



프로폴리스와 혼합된 사탕무 사양꿀, 아까시꿀 그리고 밤꿀에 의한 대식세포 면역 분자 발현 변화

김성국, 김효영, 최홍민, 김세건, 김선미, 이혜진, 문효정, 이영신, 유 식, 한상미, 이대영¹, 우순옥*
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 양봉생태과, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 특용작물이용과

Difference of Immune-related Protein Expression of Sugar Beat, Robina, and Chestnut Honey Mixed with Propolis in Raw264.7 Macrophage

Sung-Kuk Kim, Hyo Young Kim, Hong Min Choi, Se Gun Kim, Seon Mi Kim, Hye Jin Lee, Hyo Jung Moon, Young Sin Lee, Sik Ryu, Sang Mi Han, Dae Young Lee¹ and Soon Ok Woo*

Department of Apiculture, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

¹Industrial Crop Utilization Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract

Honey and propolis is a representative bee products, and mankind has been using it to treat wounds healing since ancient times. Recently, there has been increased interest in the immune response of the human body with regard to the CoVID-19 Pandemic, which has led to increased interest in the immune effects of honey and propolis. We investigated that antioxidant-related biological functionality of various honey mixed with propolis using the Raw264.7 macrophage. We used 500 g of 3-types of honey (Sugar beat, acacia and chestnut) mixed with 50 mL of propolis each. LD50 value of each honey mixed with propolis was determined 20 μ L /mL by MTT cytotoxicity assay. Nitric oxide (NO) assay showed that chestnut honey enhanced NO production and propolis reduced NO production. NO production level of chestnut honey was about 50% compared to LPS. Also, chestnut honey increased expression level of COX-2 and NF- κ B p50 as inflammation marker protein and propolis was decreased. NRF-2 as signaling molecule of HO-1 and antioxidant protein HO-1 was only increased in acacia honey+ propolis and chestnut honey+ propolis mixture group. Sugar beat honey+ propolis was did not. This result means 3-points. First, biological synergistic effects of honey mixed propolis. Secondary, difference of immune-related function of honey type. Finally, significance of natural honey compared to artificial honey.

Keywords

Honey, Propolis, HO-1, Antioxidant, Immune

서 론

대식세포는 세균 감염 또는 암 발생과 성장에 대한 인체 방어에 첫 번째 단계로서 적응 면역 반응의 시작에

있어 매우 중요한 역할을 담당한다(Hamsa and Kuttan, 2011). 일반적으로 대식세포는 lipopolysaccharide (LPS)와 muramyl dipeptide와 같은 세균 유래 물질에 의해 자극을 받아 분화되고, 세포 내의 각종 사이토카인과 면역 분자

를 발현하며 일산화질소(nitric oxide, NO)를 생성하여 방출한다(Akira and Kishimoto, 1996; Lee *et al.*, 2004). 대식 세포에서 발현되어 방출된 사이토카인 종류들은 종양 억제 활성을 보이기도 하지만 세포에서 염증 반응을 활성화시킨다. COX-2의 경우 대표적 염증성 인자로서 세포 자극 시에 강하게 발현되며, NF- κ B는 50 kDa의 분자의 발현이 증가하게 된다. 특히, heme oxygenase (HO)의 경우 heme의 분해 대사과정에 관여하는 효소로서 heme을 분해하여 biliverdin, 일산화탄소 등을 생성시킨다(Tenhunen *et al.*, 1970). Biliverdin은 빌리루빈으로 전환되는데, 빌리루빈은 강력한 항산화 작용을 나타내어 산화적 손상 모델에서 세포 보호 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Baranano *et al.*, 2002). HO는 HO-1, HO-2, HO-3라는 3개의 아형을 가지고 있으며, 세포 형태 및 조직에 따라 발현과 조절이 다르게 나타난다(Tenhunen *et al.*, 1970; McCoubrey *et al.*, 1997). 이 중 HO-1은 32 kDa의 분자량을 가지며, 간이나 비장에서 높게 발현되는데, 저산소, 방사선, 중금속, 활성산소 등의 세포 스트레스 자극에 의해 세포질에 존재하는 NRF-2 발현이 증가하여 핵으로 이동하면서 HO-1의 발현을 증가시킨다. 증가된 HO-1은 염증성 인자에 의한 전염증성 단백질 발현을 차단하여 염증을 억제하며, 특히 apoptosis 조절에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Choi *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003).

꿀과 프로폴리스는 꿀벌에 의해서 밀원과 식물에서 수집되어 생산되는 가장 대표적인 양봉산물이다. 지금까지의 연구에 의해 꿀과 프로폴리스에 다양한 생물학적 가능성이 밝혀졌는데, 꿀의 경우 항염증, 항산화 및 항균제로 사용되며(Al-Waili *et al.*, 2014). 프로폴리스는 항균(Sforzin, 2000), 항산화(Jeong, 2004), 항염증(Khayyal, 1993) 및 항종양(Bazo *et al.*, 2002) 등에 활성을 보이는 것으로 알려졌다. 최근 연구에서는 꿀과 프로폴리스의 면역조절 효과에 대한 연구가 집중되고 있다(Majtan *et al.*, 2010; Nani *et al.*, 2021). 이는 꿀과 프로폴리스에 함유되어 있는 폴리페놀과 플라보노이드 성분에 의한 것이며, 특히 항염증에 대한 효과는 항산화 활성을 기초로 한 활성산소와 질소종의 제거로 기전이 알려져 있다(Lee and Lee, 2006). 그러나 꿀과 프로폴리스에 의한 면역 조절과 관련된 분자 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다.

특히 대한민국에서 프로폴리스는 건강기능식품으로 등록되어 있는데, 프로폴리스는 독특한 향과 맛으로 인해 강한 거부감을 유발하고 특히 프로폴리스의 정제 시에 사용

되는 주정으로 인해 알콜로 인한 섭취 제한이 발생되어 어린이들이 섭취하기 어렵다. 이에 본 연구에서는 프로폴리스를 꿀과 혼합하여 독특한 향과 맛을 제거하고 알콜에 의한 부작용을 최소화하고자 하며, 동시에 항산화 관련 분자인 HO-1의 발현 조절과 신호 기전에 대해 꿀과 혼합된 프로폴리스의 효과를 확인하고자 하였다. 또한 사탕무 사양꿀(Sugar Beat Honey, SBH), 아카시꿀(Acacia Honey, AH) 그리고 밤꿀(Chestnut Honey, CH)의 3종류와 혼합된 프로폴리스를 사용하여 혼합된 꿀의 종류에 따라 나타나는 항산화 관련 기능을 확인하고자 하였다(사탕무 사양꿀+프로폴리스: SBHP, 아카시꿀+프로폴리스: AHP, 밤꿀+프로폴리스: CHP). 이를 이용하여 보다 손쉽게 섭취할 수 있는 꿀 혼합 프로폴리스의 제형 제작과 더불어 천연꿀과 혼합된 프로폴리스의 면역 조절 기능성의 우수성을 입증하고자 한다.

재료 및 방법

1. 꿀 혼합 프로폴리스 제형의 제작

실험 재료로 사용한 꿀 혼합 프로폴리스는 대한민국 양봉농협에서 판매하고 있는 프로폴리스 추출물 50 mL(총 플라보노이드 함량 30 mg/g 이상)을 사탕무 사양꿀, 아카시꿀 그리고 밤꿀 500 g에 각각 첨가하고 2시간 동안 교반하여 제작하였다. 제작한 꿀 혼합 프로폴리스 5 mL에 80% 에탄올을 동량 혼합하여 vortex하고 여기에 멸균 증류수 10 mL을 첨가하여 vortex하였다(최종 20% 에탄올을 포함하는 20 mL의 꿀 혼합 프로폴리스). 세포에 처리하기 위해 0.45 μ m의 syringe filter에 여과하여 최종 시료를 준비하였다.

2. 배지 및 시약

세포 배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), penicillin-streptomycin은 Gibco (U.S.A.)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)은 GenDEPOT (Korea)에서 구입하였다. 세포에 자극을 주기 위한 LPS는 Sigma (U.S.A.)에서 구입하였으며, 단백질 추출에 사용된 Nonidet P-40 (NP-40) 완충액은 Invitrogen (U.S.A.)에서 구입하였다. 세포 생존율을 측정하기 위한 EZ-Cytox Plus solution은 DoGenBio (Korea)에서 구입하였고, NO 생성 평가를 위한 NO assay kit는 iNtRON biotechnology (Korea)

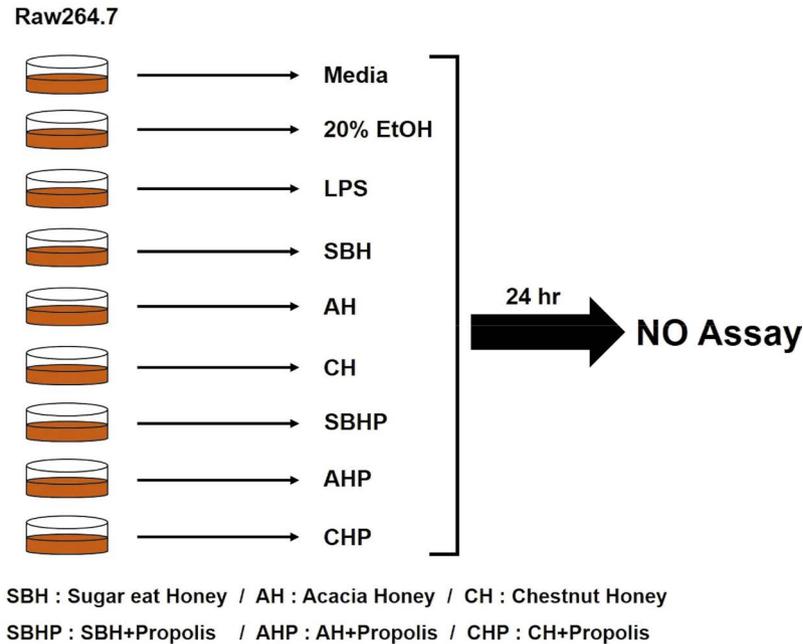


Fig. 1. The condition of cell treatment for NO assay.

에서 구입하였다. Western blotting에 사용된 COX-2, NF-κB 그리고 GAPDH는 Santacruz Biotechnology (U.S.A.)에서 구입하였으며, HO-1, NRF-2는 Cell Signaling Technology (U.S.A.)에서 구입하였다. 또한 2차 항체로 사용한 goat anti-mouse-HRP와 goat anti-rabbit-HRP는 GenDEPOT에서 구입하였다.

3. 실험 세포주

실험에 사용한 mouse Raw264.7 대식세포는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 세포 배양은 DMEM 배지에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10%의 FBS가 첨가된 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37°C로 유지되면서 5%의 CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다.

4. 꿀 혼합 프로폴리스 시료의 세포 독성 평가

Raw264.7 대식세포에 대해 시료가 가진 세포 독성 및 실험 농도 설정을 위해 꿀 혼합 프로폴리스를 세포에 처리하여 LD₅₀ 농도를 확인하였다. Raw264.7 세포는 96-well plate에 2 × 10⁴ cell/well의 수로 계수하여 분주하고 24시간 동안 배양시켰다.

SBH, AH, CH, SBHP, AHP 그리고 CHP를 각각 1, 3, 5, 10, 20, 30 그리고 50 μL/mL로 세포에 처리하여 세포 독성

을 확인하였다. 24시간 동안 처리 후 EZ-cytox solution을 배지 부피의 1/10로 처리하고, 37°C 세포 배양기에서 2시간 반응시킨 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 시험에 대한 대조구로서 배지만 있는 무처리구와 용매 대조구로 20% 에탄올을 처리한 세포를 비교하였다.

5. 꿀 혼합 프로폴리스의 NO 생성 평가

세포 독성 평가를 바탕으로 결정된 꿀 혼합 프로폴리스를 세포에 처리하여 (20 μL/mL) NO 생성에 대한 효과를 확인하였다. Raw264.7 대식세포를 12-well plate에 1 × 10⁵ cell/well로 접종하고 24시간 후 꿀과 꿀 혼합 프로폴리스를 처리하였다. 이들에 의해 생성되는 NO 양과 염증 반응시에 생성되는 NO 양의 상대적인 비교를 위해 1 μg/mL의 lipopolysaccharide (LPS)만을 처리한 실험 그룹을 추가하였다. Fig. 1에 실험 조건을 도식화하였다.

24시간 반응 후 배양액을 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 회수한 뒤, iNtRON (Korea)의 NO Assay kit를 사용하여 생성된 NO 양을 측정하였다.

6. Western blotting

NO 평가에서 회수된 세포에 NP-40 lysis buffer를 처리

하고 단백질을 추출하였다. Cell scraper를 이용하여 세포를 완전히 용해한 뒤, 17,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 추출된 단백질은 bicinchronic acid (BCA) 단백질 정량법으로 정량하고, 20 µg의 단백질을 4~15% gradient gel에 전개하였다. 전개된 단백질은 transblot unit (Bio-Rad, U.S.A.)을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하고, 항체의 비특이적 반응을 차단하기 위해 2% non-fat dry milk로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 COX-2 (1 : 5,000), NF-κB (1 : 500), HO-1 (1 : 3,000), NRF-2 (1 : 1,000), 그리고 GAPDH (1 : 5,000)를 2% non-fat dry milk에 각각 희석한 뒤, 실온에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 1× tris-buffered saline-tween-20 (TBS-T) 용액으로 membrane을 4회 수세하고, 1차 항체 생산 host에 맞춰 goat anti-rabbit-HRP 또한 goat anti-mouse-HRP를 1 : 2,000으로 5% non-fat dry milk에 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 1× TBS-T 용액으로 membrane을 4회 수세한 후, ECL pico detection system (GenDEPOT, Korea)으로 발색 후, ChemiDOC (Bio-Rad, U.S.A.) 장치에서 단백질 띠를 검출하였다.

결과 및 고찰

1. 꿀 혼합 프로폴리스의 세포 독성 평가

제작된 꿀 혼합 프로폴리스의 세포 적정 처리 농도를 설정하기 위해 세포 독성 평가를 실시하였다. 프로폴리스, SBH, SBHP, AH, AHP, CH, CHP를 Raw264.7 대식세포에 처리하고 24시간 후 세포 독성을 측정한 결과, 무처리구와 에탄올 처리구에서는 세포 독성이 나타나지 않았으나 프로폴리스만을 단독으로 처리한 경우, 20 µL/mL 조건에서 약 60%의 세포 생존을 나타냈다. SBH와 AH에서는 세포 독성이 나타나지 않았으나, CH에서는 50 µL/mL로 처리하였을 때 세포 독성이 나타났다. 그러나 프로폴리스가 혼합된 SBHP, AHP, CHP는 20 µL/mL의 조건에서 모두 60% 정도의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 2). 이는 꿀과 프로폴리스가 혼합되면서 첨가된 프로폴리스에 의해 나타난 세포 독성을 의미하며, 본 결과에 의해 세포에 처리할 LD₅₀ 농도는 20 µL/mL의 조건으로 설정하였다.

2. 꿀 혼합 프로폴리스에 의한 NO 생성 효과

SBH, AH, CH, SBHP, AHP, CHP의 처리에 의해 나타나는 면역 반응을 확인하기 위해 우선 NO 분자 생성을 평가하였다. 제작한 시료를 Raw264.7 대식세포에 처리하여 24시간 반응시키고 상층액을 회수하여 생성된 NO 분자의 양을 ELISA로 측정하였다. Fig. 3의 결과를 보면 LPS에 의한 염증 반응으로 생성되는 NO 양과 비교해볼 때, 프로폴리스와 SBH, AH, SBHP, AHP에 의해서는 대조구와 비슷한 수준의 NO 생성을 나타냈다. 그러나 CH의 경우 LPS로 인한 NO 생성에 비해 약 50% 수준의 NO를 발생시켰으며, CHP의 경우에는 다시 대조구와 비슷한 수준의 NO 생성을 나타냈다. 이는 순수 CH에 의해서는 세포에서 NO 생성을 발생시키지만 CHP의 경우 혼합된 프로폴리스에 의해 NO 생성이 억제됨을 나타낸다.

3. 꿀 혼합 프로폴리스에 의한 세포 내 HO-1 발현 분석 및 신호 전달

꿀 혼합 프로폴리스에 의한 대식세포 내 면역관련 분자에 대한 발현을 확인하기 위해 Western blotting을 실시하였다(Fig. 4). COX-2의 경우 특이하게 프로폴리스, SBH, AH, SBHP, AHP가 처리된 세포에서는 발현을 검출되지 않았으나, CH를 처리한 세포에서 강한 발현을 나타냈으며, CHP의 경우에는 프로폴리스의 혼합으로 인해 COX-2의 발현이 감소된 것이 나타났다. 이는 CH로 인한 대식세포의 활성화를 의미하며, 동시에 염증 활성을 보이는 것을 의미한다. 그러나 CHP의 경우에는 프로폴리스의 염증 저해 활성으로 감소된 것을 의미한다. NF-κB의 경우에도 CH가 처리된 세포에서는 50 kDa의 단백질이 다른 시료에 비해 높은 발현을 나타냈으며, CHP는 프로폴리스로 인해 발현이 감소되었다. 세포 내 항산화와 관련된 주요 분자인 HO-1의 경우 다른 시료에서는 발현 증가가 나타나지 않았으나 AHP와 CHP에서 발현이 증가되었고, 특히 CHP에서 높은 발현 수준을 나타냈다. 특이하게도 SBHP에서는 발현 증가가 나타나지 않았는데, 이는 사양꿀과 천연꿀에 의한 차이로 보여지며, 천연꿀과 프로폴리스가 혼합되었을 경우에만 높은 발현을 나타냈다. 즉, 천연꿀과 프로폴리스가 혼합되었을 때에만 세포 자체의 항산화 활성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다. HO-1 발현을 조절하는 것으로 알려진 NRF-2의 경우 HO-1이 증가된 AHP와 CHP에서 발

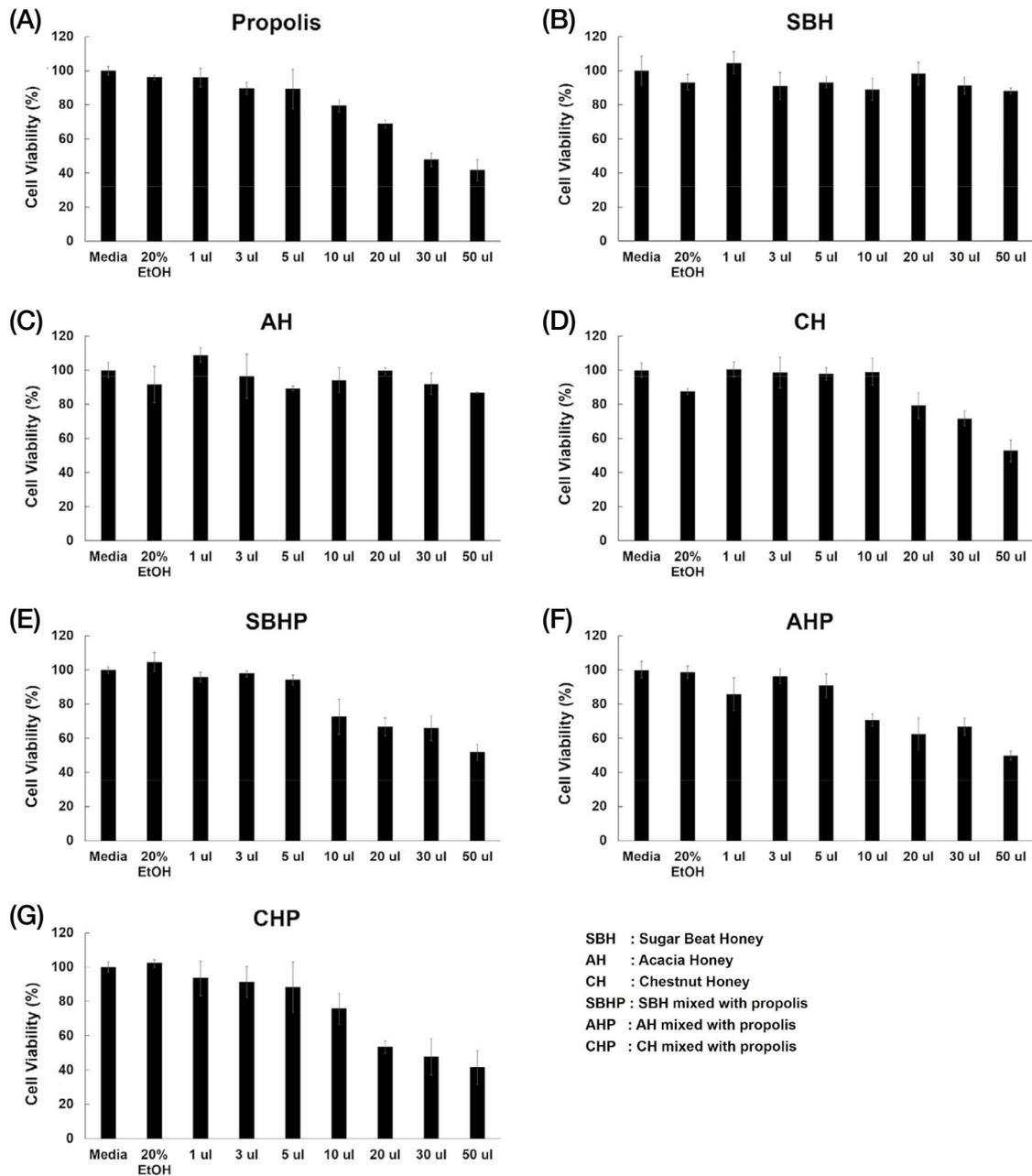


Fig. 2. Cytotoxicity effect of various honey and honey mixed with propolis. Volume-dependent propolis, SBH, AH, CH, SBHP, AHP and CHP treated to Raw264.7 for 24 hr. After incubation, add the EZ-cytox solution with 1/10 volume of media. Measurement of optical density at 450 nm.

현이 증가되었고, 이는 HO-1의 신호 전달 과정을 AHP와 CHP에 의해 조절되고 있음을 의미한다.

꿀과 프로폴리스의 면역 관련 기능성은 현재까지 수많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 항산화와 관련된 연구가 많이 이루어지고 있다. 기존 연구는 꿀 혹은 프로폴리스만 단독으로 사용하여 면역 조절에 대한 연구를 수행하

였다(Afrin *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). 그러나 본 연구에서는 꿀과 프로폴리스를 혼합함으로써 나타나는 세포의 면역 조절 분자의 발현에 대해 최초로 보고하며, 대표적인 양봉산물 두 종류를 혼합함으로써 나타나는 기능성 상승 효과에 대해 연구하였다. 특이한 점은 밤꿀과 프로폴리스를 혼합함으로써 세포의 면역 활성을 증가시키면서도

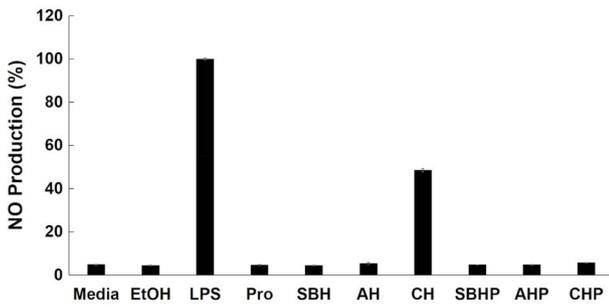


Fig. 3. NO assay with various honey and honey mixed with propolis. 1 µg/mL of LPS and 20 µL/mL of various honey and honey mixed with propolis were incubated for 24 hr. NO assay performed followed manufacture's protocol. Optical density measured at 540 nm.

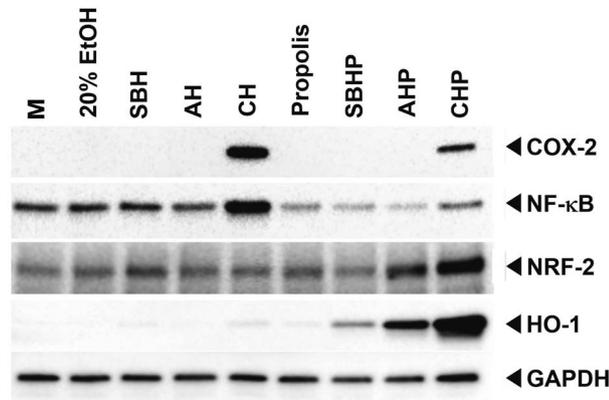


Fig. 4. AHP and CHP increased antioxidant-related HO-1 expression. 20 µg of protein resolved 4~15% gradient gel. All antibodies diluted in 2% non-fat dry milk and its dilution ratio was described at "Material and Method".

밤꿀에 의해 발생될 수 있는 염증성 부작용을 경감시킬 수 있는 효과적인 제형을 확인한 것이다. 또한 천연꿀에 해당하는 아까시꿀과 밤꿀 그리고 사탕무만으로 채취한 사탕무 사양꿀을 각각 프로폴리스와 혼합하여 HO-1 단백질 분자의 발현 차이를 검증함으로써 야생에서 채취되는 천연꿀의 중요성을 함께 보여주고 있다. 본 연구를 통해 프로폴리스를 꿀과 함께 혼합하여 섭취가 용이한 제형을 개발하였으며, 꿀의 종류에 따른 면역성 작용의 차이를 *in vitro* 에서 입증하였고, 이와 함께 아까시꿀, 밤꿀 그리고 사탕무 사양꿀에 프로폴리스를 혼합하여 나타나는 면역 단백질 발현을 구명함으로써 천연꿀의 중요성을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 면역 조절에 대한 꿀과 혼합된 프로폴리스 제형의 상세한 기전을 밝힘으로써 건강기능식품으로서 가치를 높이고, 양봉산물의 활용이 널리 이루어질 것을 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다연구사업 (과제번호: RS-2021-RD010155)에 의해 수행되었습니다.

인용 문헌

- Afrin, S., M. Gasparrini, T. Y. Forbes-Hernandez, D. Cianciosi, P. Reboledo-Rodriguez, P. P. Manna, M. Battino and F. Giampieri. 2018. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 1: Enhancement of cellular viability, regulation of cellular apoptosis and improvement of mitochondrial functionality. *Food Chem. Toxicol.* 121: 203-213.
- Akira, S. and T. Kishimoto. 1996. Role of interleukin-6 in macrophage function. *Curr. Opin. Hematol.* 1: 87-93.
- Al-Waili, N. S., F. S. Al-Waili, M. Akmal, A. Ali, K. Y. Salom and A. A. Al Ghamdi. 2014. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. *Arch. Med. Sci.* 10: 246-250.
- Baranano, D. E., M. Rao, C. D. Ferris and S. H. Snyder. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 16093-16098.
- Bazo, A. P., M. A. Rodrigues, S. M. Sforcin, J. L. de Camargo, L. R. Ribeiro and D. M. Salvadori. 2002. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22: 183-194.
- Choi, B. M., H. O. Pae and H.T. Chung. 2003. Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1136-1145.
- Hamsa, T. P. and G. Kuttan. 2011. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of *Ipomoea obscura* (L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation* 34: 171-183.
- Jeong, I. Y. 2004. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 162-166.
- Khayyal, M.T., M.A. el-Ghazaly and A.S. el-Khatib. 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp. Clin. Res.* 19: 197-203.
- Kim, S.-K., S. M. Han, S. G. Kim, H. Y. Kim, S. Ryu and S. O. Woo. 2021. The mechanism of anti-inflammation effects of propolis components in Raw264.7 macrophage cell. *J. Apic.* 36: 243-250.
- Lee, E. S., H. K. Ju, T. C. Moon, E. Lee, Y. Jahng, S. H. Lee, J. K. Son, S. H. Baek and H. W. Chang. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-kappa B activation in cultured

- murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 617-620.
- Lee, K. W. and H. J. Lee. 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 26: 105-121.
- Majtan, J., P. Kumar, T. Majtan, A. F. Walls and J. Kloudiny. 2010. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 19: e73-e79.
- McCoubrey, W. K. Jr, T. J. Huang and M. D. Maines. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247: 725-732.
- Nani, A., B. Murtaza, A. Sayed Khan, N. A. Khan and A. Hichami. 2021. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. *Molecules* 26: 985-999.
- Sforzin, J. M., A. Fernandes Jr., C. A. Lopes, V. Bankova and S. R. Funari. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis anti-bacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73: 243-249.
- Tenhunen, R., H. S. Marver and R. Schmid. 1970. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421.
- Wagner, M., P. Cadetg, R. Ruf, L. Mazzucchelli, P. Ferrari and C.A. Redaelli. 2003. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int.* 63: 1564-1573.