내독소에 의해 유도된 급성 폐손상에서 호중구의 산소기 생성에 미치는 Phospholipase A₂의 역할

대구가톨릭의과대학 마취과학교실, *생리학교실,
†영남대학교 의과대학 마취과학교실

노운석·구본업[†]·이영만*

= Abstract =

Inhibition of Phospholipase A₂ Ameliorates the Acute Lung Injury Induced by E Coli Endotoxin via Reduced Production of Oxygen Free Radicals in the Lung

Woon Seok Roh, M.D., Bon Up Koo, M.D.[†], and Young Man Lee, M.D.*

Departments of Anesthesiology and *Physiology, Daegu Catholic University,
[†] Department of Anesthesiology, Yeungnam University School of Medicine, Daegu, Korea

Background: In order to understand the pathogenetic mechanism of sepsis-induced acute lung injury, inhibition of phospholipase A₂ (PLA A₂) was carried out in an endotoxin-induced septic lung model.

Methods: Sprague-Dawley rats were divided three groups; sham group, endotoxin group (instillation of E coli endotoxin, 100µg/rat, type 017) and mepacrine group (the non-specific PLA₂ inhibitor, 50 ml/kg intraperitoneal injection after endotoxin treatment). Five hours after endotoxin treatment, protein contents, neutrophils counts, γ-glutamyl transpeptidase (GGT) activity and surfactant concentrations in the bronchoalveolar fluid (BAL), myeloperoxidase (MPO) and PLA₂ activity in the lung were measured. A morphological study for the effect of the endotoxin and mepacrine, and a cytochemical electron microscopy for detection of hydrogen peroxide in the lung were also performed.

Results: Endotoxin increased the concentrations of protein, the number of neutrophils, and GGT activity in the BAL fluid, MPO and PLA₂ activity in the lung but mepacrine decreased these parameters (P < 0.001). The light density of surfactant was increased by the endotoxin (P < 0.001), but mepacrine diminished this pathological change. In the light microscopic findings, the endotoxin caused pulmonary accumulation of neutrophils, atelectasis and transudation of intravascular protein was observed. In contrast, mepacrine lessened these pathological findings. In ultrastructural findings, adhesion of neutrophils to endothelial cells, necroses of type II cells and endothelial cells, and the damage of lamellar bodies were observed after the endotoxin treatment, which recovered with mepacrine. In the cytochemical electron microscopy for detection of hydrogen peroxide in the lung, the deposits of cerrous perhydroxide were increased by the endotoxin but mepacrine decreased deposits of cerrous perhydroxide.

논문접수일 : 2001년 2월 4일

책임저자 : 노운석, 대구광역시 남구 대명 4동 3056-6, 대구효성가톨릭대학병원 마취과학교실, 우편번호: 705-034

Tel: 053-650-4504(연구실), 650-4885(의국), Fax: 053-650-4517, E-mail: usno@cuth.cataegu.ac.kr

박사학위 논문임.

Conclusions: Inhibition of PLA₂ in an endotoxin induced acute lung leak showed protection against oxidative stress by a diminution of neutrophilic respiratory bursts and a decreased production of free radicals. It is suggested that PLA₂ has a pivotal role in causing acute oxidative stress in endotoxin induced acute lung injury. (*Korean J Anesthesiol* 2001; 41: 86~97)

Key Words: Lung: adult respiratory distress syndrome; endotoxin; phospholipase A₂; respiratory burst.

서 론

폐혈증에 의한 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)의¹⁾ 폐장내 병리학적 소견은 염증세포, 특히 호중구(neutrophil)의 침윤과 혈관 내피세포의 손상 및 alveolar epithelial barrier를 구성하는 제 1형, 2형 폐포세포의 손상 등이 특징이다.²⁾ 이러한 소견은 ARDS에서 공통적으로 보이는 소견이지만 내독소(endotoxin)에 의한 ARDS시 이러한 병리학적 변화의 원인은 아직도 확실하게 밝혀지지 않고 있다.³⁾

최근 Delclaux 등은⁴⁾ 내독소를 이용한 흰쥐의 ARDS 모델에서 호중구에 의한 조직 손상을 관찰하고, 이의 원인으로 산소기(oxygen free radical) 및 elastase의 작용 때문이라고 보고하였다. 혈중 내독소의 농도가 증가하면 대식세포에서의 proinflammatory cytokine, 특히 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-8 (IL-8) 등이 증가하며 이에 따른 염증반응의 결과가 조직손상의 원인이라고 보는 보고도 있다.⁵⁾ 이러한 점에서는 Lee 등과⁶⁾ Koh 등의⁷⁾ 보고는 흥미로운 것으로 IL-1을 흰쥐의 기도에 직접 주입하면 폐장의 손상이 관찰되고 여기에는 호중구의 산소기의 생성(respiratory burst)이 관여한다고 한다.

산소기가 인체의 방어기전 및 조직의 손상에 관여하는 것은 잘 알려져 있지만, 특히 폐장에 있어서는 호중구의 작용에 의한 산소기의 생성이 ARDS의 발병에 관여한다고 알려져 있다.⁸⁾ Dana 등은⁹⁾ 호중구에서 산소기 생성에 관여하는 호중구 세포막에 있는 NADPH oxidase의 활성화는 phospholipase A₂ (PLA₂)의 활성화로 만들어진 lipid mediators에 의한다고 보고하고, PLA₂가 호중구 및 염증세포의 산소기 생성에 직접적으로 관여한다고 하였다. 염증반응시 PLA₂ 활성도는 대식세포로부터 유래된 IL-1, TNF 등의 proinflammatory cytokine에 의해서도 증가한다고 한

다.¹⁰⁾ Lee는¹¹⁾ IL-1으로 유도된 급성 폐손상에서 PLA₂의 억제제는 조직의 손상을 감소시키고 호중구의 혈관 내피세포로의 유착을 감소시키고 호중구에서의 산소기 생성을 억제함을 보고하였다. 이러한 실험 결과들은 폐혈증에 의한 ARDS시 산소기의 작용이 조직의 손상과 직접적인 관계가 있고, 특히 혈관내피세포의 손상이 PLA₂의 작용과 관계가 있음을 나타낸다. 또한 조직내 PLA₂ 활성도의 증가는 ARDS시 surfactant의 대사 및 alveolar epithelial barrier의 기능에도 변화를 초래할 수 있음이 보고되고 있다.¹²⁾ 최근 Arbibe 등은¹³⁾ secretory type PLA₂의 일종인 group II PLA₂가 surfactant의 주성분인 dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)을 분해, lysophospholipids를 형성하고, 이 lysophospholipids에 의해 폐 조직의 손상이 유발된다고 보고하였다. 이러한 결과는 surfactant가 폐포 독성을 나타내는 lysophospholipid를 생성하는 PLA₂의 기질로서 작용함을 시사한다.

이러한 관점에서 본 연구는 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 급성 폐손상에서 산소기의 생성에 관여하는 PLA₂의 역할을 호중구에서의 산소기의 생성과 연관하여 알아봄으로써 폐혈증에 의한 ARDS의 병인론을 규명하고자 하였다. 특히 조직에서의 PLA₂의 활성도의 증가에 따른 산소기 생성을 증명하고 PLA₂의 억제에 따른 조직손상의 감소와 폐부종의 감소를 확인하여 ARDS의 발병에 있어서 산소기와 PLA₂ 및 호중구 역할의 중요성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

실험에 사용된 시약 중 L-α-dipalmitoyl-[2[9,10(N)-³H]palmitoyl]-phosphatidylcholine (DPPC)는 Dupont, NEN 사(USA)로부터 구입하였고 그 외의 모든 시약은 Sigma 사(USA)로부터 구입하였다. 실험동물은 체중 300 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 사용하였다.

실험군은 대조군, 내독소 투여군, 내독소 투여 후 PLA₂ 억제제 투여군으로 분류하였다. 대조군은 기도 내 0.5 ml의 생리적 식염수를 분무하였고, 내독소 투여군은 내독소(endotoxin, E. coli type 017) 100 μ g을 생리적 식염수에 녹여 기도내로 분무하였다. 내독소 투여 직후 PLA₂ 억제제 투여군은 내독소 투여 직후 mepacrine (quinacrine hydrochloride) 50 mg/kg를 복강 내로 투여하여 PLA₂를 억제하였다.

폐세척액의 단백질량

내독소 투여 5시간 후 혈관 내피세포의 손상에 따른 단백질의 폐포강내로의 유출을 확인하기 위하여 폐세척액(bronchoalveolar lavage fluid)내의 단백질량을 측정하였다. 폐세척(bronchoalveolar lavage, BAL)은 8.0 ml의 생리적 식염수를 기도로 주입하고 흡인하는 과정을 3회 반복하여 약 6.0 ml의 폐세척액을 얻었으며 이 폐세척액내의 단백질량을 Brown 등의¹⁴⁾ 방법에 따라 bicinchoninic acid를 이용하여 정량하였다.

폐장내 myeloperoxidase의 측정

폐장내 myeloperoxidase (MPO)의 측정은 Goldblum 등의¹⁵⁾ 방법에 따라 시행하였다. 생리적 식염수로 관류 pump (Millipore, USA)를 이용하여 폐장을 관류 세척한 후, 좌측폐장을 MPO 측정 전까지 -70°C로 보관하였다가 MPO 측정시 4.0 ml의 potassium phosphate 완충용액(20 mM, pH 7.4)에 조직을 녹인 후 Polytron PT 1200 homogenizer (Kinematica AG, Switzerland)를 이용하여, 조직을 분쇄한 뒤 18,000 rpm (Beckman, J2-MI high speed centrifuge, USA)으로 4°C에서 30분간 원심 분리하였다. 그 후 상층액을 버린 후 침전물을 4.0 ml의 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (50 mM potassium phosphate, pH 6.0)에 다시 부유시킨 후 90초간 sonication (Vibra cell, Sonics & Materials Inc, USA)하여 MPO를 분리하였다. 이후 60°C의 항온수조에서 120분간 반응시켜 조직내 MPO 분해효소를 불활성화 시킨 후 폐장 분쇄액 1.0 ml를 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. MPO 활성도의 측정은 MPO의 기질인 o-dianisidine을 100 ml의 potassium phosphate 용액(50 mM, pH 6.0)에 0.0168 g의 o-dianisidine을 녹인 용액으로 하였고 o-dianisidine과 반응하는 과산화수소 용액은 5×10^{-4}

M로 제작하여 0.5 ml의 이 용액을 o-dianisidine용액과 혼합하였다. 그 뒤 2.9 ml의 o-dianisidine용액에 0.1 ml의 lung homogenate 상층액과 반응시키고 이때 시간에 따른 흡광도의 변화를 460 nm에서 측정하였다.

조직내 phospholipase A₂의 측정

폐장내 phospholipase A₂ (PLA₂) 활성도의 측정은 Katsumata 등의¹⁶⁾ 방법에 따라 방사성 동위원소 기질인 L- α -dipalmitoyl-(2[9,10(N)-³H]palmitoyl)-phosphatidylcholine (30 Ci/mmol)을 이용하여 측정하였다. 즉, 양측폐장을 생리적 식염수로 관류세척한 뒤 우측폐장을 4.0 ml의 potassium phosphate 용액(20 mM, pH 7.4)을 첨가 후 분쇄하였다. 이 분쇄액을 90초간 sonication한 뒤 2.5 μ Ci의 L- α -dipalmitoyl-(2[9,10(N)-³H]palmitoyl)-phosphatidylcholine (30 Ci/mmol)과 100 μ l의 lung homogenate와 880 μ l의 100 mM glycine 완충용액(pH 9.0, 10 gm/L bovine serum albumin, 2.5 mM sodium deoxycholate, 0.1 mM DPPC, 2.0 mM CaCl₂, 1.75 M ethanol)과 혼합 후 37°C의 수조에서 60분간 반응시켰다. 이 반응은 200 mM의 EDTA를 함유한 200 μ l의 5% (v/v) Triton X-100 용액으로 정지시켰다. PLA₂에 의해 유리된 지방산은 0.1%의 acetic acid가 함유된 5.0 ml의 hexane 용액으로 추출 후 2.5 g의 Na₂SO₄를 첨가하여 단백질을 제거 후 β -scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Snake venom인 *Crotalus adamanteus* PLA₂ (0.01 U/ml)를 대조군으로 매 실험마다 동시에 반응시켜 reproducibility를 확인하였다. 이때 1 unit는 기질에서 지방산이 분당 1 μ M이 생성되는 것으로 하였다.

Pulmonary surfactant의 정량

Pulmonary surfactant의 주성분인 인지질을 정량하기 위해서는 각 실험군의 흰쥐에서 폐세척을 시행하여 폐세척액을 얻었다. 즉 8.0 ml의 생리적 식염수를 기도를 통해 주입하고 흡인하는 과정을 3회 반복하여 약 6.0 ml의 폐세척액을 얻은 뒤 1,500 rpm, 4°C에서 10분간 원침하여 상층액을 이용하여 인지질을 정량하였다. 인지질의 분리는 Folch 등의¹⁷⁾ 방법에 따라 지질을 분리하고 분리된 인지질 인은 Hess와 Derr의¹⁸⁾ 방법에 따라 정량한 뒤, Corbet 등의¹⁹⁾ 방법에 따라 인지질로 환산하였다. 즉 분리된 인지질은 60%의 perchloric acid 및 10 N의 황산용액 하에서 250°C 이

상의 silicon oil bath에서 20분간 가열하여, 유기물을 제거한 뒤 malachite green이 함유된 ammonium molybdate용액과 반응시켜 이때의 발색의 정도를 spectrophotometer를 이용하여 파장 660 nm에서 측정하였다. 또한 surfactant 대사의 변화를 측정하기 위하여 Putman 등의²⁰⁾ 방법에 따라 surfactant의 비중에 따라 분리후 위와 같은 방법으로 정량 하였다. 즉, 폐세척액에서 high density surfactant 및 low density surfactant를 분리하기 위하여 폐세척액을 40,000 × g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 침전물은 high density surfactant로, 상층액은 low density surfactant로 하였다. 내독소에 의한 급성폐손상시 surfactant기능의 변화를 surfactant 성분의 변화로 평가하였고, 전체량은 제 2형 폐포세포의 기능의 평가 지표로 이용하였다.

γ-glutamyl transpeptidase 활성도의 측정

조직내 산소기 생성의 증가에 따라 oxidative stress가 증가하면 glutathione의 생성에 관여하는 γ-glutamyl transpeptidase (GGT)의 활성도가 증가한다.²¹⁾ 내독소에 의한 폐장의 산소기의 작용에 따른 oxidative stress의 정도를 알아보기 위하여 폐세척액내의 GGT의 활성도를 Meister 등의²²⁾ 방법에 따라 측정하였다. 즉, 폐세척액에서 GGT의 활성도 측정을 위해 0.4 ml의 glycylglycine, 0.4 ml의 L-γ-glutamyl anilide와 0.2 ml의 폐세척액과 36°C의 수조에서 60분간 반응시켰다. 그 후 50 mM serine-borate 용액으로 반응을 중지시킨 후 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 1 unit는 분당 1μM의 p-nitroaniline이 생성되는 것으로 하였다.

폐장에서의 malondialdehyde의 정량

산소기의 lipid peroxidation에 의해 생성되는 lipid peroxide의 일종인 malondialdehyde (MDA)를 Carraway와 Piantadosi의²³⁾ 방법에 따라 정량하였다. 즉, 좌측 폐장을 4.0 ml의 20 mM potassium phosphate용액(pH 7.4)에 넣은 다음 Polytron PT1200으로 분쇄하고 이 분쇄액을 40,000 × g, 4°C에서 30분간 원심 분리한 뒤 그 상층액을 버리고 그 침전물은 0.5% hexadecyltrimethylammonium (0.5% HTAB, 50 mM potassium phosphate, pH 6.0) 4.0 ml에 다시 부유시킨 뒤 60°C의 수조에서 120분간 반응시킨 후 이것을 시료로 하였다. MDA의 측정을 위해서는 1.0 ml의 시료와 동

량의 3.5% sodium dodecyl sulfate 용액을 혼합하고 여기에 0.13 ml의 100% 초산을 가하여 혼합한 뒤 1 N NaOH 용액을 이용, pH를 3.5로 맞추었다. 이후에 5.0 ml의 0.6% thiobarbituric acid (TBA)를 첨가하여 95°C의 수조에서 30분간 가열하였다. 그 뒤 시료를 냉각한 뒤 n-butanol과 pyridine의 혼합액(15 : 1, v/v)과 혼합한 뒤 30초간 vortex한 다음, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

폐세척액내 호중구의 산정

폐세척액내의 호중구의 산정을 위해 8.0 ml의 생리적 식염수를 이용, 폐세척을 시행하였다. 즉, 8.0 ml의 생리적 식염수를 이용, 3회 폐세척을 시행하고, 약 6.0 ml의 폐세척액을 얻었다. 이 폐세척액을 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 인지질 및 단백질정량을 위해 -70°C에 보관하고, 침전물은 1.0 ml의 Hank's balanced salt solution (HBSS)과 1.0 ml의 증류수를 혼합하여 부유시켜 적혈구를 용혈시킨 뒤 다시 1,000 × g에서 5 분간 원심분리 하였다. 이후 상층액은 버리고 침전물은 1.0 ml의 생리적 식염수에 다시 부유시켰다. 이 중 200μl을 취하고 cytopspin을 이용하여 slide를 제작하고, Wright stain을 시행하여 differential count로 호중구의 수를 계산하였다.

형태학적인 관찰

내독소에 의한 조직내 염증세포의 침윤을 관찰하고 또한 PLA₂의 억제가 호중구 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조직을 무작위로 절취한 뒤 10%의 formalin에 포매하고 Reichert-Jung microtome 2040으로 박절한 뒤 hematoxyline-eosin용액으로 염색 후 검정하였다.

내독소에 의한 조직내 미세구조의 관찰을 위해 폐장조직을 1 mm³의 크기로 자른 뒤 2.5% glutaraldehyde 용액(4°C)에 고정하였다. 그 뒤 조직 내 공기를 제거한 뒤 세척 과정을 거치고, 0.1 M의 potassium phosphate용액에 담근 상태에서 overnight한 뒤 1%의 osmium tetroxide 용액으로 60분간 고정하였다. 그 후 각 농도의 에탄올로 탈수한 뒤 Epon-812 resin에 embedding한 뒤 Sorvall MT-7000 ultramicrotome에 mounting 후 diamond knife (Diatome, Pelco, USA)를 이용하여 박절하였다. 그 뒤 표본을 isoamyl acetate가

coating된 grid에 포집 후 uranyl acetate 및 lead citrate 로 염색하였다. 전자현미경 사진은 Hitachi H-600 투과 전자현미경을 이용, 75 kV의 전압에서 촬영하였다.

조직에서의 산소기 관찰을 위한 세포화학적 전자 현미경법

내독소에 의한 산소기 형성 및 PLA₂억제의 효과를 알아보기 위하여 cerium chloride를 이용한 세포화학적 전자현미경법(cytochemical electron microscopy)을 시행하였다. 즉 Briggs 등과²⁴⁾ Hobson 등의²⁵⁾ 방법을 변형하여, 조직에서의 과산화수소의 생성을 확인하였다. 내독소 주입 후 5시간 경과 후 폐장조직을 1 mm³의 크기로 무작위로 추출한 뒤 CeCl₃가 함유된 완충용액(2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 0.1 M Tris-maleate buffer, 7% sucrose, 0.0002% Triton X-100)에 넣어, 37°C 수조에서 60분간 반응 시켰다. 그 뒤 0.1 M Tris-maleate 용액과 0.15 M sodium cacodylate-HCl 용액으로 세척하였다. 그 후 조직을 2.5% glutaraldehyde 용액으로 고정하고 세척하는 과정을 거친 뒤 osmium tetroxide로 후고정한 뒤 Epoxy-resin에 embedding하였다. Cerium chloride는 과산화 수소와 반응하여 cerous perhydroxide를 형성하며, 전자 현미경하에서 electron dense granule 내지는 electron dense deposit으로 나타난다. 본 실험에서는 조직과 반응물의 contrast를 좋게 하기 위하여 counter stain은 시행하지 않았다.

모든 data는 Student-Newmann-Keuls test를 이용하여 검정하였고, P value가 0.05 이하인 것을 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

내독소에 의해 유도된 급성 폐손상에서 PLA₂의 억제제 폐장내 산소기의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위한 본 실험에서 내독소 투여 5시간 경과 후 혈관에서 간질조직 및 폐포세포내로 단백질의 유출은 현저히 증가하였다. 즉, 폐세척액내의 단백질함량은 대조군의 2.3 ± 0.6 (mg/two lungs)에서 내독소 투여 후 5.9 ± 1.4 로 유의하게 증가하였으나($P < 0.001$), mepacrine 투여 후 폐세척액내의 단백질함량은 3.3 ± 0.6 로서 내독소 투여군에 비해 감소하였다($P < 0.01$) (Fig. 1).

조직내의 호중구의 침윤 또는 leukostasis의 지표로서 측정된 MPO의 활성도는 내독소 투여 후 대조군의 5.2 ± 1.7 (U/g of wet lung)에 비해 35.2 ± 7.9 로 현저한 증가를 보였고 ($P < 0.001$), mepacrine 투여 후에는 18.0 ± 2.9 로 감소하여($P < 0.001$) PLA₂의 억제제 호중구의 폐장내 침윤을 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 2). 동시에 폐세척액내의 호중구의 수

Fig. 1. Instillation of endotoxin (E coli; type 017, 100 μ g/rat) into the lung increased protein content in BAL ($P < 0.001$). In contrast, mepacrine (50 mg/kg) after endotoxin decreased protein content in the BAL significantly ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, $^{\dagger}P < 0.001$, ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 2. Instillation of endotoxin (E coli; type 017, 100 μ g/rat) into the lung enhanced the lung myeloperoxidase (MPO) activity (U/g of wet lung) significantly ($P < 0.001$). In contrast, mepacrine after endotoxin lowered the MPO activity ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, $^{\dagger}P < 0.001$, ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

도 대조군의 0.05 ± 0.01 (million/two lungs)에서 내독소 투여 후에는 3.50 ± 1.21 로 현저히 증가하였고 ($P < 0.001$), mepacrine은 폐세척액내의 호중구의 수를 1.00 ± 0.38 로 감소시켰다($P < 0.001$)(Fig. 3). 내독소 및 mepacrine에 의한 PLA₂의 활성도의 변화는 Fig. 4와 같다. 대조군에서의 활성도의 변화는 33.8 ± 14.0 (mU/g of wet lung)이었으나 내독소 투여 후

128.6 ± 14.9 로 증가하였고($P < 0.001$) mepacrine을 투여 후에는 73.0 ± 18.9 로 감소하였다($P < 0.001$).

조직내 oxidative stress를 나타내는 지표로서의 GGT의 활성도는 대조군의 34.0 ± 9.1 (U/ml of BAL fluid)에 비해 내독소 투여 후 59.5 ± 10.1 로 현저히 증가하였으나($P < 0.001$) mepacrine 투여 후에는 43.3 ± 6.7 로서 대조군 수준으로 현저히 감소하였다($P < 0.01$)

Fig. 3. After the insult of endotoxin instillation (E coli; type 017, 100 μ g/rat), the number of neutrophils in the BAL fluid increased tremendously ($P < 0.001$) but, mepacrine after endotoxin decreased the increase of the number of neutrophils in the BAL fluid ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, $^{\dagger}P < 0.001$ ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 5. As an index of oxidative stress, γ -glutamyl transpeptidase (GGT) activity was enhanced by endotoxin ($P < 0.001$). In contrast, mepacrine diminished the increase of GGT activity caused by endotoxin ($P < 0.01$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, $^{\dagger}P < 0.01$, ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 4. Instillation of endotoxin into the trachea increased ($P < 0.001$) significantly phospholipase A₂ (PLA₂) activity in the lung. In contrast, treatment of mepacrine in endotoxin-instilled rats decreased ($P < 0.001$) the PLA₂ activity effectively. * $P < 0.001$, sham vs. endotoxin, $^{\dagger}P < 0.001$, ETX vs. ETX + mepacrine, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 6. Endotoxin (E coli; type 017, 100 μ g/rat) increased ($P < 0.001$) the concentration of light density surfactant which denoted the damage of surfactant system. In contrast, mepacrine diminished this change after endotoxin by decrease of light density surfactant ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, $^{\dagger}P < 0.001$ ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

(Fig. 5).

대조군에 비하여 내독소 투여군에서는 폐장의 손상시 증가하는 light density surfactant의 양은 대조군의 0.6 ± 0.3 (mM/g of wet lung)에서 2.2 ± 1.3 으로 증가하였고($P < 0.001$), mepacrine은 내독소 투여 후 light density surfactant의 양을 0.9 ± 0.5 로 감소시켰다($P < 0.001$)(Fig. 6). 반면, surfactant의 주성분인 heavy density surfactant는 내독소 투여 후 대조군의 35.6 ± 6.8 (mM/g of wet lung)에서 20.9 ± 5.4 로 현저히 감소($P < 0.001$)하였으나, 내독소 투여 후 mepacrine 투여하였을 때는 34.9 ± 8.2 로 high

density surfactant의 함량은 유의하게($P < 0.001$) 증가하여 대조군과 비슷한 값을 보였다(Fig. 7).

산소기에 의한 lipid peroxidation의 산물인 MDA는 대조군의 108.1 ± 38.3 (nM/g of wet lung)과 비교시 내독소 투여 후 301.8 ± 80.9 (nM/g of wet lung)로 현저히($P < 0.001$) 증가하여 내독소에 의한 산소기의 생성이 증가하였음을 알 수 있었고, mepacrine은 내독소 투여 후 MDA의 생성을 145.5 ± 50.6 으로 감소시켰다($P < 0.001$)(Fig. 8).

광학현미경적 소견에서 내독소 투여 후 폐장내에서는 호중구의 침윤 및 폐부종이 관찰되었으며 이러

Fig. 7. Endotoxin (E coli: type 017, 100 μ g/rat) decreased ($P < 0.001$) the amount of heavy type pulmonary surfactant which signifies the decreased secretion of pulmonary surfactant from alveolar type II cells. In contrast, mepacrine recovered the secretory activity of alveolar type II cells ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, † $P < 0.001$, ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 8. The production of malondialdehyde (MDA) was increased by endotoxin ($P < 0.001$) which evoked the neutrophilic respiratory burst, whereas mepacrine suppressed the respiratory burst by the inhibition of the PLA₂ and resulted in the decreased production of MDA in the lung ($P < 0.001$). Numbers of experiments are in the parentheses. * $P < 0.001$, sham vs ETX, † $P < 0.001$ ETX vs ETX + Mepa, ETX, endotoxin, Mepa, mepacrine

Fig. 9. Endotoxin (E coli; type 017, 100 μ g/rat) causes pulmonary accumulation of neutrophils and atelectasis in the light microscopy. Clumps of neutrophils are identified in the alveolar lumen (A, arrow, $\times 400$). Mepacrine after endotoxin mitigated the neutrophilic infiltration and pathological findings (B, $\times 400$).

한 변화는 mepacrine에 의해 현저히 감소하였다(Fig. 9A, 9B). 또한 전자현미경을 이용한 미세구조적 관찰에서는 내독소 투여 후 호중구의 혈관세포로의 유착과 혈관 내피세포의 괴사 및 세포막의 blebbing 등이 관찰되었으며, 무기폐 및 간질 조직의 부종이 관찰되었다. 특히 제 2형 폐포세포내의 lamellar body의 공포현상을 보이고, 호중구와 연결한 제 2형 폐포세포는 세포막의 손상과 lamellar body의 변성이 관찰되었다. 폐포강은 삼출물에 의해 혼탁하게 보였다

(Fig. 10A). 그러나 mepacrine을 투여한 군에서는 제 2형 폐포세포내 lamellar body가 비교적 잘 보존되고, 호중구의 침윤에도 불구하고 조직은 전반적으로 정상적 구조를 유지하였다(Fig. 10B).

조직내 산소기의 생성을 관찰하기 위한 세포 화학적 전자현미경 소견에서는 내독소 투여 후 과산화수소의 생성이 현저히 증가하고(Fig. 11A), 이러한 변화는 mepacrine에 의해 현저히 감소하였다(Fig. 11B).

Fig. 10. These pictures show the ultrastructural changes after endotoxin and mepacrine treatment in the lung. Endotoxin caused massive infiltration of neutrophils and adhesions of neutrophils to endothelial cells are observed (arrow). Alveolar type II cell shows vacant vacuoles in the cytoplasm which denotes the necrosis and malfunction of alveolar type II cell. Besides, denaturation of lamellar bodies are identified (A, $\times 3,500$). However, alveolar type II cells are relatively well preserved after mepacrine treatment. In addition, endothelial cells are intact and lamellar bodies in the cytoplasm of the alveolar type II cell are well preserved (B, $\times 4,000$).

Fig. 11. In the cytochemical detection of hydrogen peroxide in the lung, deposits of cerrous perhydroxide are observed in the vicinities of neutrophils and interstitium are found after endotoxin treatment (A, $\times 5,000$). After mepacrine, the deposits of cerrous perhydroxide was diminished dramatically (B, $\times 5,000$).

고 찰

Repine과 Parsons에²⁶⁾ 따르면 산소기의 작용 및 이에 대한 항산화 효소 및 산소기 scavenger의 작용의 균형이 깨어지면 oxidative stress에 의한 조직의 손상이 유발된다고 한다. 특히 폐장은 항상 고농도의 산소에 노출되는 장기이면서 해부학적으로는 모세혈관 및 폐포의 배열이 산소의 이동에 용이하도록 되어 있으므로 혈관내피세포 혹은 폐포세포의 손상은 직접적으로 산소 분자의 이동에 장애를 가져와 동맥혈 산소분압의 감소를 초래한다. ARDS에서 관찰되는 low pressure pulmonary edema는 주로 이 혈관내피세포의 손상에 의한 혈관내 단백질의 유출이 그 원인이라고 알려져 있고²⁷⁾ 그 원인으로는 산소기, elastase 및 염증반응시 조직 및 염증세포에서 유리되는 lipid molecule, cytokine 등에 의한 것이다.²⁸⁾ 내독소에 의한 급성 폐손상의 경우 폐세척액내의 proinflammatory cytokine 특히 IL-1 및 TNF는 증가하며,²⁹⁾ 이러한 cytokine은 PLA₂의 활성화에 관여한다.³⁰⁾

본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 내독소는 폐장에서의 혈중 단백질의 조직 및 폐포내로의 유출을 증가시킬 뿐만 아니라 MPO의 활성도를 증가시키고 폐세척액내의 호중구의 수도 증가시켰다. 이러한 실험결과들은 내독소에 의한 급성 폐손상시 호중구가 관여한다는 것을 시사한다. Guidot 등은³¹⁾ 호중구가 급성 폐손상에 관여하는 직접적인 실험적 증거를 isolated lung model에서 증명하고, 이러한 호중구의 역할에 의한 폐의 손상은 호중구에서의 산소기의 생성에 의한 것이라고 보고하고 있다.

호중구의 이러한 산소기의 생성에 따른 조직의 손상에 대한 증거로는 주로 cytokine의 작용 특히, IL-1, TNF 및 CINC (cytokine induced neutrophilic chemoattractant)와 같은 proinflammatory cytokine들과 관계가 있다.³²⁾ IL-1 및 TNF는 대식세포에서 유리되어 염증반응을 매개하며 특히 혈관내피세포의 손상 및 괴사에 관여한다. 즉 이러한 cytokine은 adhesion molecule 특히 P-selectin, L-selectin과 같은 adhesion molecule을 활성화하고,³³⁾ 또한 PLA₂의 활성화에도 관여한다.³⁴⁾ IL-8 또는 CINC는 호중구의 조직내 침윤을 유발하고 조직내에서의 호중구의 산소기 생성 전 단계에 중요한 역할을 한다.⁷⁾ 특히 PLA₂의 활성

도에 따른 lipid molecule의 유리는 조직의 손상과 직접적인 관계가 있다. 뿐만 아니라 arachidonic acid는 호중구에서의 산소기의 생성을 촉진하고,³⁵⁾ PLA₂의 억제제는 산소기 생성의 감소를 통해 조직의 손상을 경감시킨다. 또한 PLA₂ 활성도의 증가는 PAF의 생성을 증가시켜 호중구의 priming, 산소기의 형성 및 NFkB의 활성화에도 관여한다.³⁶⁾ 본 연구에서도 이러한 조직의 손상과 관련된 변화들이 내독소를 투여 후 관찰되었고, 또한 mepacrine에 의해 억제됨으로써 조직의 손상이 감소되었다. 내독소에 의한 PLA₂의 활성화는 새로운 사실은 아니지만 이때 생성되는 lipid molecule에 의한 산소기 생성은 호중구막의 NADPH oxidase의 활성화의 관계가 있고³⁷⁾ 따라서 PLA₂의 억제가 산소기 생성을 억제, 조직손상의 감소를 가져옴을 의미한다. 이러한 사실의 실험적 증거로서 본 연구에서는 GGT의 활성도가 내독소에 의해 증가하고 PLA₂의 억제가 GGT의 활성도를 감소시켰다. GGT는 oxidative stress시 세포내에서의 glutathione의 합성을 증가시켜 산소기의 독성을 억제한다.³⁸⁾

또한 본 연구에서의 내독소에 의한 lipid peroxidation의 증거, 즉 내독소에 의한 MDA의 증가는 내독소에 의해 산소기의 생성의 증가 및 이에 따른 조직의 손상을 의미한다. Mepacrine에 의한 MDA생성의 감소는 PLA₂의 작용에 의해 조직내의 lipid peroxidation이 증가하며, 이러한 과정의 차단, 즉 PLA₂의 억제는 lipid peroxidation의 감소를 가져옴을 나타낸다.

본 연구에서 이러한 산소기 생성에 따른 조직손상의 감소는 형태학적인 결과 및 세포 화학적인 실험 결과에서도 확인되었다. 즉 광학현미경적 소견에서 볼 수 있는 호중구의 침윤, 전자 현미경을 이용한 미세구조관찰에서의 혈관내피세포 및 alveolar epithelial barrier의 손상은 바로 산소기의 생성 즉 내독소에 의한 PLA₂의 활성화, 호중구막에서의 NADPH oxidase의 활성화에 따른 산소기의 생성이 그 원인임을 보여준다. 특히 제 2형 폐포세포의 형태학적인 변화는 ARDS 환자의 병리학적인 소견과 동일하다. Martensson 등³⁹⁾ 및 이 등은⁴⁰⁾ 폐장내 glutathione의 합성이 억제되어 oxidative stress가 유발되면 제 2형 폐포세포내의 lamellar body의 비후가 관찰된다고 하였다. 본 연구에 있어서 내독소 투여 후 제 2형 폐포세포의 변화 또한 이와 유사하여 lamellar body의 비후 및 공포현상이 관찰되었고, mepacrine에 의한

PLA₂의 억제제는 이러한 변화를 현저히 감소시켰다.

PLA₂는 그 기능상 PAF의 생성, adhesion molecule의 활성화 및 lipid molecule 생성의 key enzyme이다. 이러한 점에서 PLA₂의 억제는 내독소에 의한 손상을 막는데 중요한 역할을 한다. 최근, Dana 등에^{9,35)} 따르면 PLA₂의 활성화는 탐식구 세포막의 NADPH oxidase의 활성화에 불가결하다고 하며 이는 산소기 생성 및 ARDS시의 호중구의 역할에 있어 PLA₂의 기능이 중요한 역할을 담당함을 시사한다.

또한 PLA₂는 surfactant의 대사에도 관여하는데 surfactant의 주성분인 DPPC는 PLA₂의 기질로서 작용하며, Lewis 등은⁴¹⁾ ARDS시에는 surfactant의 성분 및 density에 따른 surfactant의 구성비가 달라진다고 하였다. 즉, *N*-nitroso-*N*-methylurethane (NNNMU)로 유도된 급성 폐손상에서 light density surfactant의 증가를 관찰하고 이것은 surfactant system의 기능의 저하와 관계 있다고 하였다. 본 연구에서는 내독소에 의해 surfactant의 감소, 즉 제 2형 폐포 세포에서의 분비의 감소 및 light density surfactant의 증가를 관찰할 수 있었다.

또한 Holm 등은⁴²⁾ PLA₂의 작용이 lysophosphatidylcholine의 생성을 증가시키므로 lysophosphatidylcholine의 생성이 alveolar barrier의 기능을 저해한다고 하였다. Arbibe 등은¹³⁾ secretory type의 일종인 group II PLA₂가 surfactant에 직접 작용하여 lysophospholipid의 생성을 증가시켜 직접적인 폐포세포에 손상을 준다고 보고하고 있다. 이러한 점에서 내독소에 의한 급성폐손상시 PLA₂의 활성화는 surfactant의 기능저하와도 관계가 있다. 특히 alveolar epithelial barrier 기능의 저하는 alveolar flooding을 유발하고 무기폐를 유도한다.

또한 호중구의 침윤에 따른 산소기의 생성은 surfactant의 주성분인 phospholipid의 lipid peroxidation에도 관여하여 surfactant의 기능을 저하시킨다. Lee와 Park은³⁶⁾ cytokine에 의한 급성 폐손상시, 형태학적으로 과산화수소와 제 2형 폐포세포에서의 lamellar body와 결합된 것을 관찰하고, 이러한 형태학적인 특징이 surfactant의 lipid peroxidation의 간접적 증거라고 하였다. 즉 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전에서 PLA₂의 활성화에 따른 호중구의 기능 변화의 기전은 lipid molecule에 의한 adhesion molecule의 활성화와 호중구의 유착 및 migration과 연결된다. Yokote 등

은⁴³⁾ PLA₂의 억제제는 이러한 adhesion molecule을 억제함으로써 조직의 손상을 억제한다고 하였다. 최근의 ARDS에 관한 연구동향을 감안하면, PLA₂ 및 PLA₂의 대사물인 PAF, 그리고 PAF의 대사에 관한 연구들이 활발하므로 이에 대한 지속적인 연구는 ARDS의 치료에 상당한 진전을 가져올 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구의 결과로 보아 내독소에 의한 급성 폐손상은 PLA₂의 활성화에 따른 호중구의 산소기의 생성이 그 기전의 일부인 것으로 생각되며 PLA₂에 의해 생성되는 lipid molecule이 이러한 oxidative stress의 원인인 것으로 생각된다. 따라서 PLA₂의 효과적인 억제제가 ARDS의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty PL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2: 319-23.
2. Elliott CG, Zimmermann GA, Orme JF, Morris AH, Mortensen JD: Granulocyte aggregation in adult respiratory syndrome: serial histologic and physiologic observations. *Am J Med Sci* 1985; 289: 70-4.
3. Connelly KG, Repine JE: Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Ann Rev Med* 1997; 48: 429-45.
4. Delclaux C, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, Brun-Buisson C, Lafuma C, Harf A: Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria induced acute lung injury in rat. *Am J Physiol* 1997; 273: L104-12.
5. Suter PM, Suter S, Girardin P, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM: High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon and elastase in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 145: 1016-22.
6. Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE: Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1624-8.
7. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced lung leak in rats. *J Appl Physiol* 1995; 79: 472-8.
8. Tate RM, Repine JE: Neutrophils and the adult respi-

- ratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 552-9.
9. Dana R, Malech HL, Levy R: The requirement for phospholipase A₂ for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J* 1994; 297: 217-23.
10. Pruzanski W, Vadas P: Phospholipase A₂-a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12: 143-6.
11. Lee YM: Inhibition of phospholipase A₂ diminishes the acute alveolar injury induced by interleukin-1 α . *Kor J Physiol Pharmacol* 1997; 1: 71-8.
12. Hite RD, Seeds MC, Jacinto RB, Balasubramanian R, Waite M, Bass D: Hydrolysis of surfactant-associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipase A₂. *Am J P* 1998; 275: L740-7.
13. Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, et al: Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type II phospholipase A₂ and inhibited by a direct surfactant protein-A-phospholipase A₂ protein interaction. *J Clin Invest* 1998; 102: 1152-60.
14. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ: Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 1989; 180: 136-9.
15. Goldblum SE, Wu KM, Jay M: Lung myeloperoxidase as a measure of leukostasis in rabbit. *J Appl Physiol* 1991; 59: 1978-85.
16. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS: Rapid assay for activity of phospholipase A₂ using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1986; 154: 676-81.
17. Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animal tissues. *J Biochem* 1957; 226: 497-509.
18. Hess HH, Derr JE: Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomolar range. *Anal Biochem* 1975; 63: 607-13.
19. Corbet A, Creegan J, Frink J, Rudolph AJ: Distension produced phospholipid secretion in postmortem in situ lungs of normal rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 695-701.
20. Putman E, Boere AJF, van Bree, van Golde LMG, Haagsman HP: Pulmonary surfactant subtype metabolism is altered after short-term ozone exposure. *Toxicol Appl Physiol* 1995; 134: 132-8.
21. Choi J, Liu R, Forman HJ: Adaptation to oxidative stress: Quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 987-93.
22. Meister A, Tate SS, Griffith W: Gamma glutamyl-transpeptidase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 237-53.
23. Carraway MS, Piantadosi CA: Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 1998; 24: 253-68.
24. Briggs RT, Drath DB, Karnovsky ML, Karnovsky MJ: Localization of NADPH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. *J Cell Biol* 1975; 67: 566-86.
25. Hobson J, Wright J, Churg A: Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants. *Am J Pathol* 1991; 139: 573-80.
26. Repine JE, Parsons PE: Oxidant-antioxidant balance in endotoxin induced oxidative injury and tolerance to oxidative injury. *Endotoxin and the Lungs*, 1st ed. Edited by Brigham KL. Nashville. Marcel-Dekker Inc. 1994, pp 207-21.
27. Leff JA, Baer JW, Bodman ME, Kirkman JM, Shanley PF, Patton LM, et al: Interleukin-1 induced lung neutrophil accumulation and oxygen metabolite-mediated lung leak in rats. *Am J Physiol* 1994; 266: L2-8.
28. Rinaldo JE, Christman JW: Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11: 621-32.
29. Goldstein G, Luce JM: Pharmacologic treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; 11: 773-87.
30. Pruzanski W, Vadas P, Browning J: Secretory non-pancreatic group II phospholipase A₂: role in physiologic and inflammatory processes. *J Lipid Mediat* 1993; 8: 161-7.
31. Guidot DM, Stevens EE, Repine MJ, Luca-Broco AE, Repine JE: Intratracheal but not intravascular interleukin-1 causes acute edematous injury in isolated neutrophil perfused rat lung through an oxygen dependent mechanism. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 605-9.
32. Kelley J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 765-88.
33. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E: Cytokine regulation of endothelial function. *FASEB J* 1992; 6: 2591-9.
34. Bauldry SA, McCall CE, Cousart SL, Bass DA: Tumor necrosis factor- α priming of phospholipase A₂ activation in human neutrophils. An alternative mechanism of priming. *J Immunol* 1991; 146: 1277-85.
35. Dana R, Leto TL, Malech HL, Levy R: Essential requirement of cytosolic phospholipase A₂ for the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998; 273: 441-5.

36. Lee YM, Park Y: Effect of the inhibition of platelet activatin factor on oxidative lung injury induced by interleukin-1 α . *Kor J Physiol Pharmacol* 1998; 2: 479-91.
 37. Hazan I, Dana R, Granot J, Levy R: Cytosolic phospholipase A₂ and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 KDa mitogen activated protein kinase, cytosolic phospholipase A₂ and NADPH oxidase. *Biochem J* 1997; 326: 867-76.
 38. Stenius U, Rubin K, Gullberg D, Hoegsberg J: γ -glutamyl transpeptidase-positive rat hepatocytes are protected from GSH depletion, oxidative stress and reversible alterations of collagen receptors. *Carcinogenesis* 1990; 11: 69-73.
 39. Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PAM, Meister A: Inhibition of glutathione synthesis in the new born rabbit; A model for endogeneously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 9360-4.
 40. 이영만, 박윤엽, 고운석: NNNMU로 유도된 급성 호흡 곤란 증후군 흰쥐 폐장에서의 dexamethasone에 의한 PLA₂, GGT의 활성도 및 형태학적인 변화. *결핵 및 호흡기질환* 1996; 43: 925-35.
 41. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH: Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2303-10.
 42. Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G: Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol* 1991; 71: 317-21.
 43. Yokote K, Morisaki N, Zenibayashi M, Ueda S, Kanzaki T, Saito Y, et al: The phospholipase A₂ reaction leads to increased monocyte adhesion of endothelial cells via the expression of adhesion molecules. *Eur J Biochem* 1993; 217: 723-9.
-