

장의 허혈-재관류로 유도된 급성 폐손상에서 산화성 스트레스에 관여하는 group II phospholipase A₂의 역할

전 상 훈* · 김 근** · 이 상 철*** · 김 성 은**** · 이 영 만**** · 이 종 태***

=Abstract=

Role of Group II Phospholipase A₂ in the Pulmonary Oxidative Stress of the Acute Lung Injury Induced by Gut Ischemia-Reperfusion

Sanghoon Jheon, M.D.*, Keun Kim, M.D.** , Sang Cheol Lee, M.D.*** ,
Seong Eun Kim,**** , Young Man Lee, M.D.**** , Jong Tae Lee, M.D.***

Background: The various pathogeneses of acute respiratory distress syndrome have been suggested but not established yet. In the present study, the role of group II phospholipase A₂(PLA₂) in the pathogenesis of gut ischemia-reperfusion(I/R) induced acute lung injury (ALI), especially in the pulmonary oxidative stress with infiltration of neutrophils was investigated. **Material and Method:** To induce ALI, reperfusion of mesentery was done for 120 min after clamping of superior mesenteric artery for 60 min in Sprague-Dawley rats that weighed about 300g. To examine the role of group II PLA₂ in ALI, especially endothelial injury associated with the action of neutrophils, lung myeloperoxidase activity, lung leak index, bronchoalveolar lavage fluid protein were measured, and pulmonary PLA₂ activity changes in gut I/R were also measured. The role of group II PLA₂ in the neutrophilic generation of free radicals was assessed by inhibiting group II PLA₂ with rutin, manoalide and scolarial. Furthermore, to verify the oxidative stress in the lung, histologic and free radical detecting cytochemical electron microscopy were done. **Result:** After reperfusion, ALI was developed with accumulation of neutrophils in the lung, which was confirmed by the increase of myeloperoxidase activity, lung leak index and bronchoalveolar lavage protein (p<0.001). The pulmonary and intestinal group II PLA₂ activities significantly increased after gut I/R which were reversed by rutin(p<0.001). In vitro, cytochrome-c reduction assay denoted the inhibitory effects of rutin, scolarial and manoalide on the production of free

*대구가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Catholic University of Daegu

**대구의료원 흉부외과

Department of Thoracic Surgery, Daegu Medical Center

***경북대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Kyungpook National University

****대구가톨릭대학교 의과대학 생리학 교실

Department of Physiology, School of Medicine, Catholic University of Daegu

논문접수일 : 2002년 6월 4일 심사통과일 : 2002년 7월 28일

책임저자 : 이종태(700-721) 대구시 중구 삼덕동 2가 50, 경북대학교 의과대학 흉부외과학교실. (Tel) 053-420-5662, (Fax) 053-426-4765

E-mail : leejt@knu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

radicals from isolated human neutrophils. Histologically, neutrophilic accumulation and pericapillary edema in the lung after gut I/R was detected by light microscopy which was suppressed by rutin. In CeCl₃ cytochemical electron microscopy, the increased production of hydrogen peroxide in the lung after gut I/R was confirmed and also the production of hydrogen peroxide was decreased by rutin. **Conclusion:** On the basis of these experimental results, the inhibition of group II PLA₂ seemed to mitigate gut I/R-induced ALI by suppressing the production of free radicals from the infiltrated neutrophils. Collectively, group II PLA₂ seems to play a crucial role in gut I/R-induced ALI by neutrophilic oxidative stress.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:501-10)

Key words : 1. Respiratory distress syndrome
2. Phospholipase A

서 론

급성 호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 1967년 Ashbaugh 등¹⁾의 체계적인 기술 및 병인론에 대한 연구를 시작으로 최근까지도 그 병인에 대한 연구가 계속되고 있다. ARDS는 다발성 장기부전증후군(multiple organ failure, MOF)의 한 형태로 나타나거나 ARDS가 MOF를 유발하기도 하는데, 폐장의 심한 염증성 반응이 특징적인 소견으로, 폐부종 및 심한 저산소혈증에 빠지는 임상적 경과를 취한다²⁾. 최근 구미에서 발표된 연구 결과³⁾에 따르면 ARDS의 사망률은 60% 정도이며, 그 사망률은 감소추세에 있으나 아직도 심각한 질환으로 인식되고 있다. 국내의 경우, 1997년의 대한 결핵 및 호흡기학회의 전국실태조사 보고⁴⁾에 따르면 사망률이 80%에 이르는 것으로 발표되었다. 이러한 높은 사망률은 ARDS의 다양한 병인이 그 원인 중 하나라고 생각되며, 또한 병인론이 완전히 확립되지 않아 아직 최선의 치료법이 개발되어 있지 않은 것도 높은 사망률의 중요한 원인이라고 생각된다.

MOF와 관련된 ARDS 중 내장, 특히 장에서의 허혈 후 재관류에 의한 급성 폐손상 내지 ARDS는 xanthine dehydrogenase(XD)가 xanthine oxidase(XO)로 전환되고 그 혈중 농도의 증가가 폐장내에서 산소기(free radical)의 생성을 증가시키고, 이에 따른 호중구의 침윤이 그 원인이라고 Terada 등⁵⁾은 주장하고 있다. ARDS에서 기본적인, 공통적인 폐장의 병리는 호중구의 침윤과 폐장내 폐포장벽(alveolar barrier) 또는 모세혈관내피세포장벽(capillary endothelial barrier)의 손상과의 관계는 분명하다고 생각되며, 또한 여기에는 산소기의 작용이 관련한다고 생각된다. 그러나 Koike 등⁶⁾은 장의 허혈 후 재관류는 장 및 폐장에서의 phospholipase A₂(PLA₂)의 활성도를 증가시켜 혈중 염증성 지질분자를 증가시키고, 이러한 지질분자의 작용에 따른 호중구의 화학주성(chemotaxis)에 의해 폐장내 호중구의 침윤이 발생하여 조직의 손상이 유발

된다고 하였다. 이러한 연구는 장에서의 재관류에 의해 장에서 형성된 일종의 체액성 인자가 혈액을 통해 이동함으로써 폐장에서의 호중구의 respiratory burst에 따른 산화성 스트레스가 유발됨을 시사한다.

Terada 등⁵⁾은 이러한 체액성 인자들 중 XO를 그 주된 원인으로 보며, Filep 등⁷⁾은 혈소판활성인자(platelet activating factor, PAF)가 그 원인으로 보고하고 있다. XO는 잘 알려진 대로 산소기 형성에 관여하는 효소이며, PAF는 호중구에 대한 화학주성 및 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화시켜 산소기를 생성시키는 물질이다. 그러므로 ARDS 발병에 관한 호중구의 역할은 주로 산소기의 생성과 연관되어 있다.

폐장내로의 호중구의 침윤 자체만으로는 모세혈관 내피세포의 손상을 가져오는 것은 아니고, 호중구에서의 산소기의 생성이 조직의 손상을 유발시킨다는 것은 실험적으로 증명되었다⁸⁾. Dana 등⁹⁾은 PLA₂의 활성화에 따라 생성되는 염증성 지질분자는 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화하여 다량의 산소기를 유리함을 증명하였고, Lee 등¹⁰⁾은 interleukin-1(IL-1) 같은 cytokine은 폐장내의 PLA₂를 활성화시키고 동시에 호중구의 침윤이 증가하고 이에 따라 산소기에 의해 폐장의 손상이 유발됨을 보고하였다. Hybertson 등¹¹⁾은 또한 IL-1의 이러한 작용은 폐장내 PLA₂의 활성화에 따른 PAF의 생성이 그 원인으로 보고 있다. 이러한 연구 결과들은 ARDS의 병인론 중 PLA₂가 호중구의 respiratory burst에 따른 산화성 스트레스에 관여함을 나타내고 있다.

PLA₂는 최근에 이르러 아형(isotype)이 많이 발견되었으며 그 분자량 및 존재하는 위치에 따라 세분된다¹²⁾. 그 중 Group II PLA₂는 분자량이 14.5 Kda 정도의 분비형 PLA₂로서 주로 세포막에 존재하며, 체내의 염증성 cytokine의 작용을 매개한다고 하고¹³⁾, 최근 밝혀진 바로는 세포질 내 분자량이 85 Kda 정도의 cytosolic PLA₂도 탐식세포의 산소기 생성에 관여한다고 한다¹⁴⁾. PLA₂ 아형의 발견에 따라 각각의 PLA₂의 역할이 규명된다면 ARDS에 관한 새로운 병인론이 밝혀

짐으로써 이에 따른 새로운 치료법이 시도될 수 있을 것으로 기대된다. 기존의 항염증제로는 ARDS에서는 별 효과가 없고, cyclooxygenase나 lipoxxygenase의 억제도 ARDS의 치료에는 별 효과가 없음이 알려졌다기 때문이다. 한편 rutin은 flavonoid의 일종으로서 항산화작용이 있음이 알려져 있고, 최근에는 group II PLA₂의 선택적인 억제제로도 알려져 있으며, 이러한 항산화제로서의 기능을 이용하여 ARDS의 치료제로 rutin을 시도한 보고들도 있다^{15,16}.

본 연구는 ARDS의 병인론 중 내장, 특히 장에서의 허혈-재관류로 인한 ARDS의 유발에 관여하는 기전 중에서, group II PLA₂의 역할을 규명하는 것을 그 목적으로 하였고, 특히 group II PLA₂의 작용이 폐장내에서의 호중구의 침윤 및 산화성 스트레스의 유발에 미치는 기전을 알아보기 위하여 시행하였다. 또한 group II PLA₂의 억제제를 위하여 그 억제제인 rutin을 in vivo 실험에 사용하였고, in vitro 실험에서는 manoalide 및 scalaradial을 사용하여 group II PLA₂가 호중구 및 폐장에서의 산소기 형성에 관여함을 알아보았다.

대상 및 방법

실험대상 및 시약 : 장의 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상을 유발하기 위하여서는 Sprague-Dawley 종 흰쥐를 암, 수 구별 없이 사용하였다. PLA₂를 정량하기 위하여 L- α -dipalmitoyl-2(9,10(N)³H-palmitoyl) phosphatidyl- choline(³H-DPPC) 및 폐누출지수(lung leak index)를 측정하기 위한 ¹²⁵I-bovine serum albumin(¹²⁵I-BSA)는 NEN사(Boston, MT, USA)에서 구입하였고, group II PLA₂ 억제제인 scalaradial과 manoalide는 Biomol 제(Biomol Research Laboratories, PA, USA)를 사용하였으며, 그 외의 시약은 Sigma사(Sigma Co, St. Louise MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

급성 폐손상의 유도 : 장의 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상을 유도하기 위하여 체중 280~300g 정도의 흰쥐에 ketamine hydrochloride(60 mg/kg) 및 xylazine(6 mg/kg)을 복강으로 주사하여 마취한 후 개복술을 시행하여 상장간막동맥(superior mesenteric artery, SMA)을 bulldog clamp로 60분간 차단하였다. 그 후 120분간의 재관류를 거쳐 급성 폐손상을 유발하였다. 폐장의 적출을 위해서는 흰쥐를 Havard제(Havard Apparatus, UK) rodent-ventilator에 연결한 후 개흉술을 시행하고, 폐동맥에 삽관한 뒤 Masterflex perfusion pump(Cole-Parmer, USA)에 연결한 뒤, 생리적 식염수로 관류하여 폐장내 혈액을 제거한 후, 폐장을 적출하고 즉시 액체질소에 담근 뒤, -70℃에 냉동보관 하였다.

Phospholipase A₂의 억제 : 장의 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상을 유발하고, group II PLA₂를 선택적으로 억제하기 위해서는 rutin(600 mg/kg)을, PLA₂ 억제 후 PAF 효과를 보기 위해서는 비선택적 PLA₂ 억제제인 mepacrine(60 mg/kg)을, SMA 차단직후 복강내 주사하였다. 분리된 호중구에서의 PLA₂의 억제가 산소기 형성에 미치는 영향을 보기 위해서는 rutin 및 group II PLA₂ 억제제인 manoalide 및 scalaradial을 사용하였다.

폐장내 myeloperoxidase(MPO)의 측정 : 장의 허혈-재관류 후, PLA₂의 억제에 따른 폐장내 MPO의 변화 및 장의 허혈-재관류에 따른 폐장내 호중구 침윤의 증가가 염증성 지질분자인 PAF의 작용에 의한 것인지 알기 위하여 장의 재관류 직전 mepacrine을 투여한 군에 PAF를 혈중(600 ng) 및 기도내(5 μ g)로 투여 후, MPO의 활성도를 측정하였다. 즉 동결보존된 좌측폐장을 20 mM potassium phosphate 용액(pH 7.4) 4.0 ml에 담근 뒤 Polytron(Swizland) homogenizer로 분쇄하였다. 그 뒤 40,000 g, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 침전층은 0.5% hexadecyl tetramethyl ammonium bromide (HTAB)이 함유된 50mM potassium phosphate 용액(pH 6.0)에 재부유하였다. 이 용액을 90초간 sonication(Vibracell, USA)한 뒤, 60℃ 항온수조에서 120분간 incubation하였다. 그 뒤 조직분쇄액 1.0 ml를 12,000 rpm, 상온에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액 0.1 ml를 분리하여 o-dianisidine 0.0168 gm이 함유된 5 \times 10⁻⁴M의 과산화수소 용액과 반응시켜 파장 460 nm에서 enzyme kinetics를 시행하여 MPO의 활성도를 측정하였다.

폐누출지수 및 폐세척액내 단백질량의 측정 : 장의 허혈-재관류 후 급성 폐부종을 확인하기 위하여 폐누출지수(lung leak index) 및 폐세척액내의 단백질량을 측정하였다. 즉 SMA 재관류 90분에 경정맥을 통하여 1.0 μ Ci의 ¹²⁵I-bovine serum albumin을 투여하고, 30분 후에 개흉술을 시행하여 우측심실에서 1.0ml의 혈액을 채취하였다. 그 뒤 폐동맥에 삽관하여 Masterflex perfusion pump(Cole-Parmer, USA)로 폐장내의 혈액을 완전히 제거한 뒤 우측폐장을 적출하였다. 그 뒤 v-counter를 이용하여 혈액 1.0ml 및 우측폐장내의 방사능 활성도를 측정하고, 그 비(우측폐장내 방사능 활성도/혈액 1.0ml 내의 방사능 활성도)를 계산하여 폐누출지수로 하였다. 폐세척액내의 단백질량을 측정하기 위해서는 흰쥐에 ketamine hydrochloride(60 mg/kg) 및 xylazine(6.0 mg/kg)을 경정맥을 통하여 주사하여 치사시킨 후, 기관절개술을 시행하여 삽관 후 8.0 ml의 생리적 식염수를 이용하여 폐세척을 시행하였다. 이 때 얻어진 약 6.0ml의 폐세척액은 즉시 2,000 rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 세포층을 제외한 상

층액을 이용하여 단백질을 정량하였다.

폐장 및 소장내 PLA₂ 활성도의 측정 : 장의 허혈-재관류 후 rutin의 효과가 폐장 및 소장(small intestine) 조직의 PLA₂의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PLA₂의 활성도를 측정하였다. 즉 -70℃에 동결보존된 우측폐장 및 소장조직을 1 mM의 DTT가 함유된 0.25 M sucrose 4.0 ml에 녹인 후 Polytron homogenizer(Swizland)으로 분쇄하였다. 분쇄 후 즉시 얼음 위에서 60초간 Vibracell(USA)을 이용하여 sonication하여 cell lysate를 얻었고, 이 중 0.1 ml를 PLA₂ 정량에 사용하였다. 즉 0.1 ml의 cell lysate는 900 μl의 2.0 μCi의 ³H-dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC)이 함유된 완충용액(100 mM glycine, 10 g/l BSA, 2.5 mM deoxycholate, 0.1 mM lecithin, 20 mM CaCl₂, 1.75 mM ethanol, pH 9.0)과 혼합한 뒤 37℃의 수조에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤 1 g의 Na₂SO₄를 가하여 단백질을 침전시키고 5.0 ml의 0.1%의 빙초산이 함유된 acidic hexane을 가하여 혼합한 뒤 hexane층을 분리하고 이 중 1.0 ml을 3.0 ml의 scintillation cocktail과 혼합한 뒤 β-scintillation spectrometry를 시행하였다. PLA₂의 표준시료로는 *Crotalus adamanteus* PLA₂ 0.01 unit를 매번 실험에 사용하였고, PLA₂ 1.0 unit는 1분당 유리지방산 1 μmol이 생성되는 것으로 정의하였다.

호중구의 분리 : 호중구에서의 산소기 생성에 미치는 PLA₂의 역할을 알아보기 위하여 인체의 혈액으로부터 호중구를 분리하였다. 즉 2개의 50 ml 주사기에 15 ml씩의 Hetastarch와 0.1 ml의 heparin(1000 U)를 혼합한 뒤 30 ml의 혈액을 뽑아 상온에서 혼합한 뒤 주사기를 수직으로 세워 40분간 방치하였다. 그 뒤 혈장층을 분리한 뒤 55%, 75% 등장성 percoll 용액을 이용하여 상온, 1,500 rpm에서 20분간 gradient centrifugation을 시행하였다. 원심분리 후 55%와 75% percoll의 경계에 모인 호중구층만을 분리하고 이 호중구를 생리적 식염수에 혼합한 뒤 1,000 rpm에서 2회 원심분리하여 세척한 후 산소기 형성 검사에 사용하였다.

호중구에 있어서의 산소기 생성의 검사 : 호중구의 산소기 생성에 미치는 PLA₂의 억제효과를 알아보기 위하여 분리된 호중구를 이용하여 다음과 같은 실험을 시행하였다. 2×10⁶개의 호중구가 든 시험관에 phorbol myristate acetate(PMA)(2.5 μg/ml HBSS)를 가하여 호중구에서의 산소기 형성을 유도한 뒤, 여기에 group II PLA₂ 억제제인 rutin(100 μM), mancoalide(10, 100 μM), scalarialide(20, 200 μM)를 첨가하여 PLA₂ 억제에 따른 산소기 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

형태학적 관찰

광학현미경을 이용한 관찰 : 장의 허혈-재관류 후 120분 뒤에 우측폐장을 절제하고, 무작위로 조직의 절편을 절취한 뒤 10%의 중성 formalin 용액에 고정하였다. 그 뒤 세척, 탈수의 과정을 거친 뒤 paraffin에 포매하고, Reichert-Jung microtome 2040으로 박절한 뒤 hematoxylin-eosin 용액으로 염색 후 검정하였다.

전자현미경을 이용한 폐장내 과산화수소 형성의 관찰 : 장의 허혈-재관류 후 폐장내 과산화수소의 생성을 검사하기 위해 cerium chloride cytochemical electron microscopy를 시행하였다. 폐장조직을 적출 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol 10.1 M tris-maleate buffer(pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고 30분간 37℃에서 반응시켰다. 이 반응은 조직내의 과산화수소가 cerium chloride와 반응하여 cerrous perhydroxide를 형성하는 과정이다. 반응이 끝난 조직을 0.1M Tris-maleate buffer(pH 7.4)와 0.1M sodium cacodylate buffer(pH 7.4)로 차례로 수세한 후 1% osmium tetroxide(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)로 고정시켰다. 고정이 끝난 조직을 sodium cacodylate buffer로 수세하고 alcohol-propylene oxide 계열로 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시킨 다음 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 뒤, ultramicrotome(Recher Supernova)을 이용하여 60~70 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl acetate로 염색한 뒤 투과전자현미경으로 관찰하였다.

통계처리 : 모든 성적은 평균±표준오차로 나타내었다. 유의성의 검정은 성적을 Student-Newman-Keuls test를 이용하여 검정하였고, p < 0.05를 유의하다고 인정하였다.

결 과

장의 허혈-재관류에 의해 유도된 급성 폐손상에 미치는 group II PLA₂의 억제효과에 대한 실험결과는 다음과 같다. 장의 허혈-재관류 후 폐장내 MPO의 활성도(mU/g of lung)는 대조군의 2.27±0.514에 비해서 39.18±2.369로 유의하게(p<0.001) 증가하였다. 그러나 group II PLA₂ 억제제인 rutin에 의해서는 22.80±1.742로, 허혈-재관류 한 경우에 비해 유의하게(p<0.001) 감소하여, group II PLA₂의 억제가 폐장내 호중구의 침윤을 감소시킴을 관찰할 수 있었다(Table 1). 또한 mepacrine으로 PLA₂를 억제 후 혈중 및 기도내로 투여한 PAF에 의해 MPO는 각각 53.05±2.205, 35.19±2.932로 대조군에 비해 증가하였다(p<0.001)(Table 2).

Table 1. Changes in lung myeloperoxidase activities(U/g of wet lung) in sham, gut ischemia-reperfusion(I/R) and gut ischemia- reperfusion+rutin rats

Sham(n=6)	I/R(n=7)	I/R+rutin(n=9)
2.27±0.514	39.18±2.369*	22.80±1.742#

Values are given as mean±S.E.
n indicates numbers of experiments.
*p<0.001, sham vs. I/R, #p<0.001, I/R vs. I/R+rutin.

Table 2. Effect of platelet activating factor (PAF) on lung myeloperoxidase activities(U/g of wet lung) in mepacrine treated gut I/R rats

Sham(n=6)	I/R+Mepa+PAF(i.v.)(n=11)	I/R+Mepa+PAF(i.t.)(n=7)
2.27±0.514	53.05±2.205*	35.19±2.932*

Values are given as mean±S.E.
n indicates number of experiments.
*p<0.001, sham vs. I/R+Mepa+PAF(i.v.), I/R+Mepa+PAF(i.t.)
Mepa : mepacrine
i.v., intravenous injection; i.t., intratracheal instillation

Table 3. Protective effect of rutin on gut I/R-induced pulmonary endothelial injury expressed by lung leak index and B A L protein contents(mg/two lungs)

	Sham(n=7)	I/R(n=8)	I/R+rutin(n=8)
Lung leak index	0.073±0.0065	0.228±0.0173*	0.135±0.0064#
BAL protein content	1.80±0.135	2.46±0.091*	1.63±0.095#

Values are given as mean±S.E.
n indicates number of experiments.
*p<0.001, sham vs. I/R, #p<0.001, I/R vs. I/R+rutin.

장의 허혈-재관류에 의한 모세혈관내피세포의 손상을 나타내는 지표인 폐누출지수 및 폐세척액내 단백질량의 변화는 Table 3에서 보는 바와 같다. 폐누출지수는 대조군의 0.073±0.0065에서 장의 허혈-재관류 후에는 0.228±0.0173로 현저히(p<0.001) 증가하였으나, rutin에 의해서는 0.135±0.0064으로 유의한(p<0.001) 감소를 보였다. 또한 폐세척액내의 단백질량(mg/two lungs)의 변화도 이와 유사한 양상을 보였다. 즉 대조군에서는 1.80±0.135였으나 장의 허혈-재관류 후에는 2.46±0.091로 증가하였고(p<0.001), rutin을 투여한 후에는 1.63±0.095로 감소(p<0.001)하였다. 즉 장의 허혈-재관류에 의한 손상은 rutin에 의해 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

장의 허혈-재관류에 따른 폐장 및 소장에서의 PLA₂의 활성도(mU/g of tissue)의 변화, 그리고 rutin에 의한 PLA₂의 억제에 의한 결과는 Table 4와 같다. 폐장의 PLA₂의 활성도는

Table 4. Effect of rutin on intestinal and pulmonary PLA₂ activities(mU/g of wet lung, wet intestine)in gut I/R rats

	Sham	I/R	I/R+rutin
Lung PLA ₂	2.83±0.573 (n=6)	37.86±5.401* (n=7)	24.64±3.527# (n=10)
Intestinal PLA ₂	7.90±0.560 (n=6)	58.92±7.540* (n=8)	38.45±2.314# (n=8)

Value are given as mean±S.E.
n indicates number of experiments.
*p<0.001, sham vs. I/R, #p<0.001, I/R vs. I/R+rutin.

Table 5. Inhibitory effect of rutin on the generation of free radicals in PMA activated human neutrophils

	Control(n=8)	PMA(n=10)	PMA+rutin(n=7)
Cytochrome-c reduced (nmol/2×10 ⁶ PMNs)	6.05±1.450	88.16±2.421*	69.5±2.062#

Values are given as mean±S.E.
n indicates number of experiments.
*p<0.001, control vs. PMA, #p<0.001, PMA vs. PMA+rutin.
PMN, polymorphonuclear neutrophil; PMA, phorbol myristate acetate

대조군의 2.83±0.573에서 장의 허혈-재관류 후에는 37.86±5.401로 유의하게(p<0.001) 증가하였으나 group II PLA₂ 억제제인 rutin에 의해서는 24.64±3.527로 유의(p<0.001)한 감소를 보였다. 소장에 있어서의 PLA₂의 활성도도 동일한 변화를 보여 대조군의 7.90±0.560에서 장의 허혈-재관류 후에는 58.92±7.540으로 증가(p<0.001)하였고 재관류 후 rutin을 투여한 군에서는 38.45±2.314로 유의(p<0.001)한 감소를 보였다.

분리된 호중구에서의 산소기의 형성에 미치는 rutin, manoalide 및 salaradial의 효과는 다음과 같다. 즉 대조군에서는 6.05±1.450(cytochrome-c reduced, nmol/2×10⁶ PMNs)이었으나 PMA를 가한 군에서는 산소기의 생성이 88.16±2.421로 증가(p<0.001)하였고 rutin(100 μM)을 첨가한 군에서는 69.5±2.062로 감소(p<0.001)하였다(Table 5). Salaradial 및 manoalide가 호중구에서의 산소기 형성에 미치는 효과는 Table 6과 같다. 즉 salaradial 20 μM을 첨가하였을 때는 59.30±5.456(cytochrome-c reduced, nmol/2×10⁶ PMNs)로, 200 μM을 첨가하였을 때는 0.60±0.600으로 PMA 처리군의 88.16±1.450에 비해 감소(p<0.001)하여 salaradial의 농도에 의존적으로 산소기의 형성이 감소함을 알 수 있었다. Manoalide의 경우에 있어서도 PMA 처리군과 비교시 10 μM의 manoalide를 처리한 결과 19.78±5.151로 감소(p<0.001)하였고, 100 μM의 manoalide를 처리한 결과 8.52±0.242로 유의하게(p<0.001) 감소하였다.

Table 6. Scalaradial and manoalide decrease the generation of free radicals from PMA-activated human neutrophils by inhibition of group II PLA₂

	Control	PMA	PMA+S (20μM)	PMA+S (200μM)	PMA+M (10μM)	PMA+M (100μM)
Cytochrome-c reduced (nmol/2×10 ⁶ PMNs)	6.05±1.450 (n=8)	88.16±2.421 ^a (n=10)	59.30±5.456 ^b (n=7)	0.60±0.600 ^{c,d} (n=9)	19.78±5.151 ^c (n=7)	8.52±0.242 ^{f,g} (n=9)

Values are given as mean±S.E.

n indicates number of experiments.

a; p<0.001, control vs. PMA, b; p<0.01 PMA vs. PMA+S(20 μM), c; p<0.001, PMA vs. PMA+S(200μM), d; p<0.001, PMA+S(20μM) vs. PMA+S(200μM), e; p<0.001, PMA vs. PMA+M(10μM), f; p<0.001, PMA vs. PMA+M(100μM), g; p<0.001, PMA+M(10μM) vs. PMA+M(100μM)

PMN, polymorphonuclear neutrophil ; PMA, phorbol myristate acetate ; S, Scalaradial ; M, Manoalide

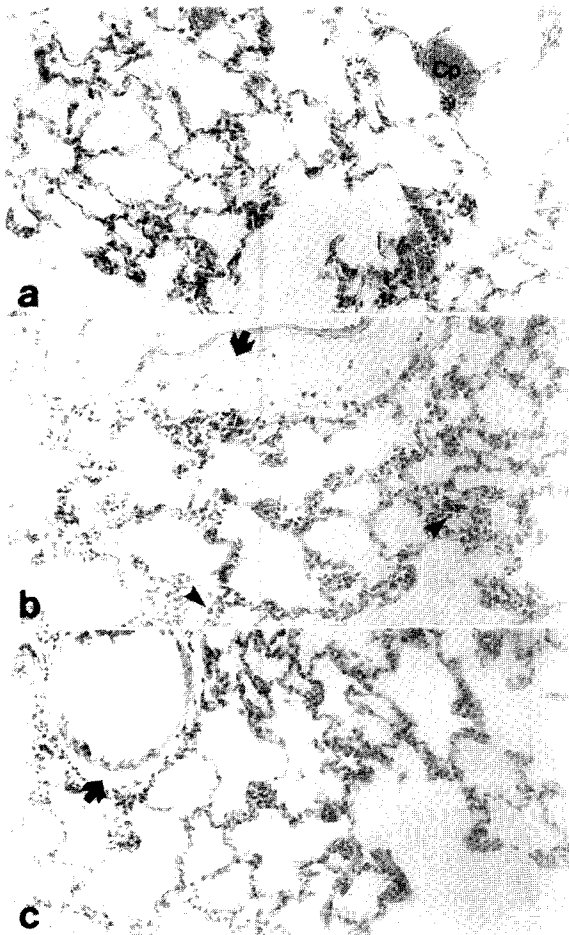


Fig. 1. Representatives of histological findings in the lungs of sham, gut I/R and gut I/R with rutin rats. In the lung of sham rat, alveoli are well preserved and the infiltration of inflammatory cells is not found(a). In contrast, after gut I/R, perivascular edema(arrow), neutrophils in alveolar lumen and thickening of alveolar septa are observed(arrow head) (b). In the lung of gut I/R with rutin rat, perivascular edema(arrow) is observed but it is less prominent compared to the lung of gut I/R rat(c). Cp, Capillary; Bar indicates 50 μm.

장의 재관류에 따른 광학현미경적인 변화는 Fig. 1-a, b, c 와 같다. 대조군(Fig. 1-a)에 비하여 장의 허혈-재관류 후에 보이는 폐장의 조직학적 변화는 염증세포의 간질내 침윤, 폐포강내의 염증세포의 이동이 관찰되고 부분적인 폐포내 단백 성분 및 무기폐가 관찰되었다(Fig. 1-b). 그러나 rutin을 투여한 군에서는 이러한 변화가 감소하였다(Fig. 1-c).

Cerium chloride를 이용한 세포화학적 검사에서는 대조군(Fig. 2-a)에서는 관찰되지 않는 cerrous perhydroxide의 침전이 장의 허혈-재관류 후에는 많이 관찰되었으며, 특히 호중구의 막을 따라 제 2형 폐포세포의 막 및 세포질내에서 그 형성이 현저하였다(Fig. 2-b). Rutin 투여 후에 이러한 변화는 감소하여 산소기 생성이 group II PLA₂의 억제에 의해 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 2-c).

고 찰

급성 호흡곤란증후군은 심한 저산소혈증 및 투과성 폐부종을 특징으로 하는 급성 염증성 폐질환이다. 이러한 투과성 폐부종의 주된 원인은 폐장내 모세혈관의 혈관내피세포의 손상에 의한다. ARDS시의 폐장내 모세혈관의 손상은 다양한 기전에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. Hybertson 등¹¹⁾은 interleukin-1과 같은 염증성 cytokine과 CINC가 혈관내피세포 및 호중구의 유착세포를 발현시켜 호중구에 의한 혈관내피세포의 손상이 일어난다고 보고하고 있다. 실제로 ARDS 환자의 폐세척액내에는 염증성 cytokine 및 염증성 지질분자의 생성에 관여하는 PLA₂의 활성도가 증가해 있고 PAF의 함량 또한 증가해있다. 최근 Kim 등¹⁷⁾은 ARDS의 폐세척액내에는 PLA₂의 활성도가 정상인에 비하여 훨씬 높고, 따라서 폐장내의 염증성 지질분자의 생성이 훨씬 증가하여 ARDS의 중요한 병인으로 작용할 것이라고 추정하였다. Lee 등¹⁰⁾도 IL-1으로 유도된 흰쥐의 급성 폐손상에서 폐장내의

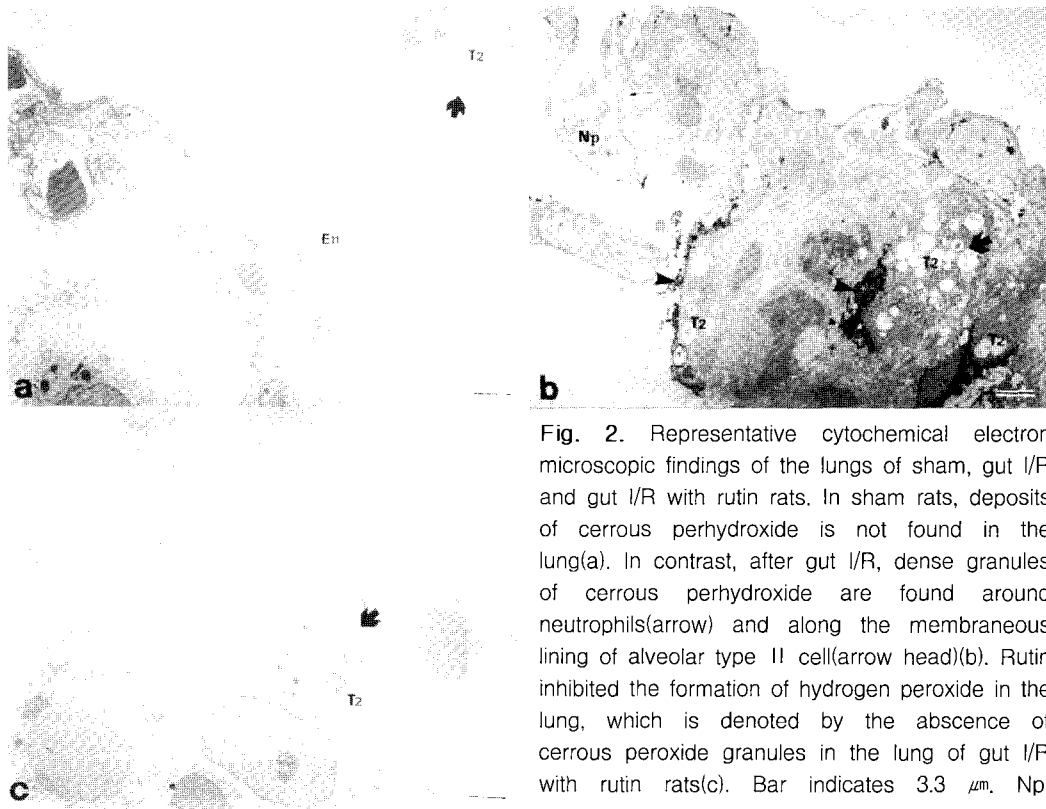


Fig. 2. Representative cytochemical electron microscopic findings of the lungs of sham, gut I/R and gut I/R with rutin rats. In sham rats, deposits of cerrous perhydroxide is not found in the lung(a). In contrast, after gut I/R, dense granules of cerrous perhydroxide are found around neutrophils(arrow) and along the membrane lining of alveolar type II cell(arrow head)(b). Rutin inhibited the formation of hydrogen peroxide in the lung, which is denoted by the absence of cerrous peroxide granules in the lung of gut I/R with rutin rats(c). Bar indicates 3.3 μ m. Np, neutrophil; T₂, alveolar type II cell

PLA₂의 활성도의 증가를 관찰하고, PLA₂ 활성도의 증가와 더불어 폐장내의 호중구의 침윤에 따른 산소기의 생성이 혈관내피세포의 손상의 원인이라고 주장하고 있다. 또한 IL-1에 의한 폐장내 PLA₂ 활성도의 증가는 PAF의 생성을 증가시켜 PAF가 호중구의 화학적 유인물질(chemo attractant)로 작용할 뿐 아니라 호중구 자체의 respiratory burst를 유발하여 산화성 스트레스가 유발됨으로써 급성 폐손상이 유발된다고 보고하고 있다.

본 연구의 결과에서 보여지는 장의 허혈-재관류 후의 폐장 조직의 손상은 위에서 언급한 호중구의 산소기 생성에 따른 변화, 즉 산화성 스트레스에 의한 것과 거의 일치한다. 즉 장의 허혈-재관류 후에 폐장내 호중구의 침윤이 현저한 점, 동시에 폐누출지수가 증가하고 폐세척액내의 단백질량이 증가한 것 등은 장의 허혈-재관류에 따른 호중구의 침윤으로 산소기 생성이 증가하여 모세혈관이 손상을 받은 결과이다. Koike 등¹⁸⁾은 본 연구와 유사한 실험에서 비특이성 PLA₂ 억제제인 mepacrine이나 group II PLA₂ 억제제인 S-5920/LY315920Na를 장의 재관류전에 사용하면 장의 재관류후에 발생하는 급성염증성 폐손상이 감소한다고 보고하고 있다. PLA₂의 활성화에 따른 PAF의 생성이 호중구의 폐장내 침윤에 직접적으로 관여하는 것은 본 연구에서도 장의 재관류

전 mepacrine으로 PLA₂를 억제하고, PAF를 혈중으로 혹은 기도내로 직접 주입했을 때 MPO가 증가하는 것으로도 알 수 있다. 즉 본 연구에서는 PLA₂를 강력한 비특이성 억제제인 mepacrine으로 차단 후, PAF를 주입하여 폐장 내 호중구의 침윤이 증가했던 것으로 미루어, 장의 재관류 후 폐장의 손상은 PAF의 화학주성 및 호중구에서의 산소기 형성에 따른 산화성 스트레스에 의한 것임을 시사한다. 장의 재관류 후 발생하는 급성폐부종에 관여하는 PAF의 역할은 Lee 등¹⁹⁾은 장에서 생성된 PAF가 체액성 인자로 작용하여 폐장내 PLA₂의 활성화를 유도하거나 또한 혈중 PAF의 증가가 폐장내 호중구의 침윤을 증가시킴과 아울러 이들 호중구에서 생성되는 산소기가 PLA₂의 활성화를 촉진시켜 폐장내 PAF의 생성이 증가되는 것으로 보고 있다. 흥미로운 것은 이러한 PLA₂의 억제에 따른 조직손상의 감소, 특히 호중구의 작용에 의한 것으로 보이는 조직손상의 감소이다. Rutin은 폐장의 호중구의 침윤을 감소시켰을 뿐 아니라 혈관내피세포의 손상을 나타내는 폐누출지수 및 폐세척액내의 단백질량도 감소시키고 있다.

PLA₂가 ARDS의 병인론에 관여하는 것은 실험적으로 증명되었으나 아직까지도 폐장내에서의 PLA₂가 활성화되는 기전은 명확하지가 않다. Nilsson 등²⁰⁾은 장의 허혈-재관류에 의

한 손상은 장의 재관류시에 대량으로 생성되는 XO가 주된 원인이라고 주장하고, 혈중 XO의 증가는 폐장내에서의 산소기 생성을 촉진하여 조직의 손상이 유발된다고 보고하고 있다. 그러나 PLA₂가 산소기에 의해서도 활성화 될 수 있다는 보고와 PLA₂의 활성화는 호중구에서의 산소기의 생성을 유도한다는 점은 내장의 재관류에 의한 ARDS가 PLA₂의 활성화와도 직접 관계가 있음을 시사한다^{21,22}.

본 연구에서는 장의 허혈-재관류후 폐장 및 장에서의 PLA₂의 활성도가 현저히 증가하였고, 이러한 PLA₂ 활성도의 증가는 group II PLA₂의 억제제인 rutin에 의하여 억제됨과 동시에 폐장의 손상도 감소하였다. 호중구에서도 group II PLA₂의 억제제인 rutin, scalaradial 및 manoalide 등에 의하여 산소기의 생성이 현저히 감소하였다. PLA₂는 현재까지 새로운 아형이 계속 발견되고 있으나, 그 중 급성 폐손상의 병인에 관여하는 것은 group II PLA₂와 cytosolic PLA₂가 아닌가 추정된다^{18,23}. 본 연구에서 보듯이 rutin에 의한 group II PLA₂의 억제는 조직의 손상을 감소시키고 이러한 조직손상의 감소는 호중구 침윤의 감소 및 산소기 생성 감소와 관계가 있다. Rutin은 항산화제로 group II PLA₂의 선택적인 억제제로 알려져 있고, 특히 탐식세포에서의 산소기 형성을 효과적으로 억제한다고 알려져 있다²⁴. 이러한 사실을 본 연구의 결과에 비추어 볼 때, group II PLA₂의 억제가 호중구의 침윤을 억제함과 동시에 산소기 생성 자체를 억제하여 조직의 손상을 감소시킨 것으로 생각된다. 특히 분리된 호중구에서의 rutin, manoalide 및 scalaradial의 산소기 생성 억제의 효과는 이러한 생체내에서의 결과를 뒷받침한다 하겠다. Manoalide 및 scalaradial은 group II PLA₂의 선택적 억제제로서 본 연구에서는 호중구에서의 산소기 생성을 완전히 억제하는 효과를 보였다. 최근 Furue 등²⁵은 가토에서 oleic acid를 이용한 급성 폐손상 model에서 s-5920/ LY315920Na를 이용하여 group II PLA₂를 억제함으로써 급성 폐손상이 현저히 줄어들고, 특히 호중구의 침윤이 감소하였다고 보고하였는데, 이러한 결과는 본 연구의 결과와 거의 일치한다. 동시에 group II PLA₂ 억제제의 효과는 본 연구의 형태학적인 실험결과에서도 잘 나타나고 있다. 즉 rutin은 폐장조직의 호중구의 침윤을 감소시키고 폐장내 산소기 생성을 억제하고 있다. 호중구에서 생성된 superoxide anion은 superoxide dismutase(SOD)의 작용에 의해 과산화수소로 변환되고, 과산화수소는 혈중 철이온이나 폐장내 출혈에 의해 유출되는 철분의 작용으로 Fenton씨 반응이 일어나면서 독성이 강한 hydroxyl radical로 바뀐다. 이 과정에서 과산화수소는 CeCl₃와 반응하면 전자현미경상에서 전자밀집과립의 형태로 나타난다. 본 연구에서는 장의 허혈-재관류 후에 폐장내 이러한 cerrous perhydroxide의 과립이 현저히 증가하였고, rutin에 의해서는 거의 완전히 억

제되었다. 이러한 세포화학적 결과는 group II PLA₂가 폐장내 산소기의 형성에 관여함을 보여주는 직접적인 증거이다. 장의 허혈-재관류 후에 나타나는 폐장내 산소기 형성의 기전은 아직 확실하지는 않으나 본 연구의 결과에 따르면 장의 허혈-재관류 후 폐장내 침윤한 호중구에서의 산소기 생성의 증가가 산화성 스트레스를 유발하고 동시에 PLA₂의 활성화를 유도하거나, 장에서 생성된 PAF가 혈류를 타고와서 폐장내에서 작용하여 PLA₂를 활성화시킨 것으로 생각된다. Boyer 등²¹은 산소기가 PLA₂를 활성화시키는 사실을 실험적으로 증명하였다. 또 PLA₂ 활성화의 증가는 PAF의 생성을 증가시킨다. Terada 등⁵은 PAF가 강력한 화학주성을 유발하며, 동시에 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화하여 산소기 생성을 증가시킴을 지적하고 있다. 즉 PAF 및 과산화수소는 PLA₂를 활성화시키고, 역으로 PLA₂의 활성화는 호중구에서의 산소기 생성을 증폭시키는 기전이 존재하며 이에 따라 group II PLA₂가 활성화 되는 듯하다^{26,27}.

흥미로운 것은 Tan 등²⁸은 흰쥐의 장에서 PAF는 group II PLA₂의 발현 및 활성을 증가시키며, 이러한 group II PLA₂의 발현은 호중구를 매개로 한다고 보고하고 있다. 이러한 모든 사실에 더하여 Leslie 등²⁹은 최근 호중구에서의 산소기 생성에는 PLA₂의 활성화, 특히 alachidonate가 NADPH oxidase를 활성화시키는 것과 관계가 있고 또 PLA₂의 활성화에 따른 산소기 생성이 세포독성과 관계가 있다고 하였다.

이러한 사실들을 감안하면, 본 연구의 결과는 장의 허혈-재관류시, 장 및 폐장에서 group II PLA₂의 활성도의 증가에 따른 PAF의 형성이 호중구의 침윤을 유발한 것으로 추정된다. 동시에 침윤된 호중구에서의 산소기 형성에도 group II PLA₂의 활성화 및 PAF가 관여하여 산화성 스트레스를 유발하여 급성 폐손상을 일으킨 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 장의 허혈-재관류시에 발생하는 급성 호흡곤란증후군에서 group II PLA₂의 역할을 알아보기 위하여 시행되었다. 특히 폐장 내의 호중구의 침윤과 더불어 유발되는 산화성 스트레스에서 group II PLA₂의 역할을 규명하려 하였다. 장의 허혈-재관류 후에 따라오는 급성 폐손상은 group II PLA₂의 활성화에 따른 염증성 지질분자 중, 특히 PAF의 역할에 따른 폐장내 호중구의 침윤과 이로 인해 호중구에서 생성되는 산소기에 의한 산화성 스트레스가 원인으로 추정되었다. Group II PLA₂의 억제는 침윤된 호중구로부터 산화기 생성을 억제함으로써 급성 폐손상을 완화하는 것으로 보인다. 따라서 group II PLA₂는 장 허혈-재관류로 유도된 급성 폐손상의 산화성 스트레스에서 중심적인 역할을 하는 것으

로 보인다.

참 고 문 헌

1. Ashbaugh DG, Bigelow DG. *Acute respiratory distress in adults*. Lancet 1967;2:319-23.
2. Temmesfeld-Wollbrueck B, Walmrath D, Grimminger F, Seeger F. *Prevention and therapy of the adult respiratory distress syndrome*. Lung 1995;173:139-64.
3. Zilberberg MD, Epstein SK. *Acute lung injury in the medical ICU: Comorbid conditions, age, etiology and hospital outcome*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1159-64.
4. 대한결핵 및 호흡기학회 급성호흡곤란증후군 전국 실태 조사 소위원회. 급성호흡곤란증후군의 전국 실태조사 보고. 결핵 및 호흡기질환 1997;44:25-43.
5. Terada LS, Domish J, Shenley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. *Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion*. Am J Physiol 1992;263:394-401.
6. Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJW, Carl VS, Banerjee A. *Gut phospholipase A₂ mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion*. Am J Physiol 1995;268:397-403.
7. Filep J, Herman F, Braquet P, Mozes T. *Increased levels of platelet-activating factors in blood following intestinal ischemia in the dog*. Biochem Biophys Res Comm 1989;158:353-9.
8. Jaeschke H, Smith W. *Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury*. J Leukoc Biol 1997;61:647-53.
9. Dana R, Leto TL, Levy R. *Essential requirement of cytosolic PLA₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase*. J Biol Chem 1998;273:441-5.
10. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, et al. *Platelet-activating factors contribute to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally*. Am J Physiol 2000;279:75-80.
11. Hybertson BM, Bursten SL, Leff JA, et al. *Lisofylline prevents leak, but not neutrophil accumulation, in lungs of rats given IL-1 intratracheally*. J Appl Physiol 1997;82:226-32.
12. Denise EA. *Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂*. J Biol Chem 1994;269:13057-60.
13. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. *Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease state*. J Lipid Mediat 1993;8:1-30.
14. Gelb MH, Jain MK, Berg OG. *Inhibition of phospholipase A₂*. FASEB J 1994;8:916-24.
15. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Masoni M, Novelli G. *Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome*. Shock 2000;13:14-8.
16. Slonim AD, Dalton HJ. *Therapeutic use of a group II phospholipase A₂ inhibitor in acute respiratory distress syndrome: time is of the essence*. Crit Care Med 2001;29:902-3.
17. Kim DK, Fukuda T, Thomson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV. *Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome*. Am J Physiol 1995;269:109-18.
18. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. *Group II phospholipase A₂ mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion*. Ann Surg 2000;232:90-7.
19. Lee YM, Park Y. *PAF contributes to intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury through neutrophilic oxidative stress*. Korean J Physiol Pharmacol 1999;3:405-14.
20. Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, et al. *Free radical and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine*. Gastroenterology 1994;106:629-36.
21. Boyer CS, Bannenberg GL, Neve EPA, Ryefeldt A, Moldeus P. *Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A₂ by exogenous hydrogen peroxide*. Biochem Pharmacol 1995;50:753-61.
22. Ljungman AG, Christer T, Lindahl M. *Endotoxin stimulates the expression of group II PLA₂ in rat lung in vivo and in isolated perfused lungs*. Am J Physiol 1996;270:752-60.
23. Nagase T, Uozumi N, Ishii S, et al. *Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: key role for cytosolic phospholipase A₂*. Nature Immunol 2000;1:42-6.
24. Lindahl M, Tagesson C. *Selective inhibition of group II phospholipase A₂ by quercetin*. Inflammation 1993;17:573-81.
25. Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, et al. *Crucial role of group II phospholipase A₂ in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1292-302.
26. Sun X, Caplan MS, Hsueh W. *Tumor necrosis factor and endotoxin synergistically activates intestinal phospholipase A₂ in mice. Role of endogenous platelet activating factor and effect of exogenous platelet activating factor*. Gut 1994;35:215-9.
27. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. *Oxidants as stimulators of signal transduction*. Free Radical Biol Med 1997;22:269-85.
28. Tan X, Wang H, Gonzalez-Crussi FX, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. *Platelet-activating factor and endotoxin increase the enzyme activity and gene expression of type II phospholipase A₂ in the rat intestine. Role of polymorphonuclear leukocytes*. J Immunol 1996;156:2985-90.
29. Leslie CC. *Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂*. J Biol Chem 1997;272:16709-12.

=국문초록=

배경: 급성 호흡곤란증후군은 다양한 병인에 의해 발병하지만 그 병인론이 아직까지 확립되어 있지 않다. 본 연구에서는 장의 허혈-재관류시에 발병하는 급성 호흡곤란증후군에서 group II phospholipase A₂ (PLA₂)의 역할을 알아보기 위하여 시행되었다. 특히 폐장내의 호중구의 침윤과 더불어 유발되는 산화성 스트레스에서 group II PLA₂의 역할을 규명하려 하였다. **대상 및 방법:** 체중 300g 내외의 Sprague-Dawley 종 흰쥐에서 급성 폐손상을 유발하기 위하여 상장간막동맥을 60분간 차단한 후 120분간 재관류를 시행하였다. Group II PLA₂가 폐장의 손상, 특히 혈관 내피세포의 손상에 미치는 영향을 호중구의 작용과 관련하여 알아보기 위하여 폐누출지수, 폐장내 myeloperoxidase의 활성도, 폐포세척액내의 단백질량을 측정하였다. 또한 장의 허혈-재관류에 따른 폐장내 PLA₂ 활성도의 변화를 검사하였고, 호중구에서의 산소기 형성에 미치는 group II PLA₂의 역할은 분리된 호중구에 rutin, manoolide, scalaradial과 같은 group II PLA₂ 억제제를 이용하여 산소기 생성이 억제됨을 확인함으로써 알아보았다. 장의 허혈-재관류에 따른 폐장 조직의 산화성 스트레스를 확인하기 위해 광학현미경법 및 cerium chloride를 이용한 세포화학적 전자현미경법을 이용하여 폐장내 산소기의 생성을 확인하였다. **결과:** 장의 허혈-재관류 후 폐장내 호중구의 침윤과 함께 급성 폐손상이 유발되었고, 폐장내 myeloperoxidase 활성도, 폐누출지수 및 폐세척액내의 단백질량이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 폐장 및 장에서의 group II PLA₂ 활성도는 허혈-재관류 후 폐장, 장 모두에서 유의하게 증가하였고, rutin에 의해서 현저히 감소하였다 ($p < 0.001$). 사람의 혈액에서 분리된 호중구에서의 산소기 생성을 cytochrome-c reduction assay를 통해 알아본 결과 rutin, manoolide, scalaradial 같은 group II PLA₂ 억제제에 의해 호중구의 산소기 생성이 감소함을 알 수 있었다. 허혈-재관류 후 광학현미경적 소견은 폐장내 염증세포의 침윤 및 모세혈관 주위의 부종이 관찰되었으나 rutin에 의해 이러한 변화는 억제되었다. CeCl₃을 이용한 세포화학적 전자현미경 실험에서 허혈-재관류 후 과산화수소의 생성이 증가하고 rutin에 의해서는 억제됨을 확인하였다. 결론: Group II PLA₂의 억제는 침윤된 호중구로부터 산화기 생성을 억제함으로써 급성 폐손상을 완화하는 것으로 보이며, 따라서 group II PLA₂는 장 허혈-재관류로 유도된 급성 폐손상의 산화성 스트레스에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

중심 단어: 1. 호흡곤란증후군, 급성
2. Phospholipase A₂