3.25배가 증가한 가장 높은 골수유핵세포의 이행을 관찰할 수 있었다(50nM, $25.7 \pm 0.9\%$; 100nM, $35.8 \pm 1.8\%$; 200nM, $32.1 \pm 0.9\%$; $p < 0.05$). 그러나, MS-5 단층없이 시행한 골수유핵세포의 이동은 bEnd.3와 마찬가지로 LTB4의 처리에도 불구하고 증가하지 않았다(대조군, $10.1 \pm 0.9\%$; 100nM, $11.9 \pm 1.8\%$; $p = 0.493$, Fig. 2).

2. ROS 억제제에 의한 골수유핵세포의 LTB4 매개 경내피세포 및 경기질세포 이행의 변화

LTB4에 의해 유도된 bEnd.3 단층을 통한 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행의 증가는 ROS 억제제인 DPI 혹은 NAC의 처리에 의해서 환원되었다(DPI 및 NAC 비처리 대조군, $34.3 \pm 4.1\%$; NAC 2mM, $27.4 \pm 6.4\%$, $p = 0.074$; NAC 4mM, $22.0 \pm 5.1\%$, $p < 0.05$; DPI 5 μ M, $18.1 \pm 1.3\%$, $p < 0.05$; DPI 10 μ M, $12.3 \pm 0.1\%$, $p < 0.05$; Fig. 3). LTB4에 의해 유도된 MS-5

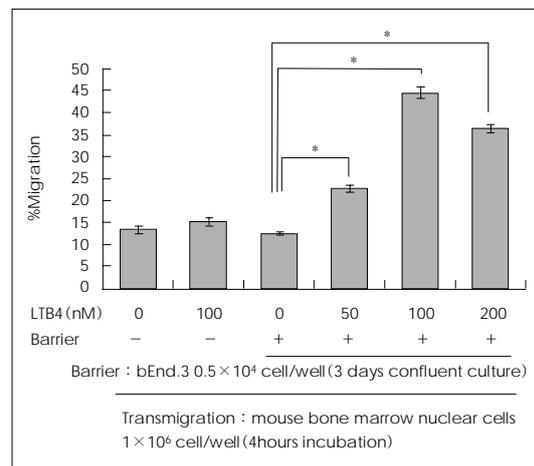


Fig. 1. Results of transmigration assay of bone marrow nuclear cells from C57BL/6 mice across bEnd.3 cell monolayer after treatment of LTB4. Each data point represents four independent experiments and is depicted as mean \pm standard deviation. Significant difference from control was assessed using student's t-test. * : p-values < 0.05.

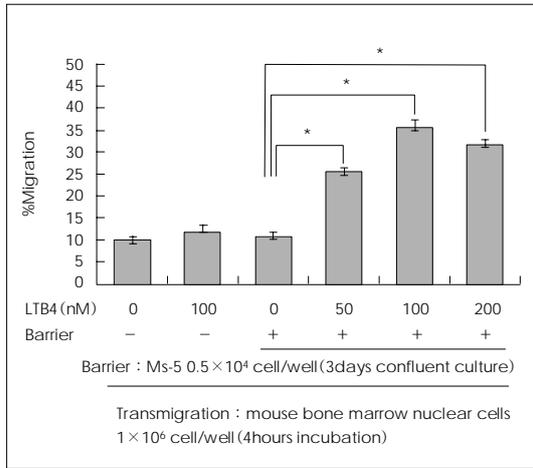


Fig. 2. Results of transmigration assay of bone marrow nuclear cells from C57BL/6 mice across MS-5 cell monolayer after treatment of LTB4. Each data point represents four independent experiments and is depicted as mean \pm standard deviation. Significant difference from control was assessed using student's t-test. * : p-values < 0.05.

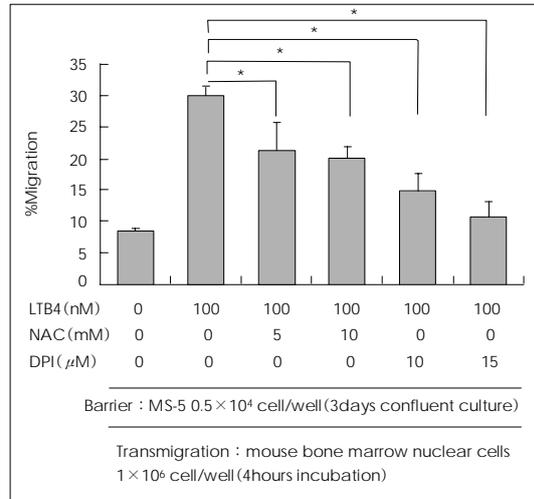


Fig. 4. Roles of ROS inhibitors in the LTB4-induced transmigration of bone marrow cells through the MS-5 monolayer. Each data point represents four independent experiments and is depicted as mean \pm standard deviation. Significant difference between group was assessed using student's t-test. * : p-values < 0.05.

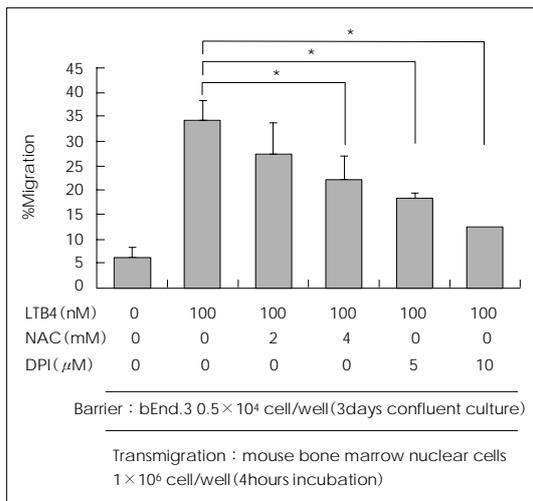


Fig. 3. Roles of ROS inhibitors in the LTB4-induced transmigration of bone marrow cells through bEnd.3 monolayer. Each data point represents four independent experiments and is depicted as mean \pm standard deviation. Significant difference between group was assessed using student's t-test. * : p-values < 0.05.

단층을 통한 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행의 증가도 ROS 억제제인 DPI 혹은 NAC의 처리에 의해서 환원되었다(DPI 및 NAC 비처리 대조군, $30.1 \pm 1.4\%$; NAC 5mM, $21.4 \pm 4.3\%$, $p < 0.05$; NAC 10mM, $20.1 \pm 1.8\%$, $p < 0.05$; DPI 10 μ M, $14.9 \pm 2.7\%$, $p <$

0.05; DPI 15 μ M, $10.8 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$; Fig. 4). 각각 ROS 억제제의 농도가 높을수록 LTB4 매개 골수유핵세포 이행의 환원효과도 높게 관찰되었다.

고 안

본 연구는 그 동안 염증과 관련된 연구에서 호중구, 호산구 및 비만세포와 관련하여 주로 연구되어 오던 LTB4와 ROS를 골수내 환경, 특히 조혈세포를 포함한 골수유핵세포와 혈관내피세포 및 기질세포와의 상호작용에 접목시켜, 골수 환경내 존재하는 여러 세포에서 LTB4와 ROS가 어떠한 역할을 하는지 확인함으로써, 가동화와 귀소 등 골수내 환경을 유지하는 여러 현상들 가운데에서 LTB4 및 ROS와 관련된 기전이 있는지 알아보고자 하였다.

골수는 조혈세포를 만드는 장소일 뿐만 아니라, 다양한 여러종류의 줄기세포가 존재하는 곳으로, 인체내 장기의 다양한 변화에 따라 각종 세포들이 혈액으로 빠져나가거나, 혈액내 세포들이 골수로 귀소하게 된다. 이런 세포들의 이동의 과정에는 다양한 기전이 관련되어 있는데, 그 동안 알려진 것으로는 G-CSF 및 GM-CSF와 같은 성장인자와 IL-3, IL-7, IL-12, SCF 및 Flt-3 ligand와 같은 시토카인, 그리고 IL-8, MIP-1 α , MIP-2 및 SDF

-1과 같은 케모카인 등이 있으며, VLA-4/VCAM-1, VLA-5, PECAM-1, Hyaluronic acid/CD44, Selectin 및 LFA-1/ICAM-1 등의 세포유착분자 등과 metalloproteinase 및 serine protease와 같은 단백질분해효소 등도 관련이 있음이 알려져 있다²³⁾²⁴⁾.

본 저자들은 조혈모세포이식술에 사용되는 조혈모세포를 기존의 골수채취로부터 얻는 것보다 양적으로 우수한 가동화를 이용하여 얻는 말초 조혈모세포의 채취에 대해 관심을 가지고 연구를 진행해오고 있다. 가동화에 대한 많은 연구에도 불구하고, 아직도 그 복합적인 세포 및 분자생물학적 기전에 대해서는 잘 정립되지는 않았으나, 앞서 기술된 다양한 시토카인, 케모카인, 세포유착분자, 그리고 단백질분해효소 등이 유기적으로 작용하여 가동화를 일으키는 다원적인 작용으로 가동화를 유도하는 것으로 이해되고 있다²³⁾²⁴⁾. 이러한 과정은 만성염증에서 다양한 시토카인, 케모카인, 세포유착분자 및 단백질분해효소 등의 작용에 의해 호산구, 호중구 등 염증세포가 염증부위로 옮겨와 염증을 일으키는 과정과 유사하다.

LTB₄는 염증반응에서 호산구 및 호중구의 화학주성에 중요한 인자 중 하나로, 세포의 화학주성에 필요한 여러 인자들과 세포부착인자의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있다¹⁾²⁾. LTB₄는 만성 폐쇄성폐질환에서의 세균감염에 의한 급성악화시, 호중구가 염증부위로 동원하는데 관여함이 이미 밝혀져 있을 뿐 아니라, 이러한 과정에서 IL-8, elastase와 같은 조혈모세포세포의 가동화와도 관련이 있는 시토카인 및 단백질분해효소 등과의 관련성이 제시되었다²⁷⁾²⁸⁾. 또한, 천식과정에서 염증부위의 호산구 및 호중구의 침착과정에서 LTB₄의 역할이 밝혀져 있는데, 조혈모세포의 가동화 혹은 귀소의 기전과 천식의 병리과정에서 호산구 및 호중구의 조직내 침착의 기전과 다소 유사한 점이 있다²⁹⁻³¹⁾.

ROS는 여러 종류의 성장인자, 시토카인, 혹은 호르몬 등으로 유도된 세포내 신호전달체계에 중요한 물질로서, 골수내 세포들간의 상호작용과 조혈세포에서 발생하는 다양한 현상에서도 그 역할이 알려져 있다. 예를 들면, 조혈세포에 조혈성장인자를 처리한 경우 ROS의 생성이 증가하고¹⁶⁾, 염증반응에서 호중구의 신호전달 과정을 ROS가 조절하며³²⁾, ROS에 의해 단백질분해효소의 생성이 증가함으로써 세포외 기질의 분해로 세포의 이동을 촉진시키거나³³⁻³⁵⁾, 백혈구가 혈관내피세포에 부착되면 ROS 생성이 증가하며³⁶⁾, 이 ROS가 혈관내피세포 단층의 투과성

을 증가시켜 백혈구의 경내피세포 이행을 용이하게 한다는 것¹⁹⁻²²⁾ 등이다.

또한, 백혈구에 LTB₄를 처리할 경우 ROS의 발현이 증가함이 알려져³¹⁾³⁷⁾, 골수 환경내 존재하는 여러 세포에 의한 가동화와 귀소를 포함한 골수내 미세환경의 여러 현상들 가운데서 LTB₄와 ROS가 어떤 역할을 하고 있을 가능성이 충분히 있다.

이상의 내용에 착안하여, 본 연구에서는 골수유핵세포의 bEnd.3 단층을 통한 경내피세포 이행 실험 및 MS-5 단층을 통한 경기질세포 이행 실험을 이용하여, 골수세포의 귀소와 가동화에 중요한 기전 중 하나인 혈관내피세포 및 기질세포와 골수세포들과의 유기적인 반응과 골수세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행에서 LTB₄와 ROS의 역할을 실험하였다. 본 연구결과는 앞서 세운 가설대로 LTB₄의 처리로 골수유핵세포의 이행이 촉진되었고, LTB₄에 의해 유도된 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행의 증가는 ROS 억제제 처리를 통해 환원됨을 보여주었다. 이것은 LTB₄가 조혈모세포를 포함한 골수세포의 가동화 혹은 귀소 과정에서 어떤 형태로든 중요한 역할이 있음과, 이 과정에 ROS가 관계하고 있음을 시사하고 있다.

본 연구결과는 골수내 환경에서 LTB₄ 및 ROS의 역할을 제시하고 있지만, 궁극적인 조혈모세포를 이용한 것이 아니라 골수유핵세포 전체를 이용하였기에, 조혈모세포 가동화 혹은 이식 후 귀소에서 LTB₄ 및 ROS의 역할에 대한 결론을 내리기에는 다소 미흡한 점이 있다. 마우스의 조혈모세포를 직접 분리하거나 마우스 생체를 이용한 LTB₄와 ROS의 영향의 연구 결과가 나오면 조혈모세포의 가동화에 직접적으로 관여되는 여러 기전 가운데서 LTB₄와 ROS가 어떤 과정에서 그 역할이 있을지 좀 더 확실한 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

목 적

염증반응에 중요한 역할을 하는 류코트리엔 B₄는 백혈구의 이동, 화학주성 및 활성산소종의 생산에 관련이 있다. 활성산소종은 여러종류의 성장인자, 시토카인, 케모카인 및 호르몬에 의한 세포의 신호전달에 중요한 작용이 있으며, 내피세포 단층의 투과성을 증가시켜 백혈구의 이행을 용이하게 한다. 외부 자극에 의한 골수세포의 이동

과정에 혈관내피세포 및 기질세포와 조혈세포와의 유기적인 반응과 골수세포의 경내피세포 이행이 중요하다. 본 연구에서는 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행에서 류코트리엔 B₄와 활성산소종이 어떻게 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

방 법

생후 6~8주된 수컷의 C57BL/6 마우스로부터 골수유핵세포를 얻은 후, 골수유핵세포의 Tranwell™을 이용한 경내피세포 및 경기질세포 이행에서 류코트리엔 B₄가 어떠한 역할을 하는지 실험하였고, 더하여 활성산소종 억제제인 NAC와 DPI를 처리할 경우 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다.

결 과

골수유핵세포의 bEnd.3 단층을 통한 경내피세포 이행 실험 및 MS-5 단층을 통한 경기질세포 이행 실험에서 류코트리엔 B₄의 처리가 통계적으로 유의하게 골수유핵세포의 이행을 촉진시키고, 100nM의 류코트리엔 B₄ 농도에서 가장 높은 이행이 관찰되었다(경내피세포 이행, 44.3±1.4%, 대조군의 3.54배; 경기질세포 이행, 35.8±1.8%, 대조군의 3.25배). LTB₄에 의해 유도된 골수유핵세포의 경내피세포 및 경기질세포 이행의 증가는 ROS 억제제인 DPI 및 NAC 처리 모두에서 통계적으로 유의하게 환원되었다.

결 론

본 연구결과는 류코트리엔 B₄가 골수유핵세포의 이행을 촉진시키고, 골수유핵세포의 류코트리엔 B₄ 매개 경내피세포 및 경기질세포 이행에 활성산소종이 관련이 있음을 시사한다. 이 결과는 향후 조혈모세포의 가동화 및 이식 후 귀소에서 류코트리엔 B₄와 활성산소종이 어떠한 역할을 하는지에 대해 연구를 통해 조혈모세포이식 기술의 발전 및 기전연구에 토대가 될 것으로 기대한다.

중심 단어 : 류코트리엔 B₄ · 활성산소종 · 이행 · 골수유핵세포 · 내피세포 · 기질세포

References

1) Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M : *Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. J Biol Chem* 1995 ; 270 : 21652-21658

2) Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T : *Leukotriene B₄ : Metabolism and signal transduction. Arch Biochem Biophys* 2001 ; 385 : 230-241

3) Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC : *Lipid mediator networks in cell signaling : update and impact of cytokines. FASEB J* 1996 ; 10 : 1147-1158

4) Palmer RM, Stepney RJ, Higgs GA, Eakins KE : *Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leukocytes of different species. Prostaglandins* 1980 ; 20 : 411-418

5) Busse WW : *Leukotrienes and inflammation. Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : S210-S213

6) Hurley BP, Sin A, McCormick BA : *Adhesion molecules involved in heparin A3-mediated neutrophil trans-epithelial migration. Clin Exp Immunol* 2008 ; 151 : 297-305

7) Vaddi K, Newton RC : *Regulation of monocyte integrin expression by β -family chemokines. J Immunol* 1994 ; 153 : 4721-4732

8) Broxmeyer HE, Orazi A, Hague NL, Sledge GW, Rasmussen H, Gordon MS : *Myeloid Progenitor Cell Proliferation and Mobilization Effects of BB10010, a Genetically Engineered Variant of Human Macrophage Inflammatory Protein-1 α , in a Phase I Clinical Trial in Patients with Relapsed/Refractory Breast Cancer. Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1998 ; 24 : 14-30

9) Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al : *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J Exp Med* 2005 ; 201 : 1307-1318

10) Fibbe WE, Pruijt JF, Velders GA, Opdenakker G, van Kooyk Y, Figdor CG, et al : *Biology of IL-8-Induced Stem Cell Mobilization. Ann NY Acad Sci* 1999 ; 872 : 71-82

11) Fukuda S, Bian H, King AG, Pelus LM : *The chemokine GRO β mobilizes early hematopoietic stem cells characterized by enhanced homing and engraftment. Blood* 2007 ; 110 : 860-869

12) Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE : *Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. Blood* 1995 ; 85 : 2269-2275

13) Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al : *Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. Blood* 2003 ; 102 : 2728-2730

- 14) Pelus LM, Fukuda S : *Peripheral blood stem cell mobilization : The CXCR2 ligand GRO β rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. Experimental Hematology 2006 ; 34 : 1010-1020*
- 15) Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O : *Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. Cell Signal 2006 ; 18 : 174-182*
- 16) Sattler M, Winkler T, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Salgia R, et al : *Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. Blood 1999 ; 93 : 2928-2935*
- 17) Ghaffari S : *Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. Antioxid Redox Signal 2008 ; 10 : 1923-1940*
- 18) Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A : *Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. Antioxid Redox Signal. 2008 ; 10 : 1883-1894*
- 19) Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E : *Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005 ; 4 : 471-479*
- 20) Heneberg P, Draber P : *Regulation of cys-based protein tyrosine phosphatases via reactive oxygen and nitrogen species in mast cells and basophils. Curr Med Chem 2005 ; 12 : 1859-1871*
- 21) Lum H, Roebuck KA : *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol 2001 ; 280 : C719-741*
- 22) Wolin MS : *Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 ; 20 : 1430-1442*
- 23) Papayannopoulou T : *Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. Blood 2004 ; 103 : 1580-1585*
- 24) Fluhauf S : *It's moving day : Factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement. Br J Haematol 2003 ; 122 : 360-375*
- 25) Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L : *Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. Cell 1990 ; 62 : 435-45*
- 26) Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, magata K, Uchiyama T, et al : *Reproducible establishment of hemopoietic supportive cells lines from murine bone marrow. Exp Hematol 1989 ; 17 : 145-153*
- 27) Kidney JC, Proud D : *Neutrophil transmigration across human airway epithelial monolayers. Am J Respir Cell Mol Biol 2000 ; 23 : 389-395*
- 28) Sibille Y, Reynolds HY : *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis 1990 ; 141 : 471-501*
- 29) Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al : *Sudden-onset fatal asthma : A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? Am Rev Respir Dis 1993 ; 148 : 713-719*
- 30) Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ, et al : *Bronchoscopic evaluation of severe asthma : persistent inflammation associated with high dose corticosteroids. Am J Crit Care Med 1997 ; 156 : 737-743*
- 31) Woo CH, Yoo MH, You HJ, Cho SH, Mun YC, Seong CM, et al : *Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B₄ is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase-linked cascade. J Immunol 2003 ; 170 : 6273-6279*
- 32) Fialkow L, Wang Y, Downey GP : *Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. Free Radic Biol Med 2007 ; 42 : 153-64*
- 33) Chiarugi P, Buricchi F : *Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation : two cross-talking post-translation modifications. Antioxid Redox Signal 2007 ; 9 : 1-24*
- 34) Chiarugi P, Fiaschi T : *Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. Cell Signal 2007 ; 19 : 672-682*
- 35) Burrige K, Sastry SK, Sallee JL : *Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases. I. Cell-matrix adhesion. J Biol Chem 2006 ; 281 : 15593-15596*
- 36) Wang Q, Doerschuk CM : *Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells : roles of ICAM-1 and reactive oxygen species. J Immunol 2000 ; 164 : 6487-6494*
- 37) Meier B, Radeke HH, Selle S, Habermehl GG, Resch K, Sies H : *Human fibroblasts release low amounts of reactive oxygen species in response to the potent phagocyte stimulants, serum-treated zymosan, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B₄ or 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. Biol Chem Hoppe Seyler 1990 ; 371 : 1021-1025*