

Lipid Mediator에 의한 적혈구 Microvesicle 생성에 대한 연구

정승민 · 배옥남 · 노지윤 · 김수진 · 임경민 · 정진호

서울대학교 약학대학 종합약학연구소

Microvesicle Generation by Lipid Mediator in Erythrocytes

Seung-Min Chung, Ok-Nam Bae, Ji-Yoon Noh, Su-Jin Kim, Kyung-Min Lim and Jin-Ho Chung

Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received October 13, 2006; Accepted November 18, 2006

ABSTRACT. Lipid mediator such as lysophosphatidic acid (LPA) plays an important role in inflammation and wound healing, has been recently reported to induce influx of extracellular calcium into erythrocytes. This elevation in intracellular calcium level may cause destruction of membrane asymmetry and procoagulant microvesicle formation. Thus, we investigated if the lipid mediator could induce microvesicle formation as a result of extracellular calcium influx in human erythrocytes. Treatment with lipid mediator to erythrocytes resulted in microvesicle generation in a concentration-, time-dependent manner. Microvesicles formed expressed procoagulant phosphatidylserine (PS) on their surface membrane significantly as well. LPA did not affect the band 3 phosphorylation which is involved in morphological change in erythrocytes. Pretreatment with suramin did not inhibit LPA-induced microvesicle generation, suggesting microvesicle generation was not receptor-dependent pathway. Depletion of intracellular ATP levels in erythrocytes was suggested to be one of the mechanism for these events.

Keywords: Erythrocytes, Lysophosphatidic acid, Phosphatidylserine, Microvesicle.

서 론

적혈구는 biconcave 모양의 세포로 전체 혈액 세포의 90% 이상을 차지한다. 혈액 구성 성분의 대다수를 차지함에도 불구하고, 적혈구는 혈소판이나 혈관내피세포와 달리 정상적 또는 비정상적인 지혈 과정에 있어서 그 역할이 미미한 것으로 인식되어 왔다. 그러나 임상적으로 적혈구의 수는 출혈시간과 혈전성 질환의 발병과 밀접한 상관성이 보고되는 등 많은 연구들에서 적혈구 또한 정상적 또는 병적인 지혈 과정에 관여할 수 있음이 제시되었다(Livio *et al.*, 1982; Weiss *et al.*, 1996).

적혈구는 적혈구 자신의 물리적 특성이 변화하거나(Zannad and Stoltz, 1992) 혈소판과의 상호작용을 경우

(Santos *et al.*, 1991) 또는 세포막 표면에 혈액 응고 과정을 촉진시킬 수 있는 phosphatidylserine(PS)을 노출 시킴으로써 지혈 및 혈전 생성에 관여할 수 있다(Zwaal *et al.*, 1977). 이 중 PS 노출은 혈액 응고 과정에서 tenase 복합체 및 prothrombinase 복합체의 회합을 촉진시켜 thrombin 생성 속도를 현저하게 증폭시키는 procoagulant 활성을 나타냄으로써 응혈 생성에 기여한다(Kalafatis *et al.*, 1994). 이와 동시에 세포 표면의 PS 발현은 혈관내피세포에 대한 적혈구의 부착력도 증가시켜 혈관 폐색의 원인이 될 수 있다(Panetti *et al.*, 2001). 세포내의 칼슘 증가, ATP 고갈 등과 같은 자극이 적혈구에 가해질 때나 sickle cell disease와 같은 병적인 상태에서 이러한 PS의 노출이 유발될 수 있으며, 이 때 microvesicle도 동시에 생성되어 혈액 응고 과정을 촉진시킬 수 있다(Mohandas and Chasis, 1993).

한편, lipid mediator 인 lysophosphatidic acid(LPA)는 amphiphatic nature을 가진 인지질로 주로 혈액 응고 과

Correspondence to: Jin-Ho Chung, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
E-mail: jhc302@plaza.snu.ac.kr

정에서 활성화된 혈소판으로부터 유리된다(Tokumura *et al.*, 1994). LPA는 혈관 및 혈액내의 세포들을 자극함으로써 응혈 형성과 상처 치유에 관여한다. LPA는 혈소판의 응집을 유발하는 이외에도 혈관 평활근, 혈관내피세포, fibroblast 등의 증식을 촉진시키고, 평활근의 수축을 유발하며, 세포 표면이 fibronectin에 결합하도록 유도하고, monocyte, 림프구, neutrophil을 동원시키는 등 다양한 생리활성을 나타낸다(Panetti *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2000; Torti *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 2001). 적혈구에서는 세포내로 외부 칼슘의 유입을 유발할 수 있음이 보고되었다(Yang *et al.*, 2000). 적혈구내 칼슘 증가는 KCl 유출, polyphosphoositides의 붕괴, 단백 응집, 세포 골격근 고정 단백질의 절단 등 다양한 생화학적 변화와 함께 PS 노출 및 procoagulant microvesicle 생성도 유발함으로써 적혈구가 혈전 생성에 관여할 수 있도록 한다. 따라서 LPA가 적혈구에서 칼슘 농도를 증가시킨다고 하는 보고는 LPA가 적혈구의 세포막에 PS 노출이나 표면에 PS가 발현된 procoagulant microvesicle 유리와 같은 일련의 변화를 유발할 수 있으며 이를 통해 적혈구가 정상적인 지혈 과정 또는 혈관폐색에 관여할 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 lipid mediator인 LPA와 관련된 추가 연구로서 적혈구로부터 microvesicle 생성을 알아보고 이 때 microvesicle의 표면에도 PS가 노출되는지 여부를 연구하였다. 또한 이 과정에서 수용체가 매개되지 않는 않으며, ATP가 중요함을 확인하였다.

재료 및 방법

적혈구 분리

Acid-citrate-dextrose를 항응고제로 하여 2주일 이내에 약물을 복용한 적이 없는 건강한 남성의 팔 정맥으로부터 vacutainer를 이용하여 혈액을 채취하였다. 얻은 혈액을 200 g에서 15분간 원심분리하여 platelet rich plasma와 buffy coat를 aspirator로 제거하였다. 남은 적혈구 잔사를 phosphate buffered saline(PBS: 1.06 mM KH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 2.96 mM Na_2HPO_4)로 3번 세척한 후 Tris buffered saline(TBS: 15 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , pH 7.4)으로 1번 더 세척하였다. CaCl_2 가 1 mM 포함된 TBS에 적혈구 수가 1×10^8 cells/ml이 되도록 재현탁시킨 후 이후 실험에 사용하였다. 적혈구 수는 광학 현미경에서 hemacytometer를 사용하여 측정하였다.

Phosphatidylserine(PS) 발현 및 microvesicle 생성 측정

적혈구 현탁액에 5, 10, 20 μM 농도의 lysophosphatidic

acid(LPA)을 15분간 처리한 후 10 μl 를 취해 annexin V-FITC와 anti-glycophorin-A-RPE로 차광조건에서 30분간 염색하였다. Annexin V-FITC는 phosphatidylserine(PS) 발현의 marker로 사용하였으며, anti-glycophorin-A-RPE는 적혈구와 적혈구 유래 microvesicle에 대한 marker로 사용하였다. Annexin V 결합에 대한 음성 대조군은 염색할 때 CaCl_2 2.5 mM 대신 EDTA 2.5 mM이 존재하도록 하여 염색하였다. 염색한 시료에 2.5 mM CaCl_2 또는 2.5 mM EDTA가 들어있는 TBS 2 ml을 가해 희석한 후 PAS (Partec, Germany)에서 분석하였다. 이 때 forward scatter, side scatter, FITC 형광, PE 형광의 4가지 지표를 측정하였으며 분석 프로그램으로는 Winlist software를 사용하였다.

적혈구 유래 microvesicle 분리

LPA 20 μM 과 적혈구 현탁액을 15분간 배양한 후 3,000 g에서 15분간 원심분리하여 microvesicle이 들어 있는 상등액을 취하였다. 상등액 안에 들어 있던 microvesicle은 L-80 초원심분리기(Beckman, CA)를 이용하여 4°C에서 100,000 g로 1시간 원심분리하여 가라앉혔다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 남은 잔사를 TBS로 재현탁하여 이후 PS 노출을 측정하는데 사용하였다.

Band 3의 tyrosine 잔기 인산화 측정

LPA를 처리한 적혈구 현탁액 1 ml을 원심분리하여 상등액을 제거하고 차가운 lysis buffer(5 mM sodium phosphate, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 0.1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EGTA) 10 ml을 가해 적혈구를 용혈시켰다. 4°C에서 40,000 g로 10분간 원심분리하여 용혈액으로부터 세포막 분획을 가라앉힌 후 상등액을 제거하였다. 세포막 잔사를 1회 세척하고 lysis buffer에 재현탁시켰다. 세포막 현탁액을 Laemli sample buffer와 1 : 2(v/v)로 혼합하여 5분간 boiling한 후 SDS-PAGE에 적용시켰다. 각 lane당 7.5 μg 의 단백질을 loading했으며 단백질 정량은 Bradford 법(Bradford, 1976)을 이용하였다. SDS-PAGE에서 시료를 전개한 후 Immobion-PVDF membrane(Millipore, Billerica, MA)으로 transblot하였다. Membrane을 3% bovine serum albumin이 포함된 TBS-T(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)로 4°C에서 blocking하고 monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (1 : 1000, Upstate, Waltham, MA)와 1시간 반응시켰다. Antibody를 씻어낸 후 goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody(1 : 5000)를 1시간 동안 적용시킨 다음 ECL kit로 분석하였다. 분석이 끝난 membrane은 stripping buffer(2% SDS, 50

mM Tris HCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)에 56°C에서 1시간 동안 담가 놓았다가 band-3 검출에 사용하였다. Band-3는 monoclonal anti-band 3 antibody(1 : 5000)를 이용하여 phosphotyrosine 검출과 동일한 방법으로 검출하였다.

적혈구내 ATP 양 측정

적혈구 현탁액 500 μ l에 LPA 또는 PBS를 가하여 37°C에서 15분간 배양한 다음 10,000 g에서 30초간 원심분리하여 적혈구를 가라앉혔다. 상등액을 제거하고 얻은 적혈구 잔사를 TBS로 1번 세척한 후 다시 TBS 100 μ l를 가해 재현탁 시켰다. 현탁액 일부는 ATP 정량에 사용하였으며 일부는 헤모글로빈 정량에 사용하였다. ATP 정량을 위해 현탁액 20 μ l에 추출 완충액(10% TCA/100 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 7.8, 3/2, v/v) 200 μ l를 가해 격렬하게 vortex한 후 얼음위에서 시료를 20분간 방치하였다. 방치한 혼합액을 13,000 g에서 2분간 원심분리한 다음 얻은 상등액 20 μ l을 980 μ l의 차가운 Tris-acetate buffer(100mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 7.8)와 혼합하였다. 이렇게 하여 얻은 시료를 즉시 ATP 측정에 사용하거나 -70°C에 보관하였다가 이후에 ATP 측정에 사용하였다. ATP 양은 ATP bioluminescent assay kit (Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 kit에서 제시하는 방법에 따라 정량하였다. 발생한 chemiluminescence는 Auto Lumat LB953(Berthold, Germany)에서 측정하였다. 적혈구내 헤모글로빈은 Drabkin's solution을 사용하여 정량하였으며, ATP 양은 헤모글로빈 양에 대한 값으로 표준화하여 표시하였다.

자료 분석 및 통계 처리

실험결과는 mean \pm SEM으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test로서 검증하였으며, 세 군 이상의 비교에서는 ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 모든 경우에서 $p < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

Lipid mediator인 lysophosphatidic acid(LPA)가 적혈구에서 microvesicle 생성을 촉진하는지를 확인하기 위하여 분리한 사람의 적혈구에 LPA를 15분간 처리한 후 여러 농도에서 flow cytometry로 측정·분석하였다. 그 결과 LPA 5, 10, 20 μ M의 처리 농도 의존적으로 적혈구에서 크기가 매우 작은 입자들이 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 적혈구 세포막에 특이적으로 존재하는 glycophorin

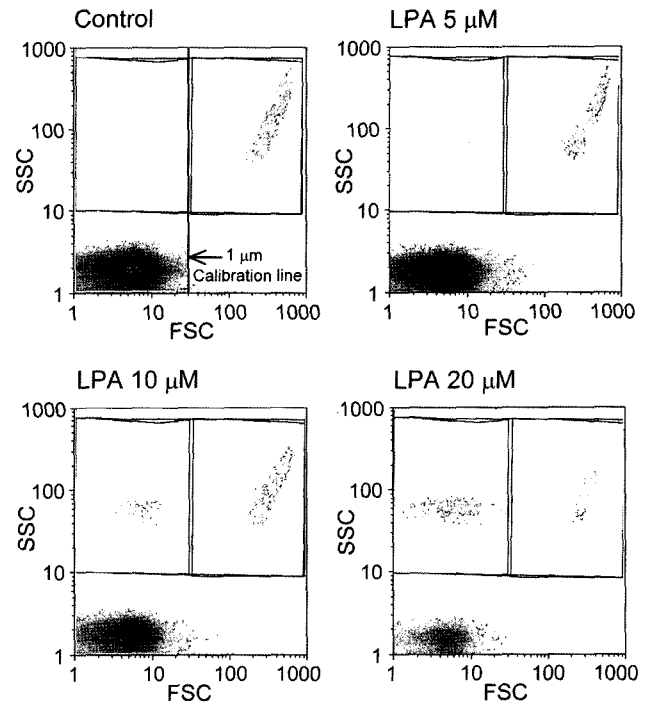


Fig. 1. Concentration-dependent microvesicle release in human erythrocytes. Erythrocytes were treated with several concentrations of LPA for 15 min. In each spectrum, top panel on the right represents erythrocytes itself, while top panel on the left indicates the microvesicles formed.

A에 대한 항체를 사용하여 생성되는 작은 입자 분획이 적혈구 유래임을 확인하였다. 한편 작은 입자들이 plot에서 나타내는 위치는 기존 보고들에서 확인된 microvesicle 검출 위치와 일치하였다. 이와 함께 직경 1 μ m의 표준 bead를 이용, bead가 나타나는 위치와 입자들이 관찰되는 위치를 비교함으로써 생성되는 입자들의 직경이 1 μ m 미만임을 확인하였다. LPA에 의한 microvesicle의 생성은 5분이라는 짧은 시간에도 관찰이 되었으며 15분부터 포화가 되는 양상을 보였다(Fig. 2). 생성된 microvesicle의 PS 노출 정도를 확인한 결과, LPA 처리 후 분리된 microvesicle에서도 PS를 노출시킴을 확인하였다(자료제시안함).

Bordin *et al.*(1995)은 band 3의 tyrosine 잔기 인산화를 유도하였을 때 적혈구의 모양 변화가 나타남을 관찰하여 band 3의 tyrosine 잔기 인산화가 적혈구의 모양 변화에 관여할 것임을 제시하였다. 따라서 LPA에 의한 적혈구 microvesicle 생성에 band 3의 인산화가 관여하는지 확인하였다. 양성 대조군으로 사용한 diamide는 phosphotyrosine phosphatase 활성을 저해함으로써 band 3의 인산화를 유발한다. Diamide 1 mM, 30분 처리에 의해서는 band 3의 인산화가 유도된 반면 LPA는 band

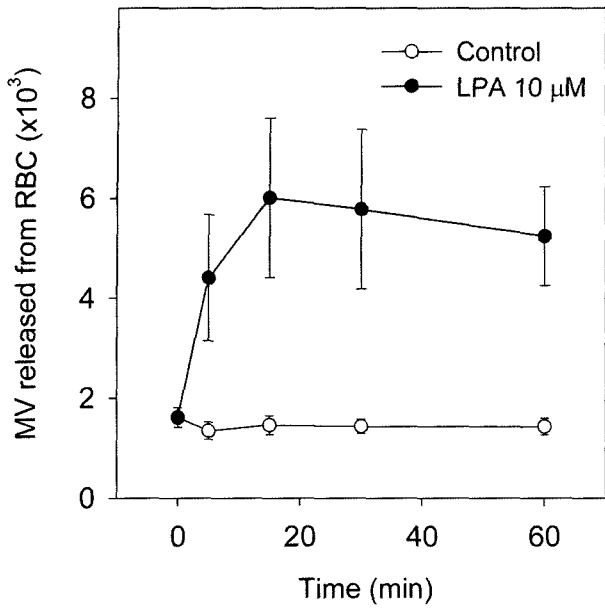


Fig. 2. Time-dependent microvesicle release in human erythrocytes. Erythrocytes were incubated with 10 μM LPA for indicated time periods. Generated MVs were counted from 20,000 cells using flow cytometry. Values are mean ± SEM of three independent experiments.

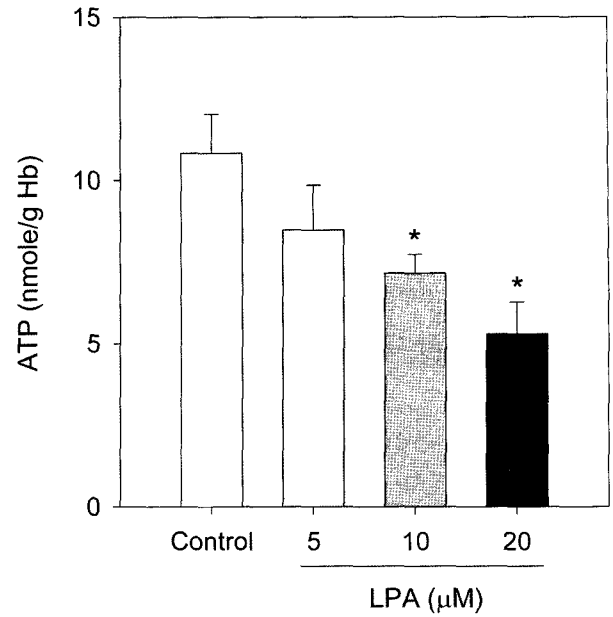


Fig. 4. Effect of LPA on ATP levels in human erythrocytes. LPA was added to erythrocyte suspension for 15 min and intracellular ATP levels were then measured by luciferin-luciferase assay. Values are mean ± SEM of five independent experiments. * Represent significant differences from control ($p < 0.05$).

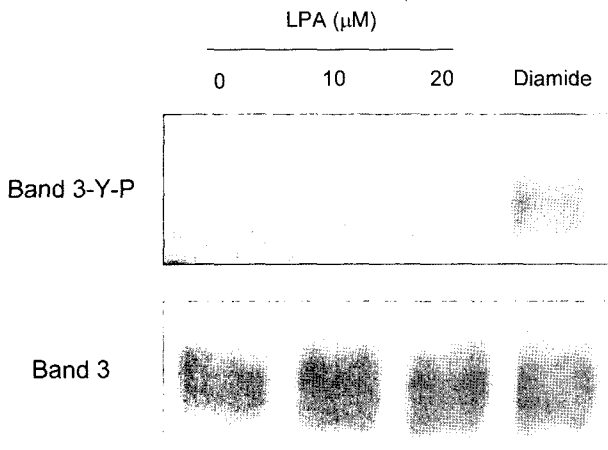


Fig. 3. Effect of LPA on band 3 tyrosine phosphorylation. Erythrocytes were incubated with LPA for 15 min or 1 mM diamide for 30 min at 37°C. Membranes were prepared and analyzed by SDS-PAGE and phosphotyrosine immunoblotting.

3의 인산화에 아무런 영향도 미치지 않았다(Fig. 3). Band 3 양 자체는 그룹간 차이가 없었다.

적혈구 세포막의 비대칭성 유지에 관여하는 효소의 활성에는 ATP가 필수적이므로, LPA 처리에 의해 적혈구내 ATP 양이 변화될 수 있는지 측정하였다. LPA는 농도 의존적으로 세포내 ATP level을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 4). 일반적으로 LPA 반응은 특이적인 G-protein coupled

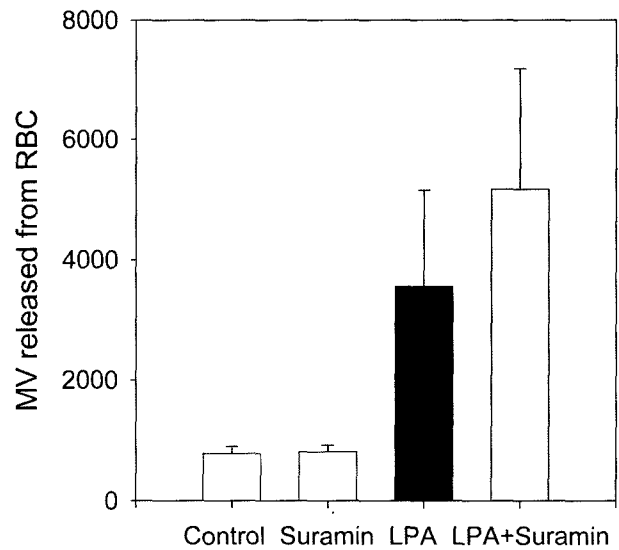


Fig. 5. Effects of suramin on LPA-induced microvesiculation in human erythrocytes. After pretreatment of suramin at 200 μM for 5 min, LPA-induced microvesicle generation was analyzed in flow cytometer. Values are mean ± SEM of three independent experiments.

receptor(GPCR)을 경유한다고 알려져 있다. LPA가 적혈구에 미치는 효과가 현재까지 알려진 수용체를 경유하는지 확인하기 위해 GPCR를 차단한다고 알려진 suramin

을 전처리하여 LPA의 효과에 미치는 영향을 살펴보았다. Suramin 200 μ M 전처리하는 LPA가 유발한 PS 노출 및 microvesicle 생성을 감소시키지 못하였다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서는 lysophosphatidic acid(LPA)가 인간 적혈구의 microvesicle 생성 및 microvesicle 표면의 PS 노출에 관여함을 확인하였다. 본 연구에서 사용한 LPA의 농도는 모두 생체 내에서 도달 가능한 농도 범위이다. LPA는 혈장에서는 거의 검출이 되지 않지만 혈청 중에서도 그 농도가 최고 20 μ M까지 상승하는 것으로 보고되었다(Back *et al.*, 1977). 이들은 본 연구에서 사용한 농도 범위로, 이는 *in vivo*에서도 LPA 및 다른 내인성 자극들의 효과를 기대할 수 있음을 제시한다.

LPA 처리는 적혈구내 ATP 양을 감소시켰는데 ATP 감소 원인 중 하나로는 Ca^{2+} -ATPase의 활성화를 생각할 수 있다. LPA에 의해 세포내 칼슘이 증가되므로 이를 제거하기 위해 Ca^{2+} -ATPase가 활성화 되었을 것으로 사료되며 이 활성화 과정 중에서 ATP가 소모되었을 것으로 추정된다. 또한 LPA 자체가 Ca^{2+} -ATPase를 직접 활성화 시킬 수 있다는 보고도 존재한다(Tokumura *et al.*, 1985). 그러나 LPA에 의해 ATP의 세포막에 대한 투과성이 증가하였을 가능성도 배제할 수 없다. LPA의 이러한 ATP 감소 효과는 인지질 수송효소의 활성 감소로 이어져 생성된 microvesicle 표면에 PS의 효과를 증폭, 지속시키는데 기여할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 LPA를 포함한 내인성 인자들에 의해 적혈구가 PS를 발현할 뿐 아니라 procoagulant microvesicle을 유리할 수 있음을 밝혔다. 적혈구에서 microvesicle 생성에 관한 연구는 주로 sickle cell disease와 같은 병적인 상황이나 calcium ionophore와 같은 외인성 물질에 의해 유도되는 경우에 관해 주로 수행되어 온 반면 본 연구에서는 내인성 자극들에 의해서 적혈구 procoagulant microvesicle이 생성될 수 있음을 보였다. 앞으로 적혈구에서 vesiculation을 유발할 수 있는 내인성 인자들이 더 존재하는지에 관한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다. 이러한 생리학적 측면뿐 만이 아니라 화학물질에 의하여 적혈구의 microvesicle 생성이 증가될 수 있다면 혈전 가능성이 있기 때문에 추후 검토가 필요하다.

LPA의 세포와 관련된 현상의 대부분은 특이적인 G-protein coupled receptor(GPCR)를 경유한 반응이다. LPA가 적혈구에 미치는 효과가 현재까지 알려진 수용체를 경유하는지 확인하기 위해 GPCR를 차단한다고 알려진 suramin을 전처리하여 LPA의 효과에 미치는 영향을

살펴보았다. Suramin 200 μ M을 전처리 한 결과, LPA는 microvesicle 생성을 감소시키지 못하였다(Fig. 5). 이 결과에 대해서는 다음과 같은 두 가지 해석이 가능하다. 적혈구에 지금까지 알려진 수용체와는 전혀 다른 LPA 수용체가 존재할 가능성이 그 첫 번째이다. 적혈구에 LPA 수용체가 존재하는지에 관한 연구 보고는 아직 없다. 그러나 다른 세포들에서 연구된 결과를 보면 지금까지 알려진 수용체와는 별도의 수용체가 존재할 가능성을 배제할 수 없다. 두 번째로 적혈구로 확산하여 들어간 LPA가 신호 전달 경로를 직접 활성화시켰을 가능성이 존재한다. 즉 LPA가 직접적인 second messenger로 작용할 가능성이 있다. 혈소판으로부터 유리된 LPA가 인접한 RAW 264.7 세포안으로 들어가 PPAR γ 의 agonist로 작용한다고 한 보고(McIntyre *et al.*, 2003)는 이러한 가능성을 뒷받침해준다. 본 연구에서 관찰한 LPA가 유발하는 현상들에 수용체가 관여하는지에 관한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 2005년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-070-E00253)을 받아 연구되었습니다.

참고문헌

- Back, L.D., Radbill, J.R. and Crawford, D.W. (1977). Analysis of pulsatile, viscous blood flow through diseased coronary arteries of man. *J. Biomech.*, **10**, 339-353.
- Bauer, M., Maschberger, P., Quek, L., Bridson, S.J., Dash, D., Weiss, M., Watson, S.P. and Siess, W. (2001). Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin α IIb β 3 inside-out signalling during shape change. *Thromb. Haemost.*, **85**, 331-340.
- Bordin, L., Clari, G., Moro, I., Dalla, V.F. and Moret, V. (1995). Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 249-257.
- Kalafatis, M., Swords, N.A., Rand, M.D. and Mann, K.G. (1994). Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1227**, 113-129.
- Livio, M., Gotti, E., Marchesi, D., Mecca, G., Remuzzi, G. and de Gaetano, G. (1982). Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet*, **2**, 1013-1015.
- McIntyre, T.M., Pontsler, A.V., Silva, A.R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J.C., Zimmerman, G.A., Hama, K., Aoki, J.,

- Arai, H. and Prestwich, G.D. (2003). Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 131-136.
- Mohandas, N. and Chasis, J.A. (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin. Hematol.*, **30**, 171-192.
- Panetti, T.S., Magnusson, M.K., Peyruchaud, O., Zhang, Q., Cooke, M.E., Sakai, T. and Mosher, D.F. (2001). Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **64**, 93-106.
- Santos, M.T., Valles, J., Marcus, A.J., Safier, L.B., Broekman, M.J., Islam, N., Ullman, H.L., Eiroa, A.M. and Aznar, J. (1991). Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J. Clin. Invest.*, **87**, 571-580.
- Tokumura, A., Mostafa, M.H., Nelson, D.R. and Hanahan, D.J. (1985). Stimulation of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in human erythrocyte membranes by synthetic lysophosphatidic acids and lysophosphatidylcholines. Effects of chain length and degree of unsaturation of the fatty acid groups. *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 568-574.
- Tokumura, A., Imori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. and Tanaka, S. (1994). Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am. J. Physiol.*, **267**, C204-C210.
- Torti, M., Tolnai, F.E., Bertoni, A., Sinigaglia, F. and Balduini, C. (1996). Activation of human platelets by lysophosphatidic acid. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **7**, 253-255.
- Weiss, H.J., Lages, B., Hoffmann, T. and Turitto, V.T. (1996). Correction of the platelet adhesion defect in delta-storage pool deficiency at elevated hematocrit—possible role of adenosine diphosphate. *Blood*, **87**, 4214-4222.
- Yang, L., Andrews, D.A. and Low, P.S. (2000). Lysophosphatidic acid opens a Ca⁺⁺ channel in human erythrocytes. *Blood*, **95**, 2420-2425.
- Zannad, F. and Stoltz, J.F. (1992). Blood rheology in arterial hypertension. *J. Hypertens.*, **Suppl 10**, S69-S78.
- Zheng, Y., Voice, J.K., Kong, Y. and Goetzl, E.J. (2000). Altered expression and functional profile of lysophosphatidic acid receptors in mitogen-activated human blood T lymphocytes. *FASEB J.*, **14**, 2387-2389.
- Zwaal, R.F., Comfurius, P. and van Deenen, L.L. (1977). Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature*, **268**, 358-360.