

Glutathione이 고갈된 흰쥐에서 내독소에 의해 유도된 급성 폐손상시 PLA₂ 억제가 산소기 형성에 미치는 영향

대구 효성 가톨릭대학교 의과대학 생리학교실, 영남대학교 생물학과*

조현국*, 문혜정*, 박원화*, 김태완, 이영만

= Abstract =

Effect of the Inhibition of PLA₂ on the Oxidative Stress in the Lungs of Glutathione Depleted Rats Given Endotoxin Intratracheally

Hyun Gug Cho, Ph.D.*, Hye-Jung Moon*, Won-Hark Park, Ph.D.*

Teoan Kim, Ph.D., Young Man Lee, M.D.

Department of Physiology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu, Korea

*Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan, Kyongbuk, Korea**

Background : As one of the etiologies of acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis is one of the morbid causes of this cryptogenic malady. Even though many documents on the role of endotoxin (ETX) in the pathogenesis of ARDS have been issued, still the underlying mechanism associated with oxidative stress and activation of PLA₂ has been controversial. In the present study, the role of phospholipase A₂ (PLA₂) in the neutrophilic respiratory burst, which is presumed to cause acute lung injury during sepsis, was probed.

Method : In glutathione-depleted Sprague-Dawley rats, lung leak, infiltration of neutrophils, PLA₂ activity and lipid peroxidation in the lung were measured after intratracheal instillation of endotoxin(delete). In addition, gamma glutamyl transferase (GGT) activity and the amount of pulmonary surfactant were measured. Morphologically, the changes in ultrastructure and cytochemical demonstration of oxidants were presented to confirm the neutrophilic oxidative stress and to elucidate the effects of PLA₂ activation on (delete) oxidative stress.

Results : Instillation of ETX to glutathione-depleted rats intensified lung leak and lipid peroxidation when com

*본 연구는 1998년도 교육부 학술연구 조성비(과학기술 기초중점연구 1998-021-F00098)에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :

Young Man Lee, M.D.

Department of Physiology, Catholic University of Taegu-Hyosung, School of Medicine
3056-4 Nam Gu DaeMyung Dong Taegu, Korea. 705-034.

Phone : 053-650-4472 Fax : 053-621-4106 E-mail : leeym@cuth.cataegu.ac.kr

pared with non-glutathione depleted rats treated with the endotoxin. Moreover, oxidative stress was confirmed by the assay of GGT and malondialdehyde. Functionally, the depletion of glutathione altered the secretion of pulmonary surfactant from alveolar type II cells. Ultrastructurally and cytochemically, oxidative stress was also confirmed after treatment of with ETX and diethylmaleate (DEM).

Conclusion : The endotoxin-induced acute lung injury was mediated by oxidative stress, which in turn was provoked by the neutrophilic respiratory burst.

The activation of PLA₂ in the lung seems to play a pivotal role in the oxidative stress of the lung. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 246-259)

Key words : ARDS, Neutrophil, Oxidative stress, PLA₂.

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 패혈증, 화상, 외상 등의 다양한 병인에 의해 발병하면서 사망률이 높은 질병이지만 아직까지도 그 병인론(pathogenesis)이 잘 알려져 있지 않다. 최근 ARDS에 관한 연구 및 치료는 주로 폐장 내의 염증반응의 경감 및 이에 따른 급성 폐부종의 감소를 유도하는데 초점이 맞춰지고 있으며, 특히 산소기와 연관된 연구가 활발하다. 특히 ARDS의 병인이 다양한 만큼 그 병인론도 원인에 따라 차이가 있을 것이라는 보고¹⁾는 ARDS의 병태생리학이 복잡하고 그 원인에 따른 다양한 치료가 요구된다는 것을 의미한다. 특히 패혈증에 의한 ARDS는 다른 원인에 의한 것보다 사망률이 높고, 아직도 명확한 병인론이 제시되지 않고 있다.

최근 Delclaux 등²⁾에 따르면 내독소에 의한 급성 폐손상시 혈관내피세포의 손상의 주된 원인은 호중구에서 유리되는 단백분해효소가 그 원인이라고 하고 여기에는 산소기의 작용이 관여한다고 한다. 내독소에 의한 급성 폐손상에는 대식세포에서 유리되는 염증성 cytokine이 관여하며, 이러한 cytokine은 phospholipase A₂ (PLA₂)의 활성화에 관여한다³⁾. PLA₂의 활성화는 호중구 및 염증세포의 화학주성(chemotaxis) 및 산소기의 형성에 관여하는 지질분자를 유리하는데, 이중에서도 arachidonic acid 및 platelet

activating factor (PAF)는 직접 호중구막에 작용하여 산소기의 형성을 유발하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}.

호중구의 산소기의 형성에 따른 조직의 손상, 즉 respiratory burst에 따른 산소기의 생성이 oxidative stress를 유발하여 조직의 손상을 유발하는 기전은 알려져 있지만 ARDS시 oxidative stress의 역할 및 기전은 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다. Terada 등⁶⁾은 여러가지 급성 폐손상의 model에서 산소기가 조직손상의 원인이며 특히 xanthine oxidase (XO)가 산소기 생성의 주된 원인임을 호중구의 침윤과 관련시켜 보고한 바 있다. 그러나 XO 억제제는 급성 폐손상의 부분적인 억제만을 가져옴으로 XO 외에 산소기 형성에 관여하는 인자가 있을 것으로 생각된다. 또한 폐장에서는 XO가 발현되지 않는 점으로 미루어서도⁷⁾ XO 외의 다른 매개체가 존재하지 않나 생각된다.

급성 폐손상시 호중구의 침윤이 중요한 요소라고 알려져 있으나 단순한 호중구의 침윤만으로는 조직의 손상이 유발되지 않는다. 즉 호중구막의 NADPH oxidase의 활성화가 선행되어야 한다. 내독소에 의한 급성 폐손상시 호중구의 역할은 잘 알려져 있지 않고, 특히 내독소에 의한 산소기 형성의 기전도 잘 알려져 있지 않다. Lee 등^{8,9)}은 최근 몇가지 ARDS model 즉 interleukin-1 (IL-1), gut ischemia reperfusion (I/R) model에서 PLA₂가 산소 호중구의 산소기 형성에 관여함을 보고하고 있다. 즉 cytokine이나

재관류 손상시 보이는 급성 폐손상이 PLA₂를 억제하면 감소하는 것으로 미루어 폐장조직의 oxidative stress에 직접적으로 관여할 것으로 보고 있다. PLA₂의 활성화가 염증반응에 관여하는 지질분자를 생성하는 대사의 시발점이라는 사실을 감안한다면, PLA₂의 억제에 따른 조직손상의 감소는 산소기의 생성과도 연관이 있지 않나 추측된다. 최근 PLA₂의 여러가지 아형(亞型)이 밝혀지고 이러한 아형에 대한 염증반응과의 관계가 연구되고 있으며¹⁰ 이러한 PLA₂의 작용과 호중구에서의 산소기의 형성에 관여한다는 보고도 있다¹¹.

따라서 본 연구에서는 내독소에 의한 급성 폐손상시 PLA₂와 oxidative stress의 관계를 밝힘으로써 ARDS의 병인론의 일부를 규명하고자 하였다. 즉 흰쥐에서 oxidative stress시 방어기전에 중요한 역할을 하는 glutathione을 고갈시킨 다음 산소기에 민감하게 반응하게 한 뒤, 이때 PLA₂의 역할을 산소기의 생성과 연관하여 알아보고자 비특이성 PLA₂ 억제제인 mepacrine으로 PLA₂를 억제하여 내독소에 의한 ARDS의 발병기전을 알아보고자 하였다. 흥미로운 것은 인지질이 주성분인 pulmonary surfactant가 PLA₂의 작용에 의해 가수분해 되어 급성 폐손상에 관여한다는 보고¹²도 있으므로 pulmonary surfactant의 분비에 대해서도 알아보았다.

대상 및 방법

실험재료는 ³H-dipalmitoylphosphatidylcholine 및 ¹²⁵I-bovine serum albumin (BSA)은 미국 Dupont사에서 구입하였고 나머지 시약들은 모두 Sigma사 제품을 사용하였다. 실험동물로는 체중 300g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 암, 수 구별없이 사용하였다.

실험군은 대조군, 내독소 투여군, 내독소 투여후 diethylmaleate (DEM)를 투여한 군, 내독소 투여후 mepacrine을 투여한 군 및 내독소, DEM 및 mepacrine을 투여한 군으로 구분하였다. PLA₂의 비

특이적 억제제인 mepacrine (Sigma)은 체중 kg 당 50mg을 복강 내로 투여하였다.

급성 폐손상의 유발 :

내독소를 이용하여 급성 폐손상을 유발하기 위해서는 대장균 내독소(*E. coli* endotoxin, type 0127 ; B8) 100 µg을 생리적 식염수에 녹인 후 기도 내로 직접 분무하였다. 내독소 투여후 5시간이 경과하면 급성 폐손상이 유발되었다.

Glutathione의 고갈 :

흰쥐에서 체내 glutathione의 고갈을 위해서는 Deneke등의 방법¹³에 따라 DEM을 이용하였다. 즉, 기도 내 내독소를 주입한 직후 체중 100g 당 0.1ml의 DEM을 복강 내 주사하였다. DEM 주사후 5시간 뒤 폐장 내의 glutathione (GSH)의 고갈을 확인하기 위하여 Ellman 등의 방법¹⁴에 따라 폐조직 마쇄균 질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5ml를 가하고 원심분리한 후, 상등액 일정량을 0.1mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 *p*-nitrothiophenol을 측정하였다. GSH 함량은 폐조직 g당 µmol로 표시하였다. Glutathione peroxidase (GPx)의 활성도 측정은 Pagila와 Valentine의 방법¹⁵에 준하여 glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25℃에서 5분 동안 산화시킨 NADPH 양을 nmole로 표시하였다. Glutathione reductase (GSSG-Rd) 활성도 측정은 Carlborg와 Mannervik의 방법¹⁶에 준하여 산화형 glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 30℃에서 10분간 반응시켜 340nm에서 NADPH의 산화로 인한 흡광도 감소율을 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분 동안 산화시킨 NADPH 양을 nmole로 표시하였다. Glutathione S-transferase (GST) 활성도 측정은 Habig 등의 방법¹⁷에 따라 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 효소 반응액

중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을 nmole로 나타내었다.

급성 폐부종의 확인:

급성 폐손상에서 혈관내피세포의 손상에 따른 혈중 단백질의 폐포 및 간질조직으로의 유출을 확인하기 위하여 단백질누출지수(lung leak index) 및 폐세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내의 단백질 함량을 측정하였다. 단백질누출을 확인하기 위해서는 내독소 투여 4시간 30분 뒤 경정맥을 통하여 1 μ Ci의 ¹²⁵I-BSA를 투여하고, 30분 뒤 혈액 1.0ml 및 생리적 식염수로 관류한 우측 폐장 내의 방사능 활동도를 γ -counter를 이용하여 측정 후 계산하였다. 즉 우측 폐장의 방사능 활동도/혈액 1.0ml 내의 방사능 활동도의 비를 계산하여 단백질누출지수로 하였다. BALF 내의 단백질함량은 BAL을 시행 후 세포성분을 원심분리하여 제거한 상층액을 이용하여 Brown 등¹⁸의 bicinchoninic법으로 측정하였다.

폐장 내 호중구 침윤의 확인:

폐장 내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 myeloperoxidase (MPO)의 활성도와 BALF 내 호중구의 수를 산정하였다. MPO의 측정은 Goldblum 등¹⁹의 방법에 따라 좌측 폐장을 조직 분쇄기(Polytron, Switzland)를 이용하여 4.0ml, pH 7.4의 potassium phosphate 용액 내에서 분쇄 후, 18,000rpm, 4℃에서 30분간 원심한 뒤 상층액은 버렸다. 그 뒤 pellet을 다시 4.0ml 50mM, pH 6.0의 potassium phosphate 용액에 부유시킨 뒤 90초간 sonication하고 이를 60℃의 수조에서 120분간 incubation하였다. 이후 1.0ml의 분쇄용액을 20,000rpm으로 원심분리 후 0.1ml의 상층액을 과산화수소가 포함된 o-dianisidine용액과 반응시켜 측정하였다.

BALF 내 호중구의 산정은 BALF를 1,500rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 분리하고, 세포성분을 0.1ml의 생리적 식염수에 부유시킨 후 hemocytometer를 이용하여 WBC를 산정하고 일부는 cytopspin을 이용하여 도말표본을 만든 후 Wright 염색을 시행 후 호중구의 백분율을 구하고 BALF 내

총 호중구의 수를 계산하였다.

Oxidative stress의 확인:

내독소를 투여 후 조직 내의 oxidative stress 확인을 위해 lipid peroxidation의 산물인 malondialdehyde (MDA)의 폐장 내 함량을 Carraway 등의 방법²⁰에 따라 측정하였다. 또한 조직 내 산소기의 생성이 증가하면 그 활동도가 증가한다고 알려진 γ -glutamyltransferase (GGT)의 폐장 내 활성도를 Meister 등의 방법²¹에 따라 측정하였다.

폐장 내 PLA₂ 활성도의 측정:

내독소를 투여후 폐장 내 PLA₂의 활성도의 변화를 알아보기 위하여 Katsumata 등의 방법²²에 따라 측정하였다. PLA₂에 의해 가수분해 되는 기질로는 L- α -dipalmitoyl-2(9,10(N)³H-palmitoyl)-phosphatidylcholine을 각 sample당 2 μ Ci를 사용하였고 PLA₂의 작용에 의해 생성되는 유리지방산을 측정하여 PLA₂의 활성도로 하였다. PLA₂의 활성도 1 unit는 분당 1 μ mol의 유리 지방산이 생성되는 것으로 정의하였다.

Pulmonary surfactant의 정량:

pulmonary surfactant의 주성분인 인지질을 정량하기 위하여 BALF 내의 지질을 Bligh와 Dyer의 방법²³으로 추출하고 Hess와 Derr의 방법²⁴으로 인지질 인을 정량한 후 Corbet 등의 방법²⁵에 따라 인지질로 환산하였다.

전자현미경 관찰:

미세구조적인 관찰을 위하여 폐 조직을 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 밀폐된 용기에 진공을 이용하여 조직 내 공기를 제거하였다. 전고정이 끝난 조직은 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세한 후 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. Alcohol-propylene oxide 계열로 순차적으로 증가하는 농도에 따라 탈수하고 epoxy resin에 포매하였다. 포매된 조직은 열증합시키고 60-70nm 초박절편한 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(H-600, Hitachi)으로 관찰하였다. 세포화학적 관찰은 폐 조직 적출 즉시 2.0mM cerium chloride,

Table 1. Comparison of the contents of glutathione, the activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase between control and DEM treated rats' lung lungs

	Control	DEM treated
GSH ¹⁾	1.209 ± 0.042 (n=9)	0.354 ± 0.049*** (n=9)
GPx ²⁾	18.253 ± 0.014 (n=9)	16.059 ± 1.009 (n=10)
GSSG Rd ³⁾	2.985 ± 0.091 (n=9)	2.507 ± 0.203 (n=10)
GST ⁴⁾	56.834 ± 2.408 (n=9)	68.095 ± 5.124 (n=10)

Data represent mean ± SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses.

***p < 0.001 ; significantly different from the control

Unit ; ¹⁾ μmol/g of tissue

^{2,3)} NADPH oxidized nmoles/mg protein/min

⁴⁾ 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate nmoles/mg protein/min

GSH ; glutathione, GPx ; glutathione peroxidase, GSSG ; glutathione reductase, GST ; glutathione-s-transferase

10mM 3-amino-1,2,4-triazole, 0.1M tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% triton X-100으로 조제된 기질에 담그고, 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 수세한 다음 1% osmium tetroxide로 고정하고 미세구조 관찰법과 같이 탈수, 포매, 초박절편하여 uranyl acetate로만 염색하고 투과전자현미경으로 관찰하였다.

통계처리

모든 성적은 평균 ± 표준오차로 표시하였고 각 성적의 유의성은 Student-Newman-Keuls multiple comparison test로 검정하여 p < 0.05를 유의 하다고 인정하였다.

결 과

폐장 내 glutathione을 고갈시키기 위하여 DEM을 체중 100g 당 0.1ml 투여한 결과, 대조군에 비해 현저한(P < 0.001) 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 형태학적으로 제2형 폐포세포의 변형과도 일치하는 것이었다. 즉 폐장 내 glutathione의 고갈 후 oxidative stress가 나타나면 제 2형 폐포세포 내의 lamel-

lar body의 팽대 및 공포화 현상이 나타나는데, 본 실험의 형태학적인 결과에서도 유사한 변화가 관찰되었다. 그러나 glutathione의 대사에 관여하는 GPx, GSSG-Rd 및 GST의 활동도는 변화가 없었다(표 1).

단백누출지수 및 BALF 내의 단백질량의 결과는 표 2와 같다. 대조군에 비하여 내독소를 투여한 군에서는 단백질누출지수 및 단백질량이 모두 유의한 증가(p < 0.001)를 보이고, 특히 glutathione이 고갈된 폐장 내 단백질누출지수는 내독소만을 투여한 군에 비하여 유의하게(p < 0.05) 증가하였고, 이러한 변화들은 mepacrine에 의하여 억제(p < 0.001)되었다.

폐장 내 호중구의 침윤을 알아보기 위해 시행한 폐장 내 MPO의 활성도 및 BALF 내 호중구의 수는 표 3과 같다. 내독소 투여 후 MPO 활성도와 호중구의 수는 모두 대조군에 비해 현저히 증가(p < 0.001)하였고, 내독소 투여 후 DEM을 투여한 군과 비교하여 볼 때 MPO의 활성도는 감소하였다(p < 0.001). 내독소 투여 후 mepacrine을 투여한 군이나 내독소 투여 후 DEM을 투여한 뒤 mepacrine을 투여한 군 모두에서 MPO의 활성도는 유의한(p < 0.001) 감소를 보였고, BALF 내 호중구의 수 또한 각각 현저한(p < 0.001, p < 0.05) 감소를 보였다. 폐장 내 oxida-

Table 2. Lung leak index and protein contents in BALF

	Control	ETX	ETX+Mepa	ETX+DEM	ETX+DEM+Mepa
Lung leak index	0.070±0.004 (n=8)	0.230±0.013*** ^{c)} (n=8)	0.136±0.013*** ^{e)} (n=8)	0.388±0.063** ^{e)} (n=6)	0.124±0.018*** ^{d)} (n=8)
Protein contents (mg/two lungs)	2.219±0.162 (n=9)	4.885±0.353*** ^{c)} (n=6)	3.234±0.198*** ^{e)} (n=9)	6.447±0.757 (n=6)	3.366±0.163*** ^{d)} (n=7)

Data represent mean±SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses.

***^{c)}p<0.001 ; significantly different from control, **^{e)}p<0.05, ***^{e)}p<0.001 ; significantly different from

ETX, ***^{d)}p<0.01, ***^{d)}p<0.001 ; significantly different from ETX+DEM

ETX ; endotoxin, Mepa ; mepacrine, DEM ; diethylmaleate

Table 3. Comparison of the infiltration of neutrophils in the lung

	Control	ETX	ETX+Mepa	ETX+DEM	ETX+DEM+Mepa
Lung MPO (U/g of lung)	4.983±0.620 (n=9)	40.970±2.619*** ^{c)} (n=9)	17.513±1.109*** ^{e)} (n=8)	30.914±0.861*** ^{e)} (n=7)	12.638±0.526*** ^{d)} (n=6)
Number of PMNs in BAL (millions/two lungs)	0.113±0.024 (n=7)	3.346±0.327*** ^{c)} (n=11)	0.997±0.144*** ^{e)} (n=7)	2.776±0.585 (n=7)	1.089±0.135* ^{d)} (n=7)

Data represent mean±SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses.

***^{c)}p<0.001 ; significantly different from control, ***^{e)}p<0.001 ; significantly different from ETX, *^{d)}p<

0.05, ***^{d)}p<0.001 ; significantly different from ETX+DEM

ETX ; endotoxin, Mepa ; mepacrine, DEM ; diethylmaleate

tive stress의 정도를 알아보기 위해 측정한 MDA 함량 및 GGT의 활성도는 표 4와 같다. MDA의 함량은 내독소 투여군에서는 301.757±30.591로서 대조군에 비해 현저한(p<0.001) 증가를 보이고, 내독소 투여 후 DEM을 투여한 군에서는 443.950±40.066으로서 내독소 투여군에 비해 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며, 내독소 투여 후 mepacrine을 투여한 군에서는 135.000±8.791로서 내독소군에 비해 유의한(p<0.001) 감소, 내독소 및 DEM을 투여한 군에 mepacrine을 투여했을 때에도 내독소 및 DEM을 투여한 군에 비해 현저한(p<0.001) 감소를 보였다. GGT의 활성도의 변화 또한 MDA 함량의 변화와 동일한 변화를 보였다. 즉 내독소 투여 후 GGT의 활성도는 유의한 증가(p<0.01)를 보이고, 내독소 투여 후 DEM을 투여하였을 때는 내독소 투여군에

비해 현저한(p<0.01) 증가를 보였고, 이 두군에 mepacrine을 투여한 결과 두 군 모두에서 현저한 감소(p<0.05)를 보였다.

폐장 내 PLA₂의 활성도의 변화(표 5)는 내독소 투여 후 현저히 증가(p<0.001)하였고, mepacrine은 이를 효과적으로 억제(p<0.001)하였다. 내독소 및 DEM을 투여한 군에서도 PLA₂의 활성도는 내독소 투여군과 유사하였고, 내독소 투여 후 mepacrine을 투여한 군과 내독소 및 DEM 투여 후 mepacrine을 투여한 군 모두에서 그 활성도는 현저히(p<0.001) 감소하였다. BALF 내 pulmonary surfactant의 함량은 표 6과 같다. 내독소 투여 후 pulmonary surfactant의 함량은 heavy subtype의 경우 대조군 31.149±1.891에 비해 내독소를 투여한 군에서는 18.171±1.958로 현저한 감소(p<0.001)를 보

Table 4. Confirmation of oxidative stress by the measurement of lipid peroxidation and GGT activity in the lung

	Control	ETX	ETX+Mepa	ETX+DEM	ETX+DEM+Mepa
MDA contents (nmol/g of wet lung)	108.800 ± 14.521 (n=7)	301.757 ± 30.591*** ^c (n=7)	135.000 ± 8.791*** ^e (n=6)	443.950 ± 40.066* ^e (n=8)	234.600 ± 26.086*** ^d (n=7)
GGT activity in the lung (U/g of wet lung)	34.0±9.51 (n=9)	59.5±10.07*** ^c (n=9)	43.3±6.67* ^e (n=8)	114.46±8.548*** ^e (n=7)	96.429±7.569* ^d (n=7)

Data represent mean±SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses.

***^cp<0.01, ***^dp<0.001 ; significantly different from control, *^ep<0.05, ***^ep<0.001 ; significantly different from ETX, *^dp<0.05, ***^dp<0.001 ; significantly different from ETX+DEM. MDA ; malondialdehyde, GGT ; γ-glutamyltranspeptidase, ETX ; endotoxin, Mepa ; mepacrine, DEM ; diethylmaleate

Table 5. Comparison of lung PLA₂ activity after treatments of with endotoxin, mepacrine and diethylmaleate

	Control	ETX	ETX+Mepa	ETX+DEM	ETX+DEM+Mepa
Lung PLA ₂ (mU/g of wet lung)	31.32±4.774 (n=6)	125.617±4.645*** ^c (n=7)	73.028±8.463*** ^e (n=6)	112.457±13.722 (n=7)	41.100±5.400*** ^d (n=7)

Data represent mean±SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses.

***^cp<0.001 ; significantly different from control, ***^ep<0.001 ; significantly different from ETX, ***^dp<0.001 ; significantly different from ETX+DEM. ETX ; endotoxin, Mepa ; mepacrine, DEM ; diethylmaleate

Table 6. Changes in contents of pulmonary surfactant in BALF after treatments of with endotoxin and mepacrine

	Control	ETX	ETX+Mepa
Heavy subtype (mmol/g of lung)	31.149±1.891 (n=7)	18.171±1.958*** ^c (n=7)	32.584±1.077*** ^e (n=7)
Light subtype (mmol/g of lung)	0.428±0.069 (n=6)	3.300±0.382*** ^c (n=7)	0.767±0.142*** ^e (n=7)

Data represent mean±SE. The numbers of determinations are shown in the parentheses. ***^cp<0.001 ; significantly different from control, ***^ep<0.001 ; significantly different from ETX. ETX ; endotoxin, Mepa ; mepacrine

이고 내독소 투여 후 mepacrine을 투여한 군에서는 내독소군에 비하여 유의한 증가(p<0.001)를 보였다. 이에 비하여 light subtype surfactant는 대조군

의 0.428±0.069에 비하여 내독소 투여 후에는 3.330±0.382로 증가(p<0.001)하였고, 내독소 투여 후 mepacrine을 투여한 군에서는 감소하였다



Fig. 1. Electron microscopic findings of lung tissue, uranyl acetate and lead citrate: *Panel 1*) ETX group shows edematous endothelial cells and interstitium. Neutrophils (Np) infiltrated into the interstitium. Notably, some endothelial membranes fused to neutrophil (arrow). Alveolar type II cell shows degeneration of lamellar bodies (*). *Panel 2*) ETX+DEM group shows degeneration

of basal lamina with severe edema of endothelial cells and interstitium. A portion of endothelial cell membrane contacting neutrophil (Np) is fused into the neutrophilic membrane (arrow). *Panel 3*) ETX+DEM+Mepacrine group. Despite Although neutrophils (Np) are found in the vascular lumen, they are not adherent to endothelial cells. Edematous interstitium and injured alveolar type II cells were less notable compared with those in the ETX and ETX+DEM group.

($p < 0.001$).

전자현미경을 통해 살펴본 미세구조학적인 변화는 다음과 같다. 내독소를 투여한 군 (그림, panel 1)에서는 호중구의 침윤과 제 2형 폐포세포의 병적인 변화, 그리고 혈관내피세포와 간질의 부종현상이 현저하였고, 내독소 투여 후 DEM을 투여한 군 (그림, panel 2)에서도 비슷한 양상과 함께 기저판의 심한 변성이 나타났다. 그러나 mepacrine을 투여한 후 (그림, panel 3)에는 호중구의 혈관 내 침윤이 관찰되지만 혈관내피세포에 변화를 주지 못한 형태로 나타났다으며, 제 2형 폐포세포도 내독소 투여군과 내독소 투여 후 DEM을 투여한 군에서 나타난 심한 변성은 보이지 않았다.

조직 내 산소기의 형성을 살펴본 세포화학적 결과는 내독소 투여 후 (그림, panel 4)에는 일부 간질과 기저판을 따라 cerium perhydroxide의 형성이 증가되었고, 특히 DEM을 투여한 군 (그림, panel 5)에서는 cerium perhydroxide의 형성이 간질 뿐만 아니라 호흡상피면을 따라 매우 증가되어 나타났다. 하지만 mepacrine의 투여 (그림, panel 6)로 이러한 변화 즉, cerium perhydroxide의 형성은 현저히 억제되었다.

DEM 및 mepacrine의 단독 효과를 알아보기 위한 실험에서 DEM은 폐장 내 glutathione의 함량을 감소시킨 것 외에는 특별한 효과를 나타내지 못하였고, mepacrine 투여 또한 무처리 대조군과 비교하였을 때 차이를 보이지 않아 성적에서 제외하였다.

고 찰

ARDS의 병인론 중 호중구에 의한 oxidative stress에 대한 논의는 주로 oxidant-antioxidant system의 평형 (balance)에 대한 개념으로, 이러한 평형의 깨어짐이 oxidative stress를 유발하여 조직의 손상을 일으킨다고 한다²⁶. 이 중 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전은 폐혈중에 의한 ARDS의 병인론을 이해하는데 중요한 단서를 제공한다고 생각되어 다양한 연구 결과가 제시되었다²⁷⁻²⁹.

내독소는 주로 염증세포에 작용하여 cytokine을 유리하고, 이에 따라 PLA_2 가 활성화됨으로서 염증성 지질분자가 증가한다. 그 결과 호중구의 화학주성에 따른 조직 내 침윤 및 평활근의 수축에 의한 혈액역동학의 변화 등이 ARDS의 발병에 관여한다고 한다³⁰. 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전은, 최근 Delclaux 등²에 의하면 호중구에서의 단백분해효소의 유리가 중요하다고 하며 이에 산소기의 작용이 관여한다고 한다. 급성 폐손상시 혈관내피세포의 손상에 관여하는 호중구의 역할은 adhesion molecule의 활성화, 산소기 형성, 단백분해효소의 유리 등에 의해 조직의 손상을 유발한다³¹고 알려져 있다. Dana 등^{32,33}은 호중구막의 NADPH oxidase는 PLA_2 의 활성화에 의해 arachidonic acid가 생성됨으로써 활성화되어 산소기를 생성한다고 하였다. Lee 등⁹도 gut I/R에 의한 ARDS model에서 PLA_2 의 활성화가 호중구에서의 산소기 형성에 필요하며 PLA_2 의 대사물인 PAF가 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다.

본 연구에서도 내독소에 의해 폐부종이 유도되고 비특이적 PLA_2 억제제인 mepacrine에 의해 폐부종이 감소한 점, 내독소에 의해 폐장 내 PLA_2 의 활동도가 증가한 점 등은 내독소에 의한 염증반응이 유발된 것을 의미한다. 특히 glutathione이 고갈된 흰쥐에서는 단백누출이 내독소만 투여한 군보다 더 심하게 나타났다. 본 연구에서 주목할 점은 glutathione의 대사에 관여하는 효소의 변화가 없이 DEM에 의해 glutathione이 감소하여 glutathione의 감소에 따른 oxida-

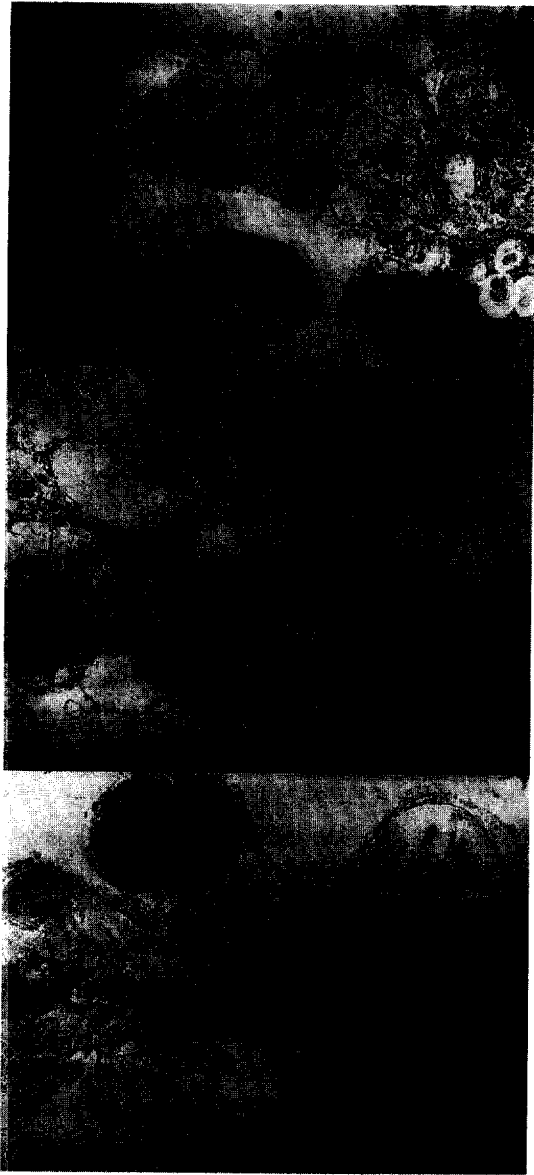


Fig. 2. Cytochemical electron microscopic findings of lung tissue, *uranyl acetate*: Panel 4) ETX group, Panel 5) ETX+DEM group, and Panel 6) ETX+DEM+Mepacrine group. Cerrous perhydroxide deposits (arrowhead) are found in all groups. In the ETX+DEM+Mepacrine group, deposits of cerrous perhydroxide are markedly less than those in the other groups.

tive stress의 효과가 확인하였다는 점이다. 또한 내독소 투여 후에는 폐장 내 호중구의 침윤이 현저하였으며, 이러한 호중구의 침윤 또한 PLA₂의 억제에 의하여 감소하였다. 조직 내 호중구의 침윤이 항상 조직의 손상을 유발하는 respiratory burst를 유발하는 것은 아니다. Koh 등³⁴은 CINC (cytokine induced neutrophil chemoattractant)를 이용한 ARDS model에서 단순한 호중구의 침윤만으로는 폐장의 손상이 유발되지 않는다고 하고, 이때 IL-1과 같은 proinflammatory cytokine을 투여하면 BALF 내 CINC 농도의 증가와 함께 폐장의 손상이 관찰됨을 보고하고 있다. 흥미로운 것은 IL-1에 의한 급성 폐손상시 폐장 조직 내 PLA₂의 활성도가 증가하며 PLA₂의 억제는 IL-1에 의한 급성 폐손상을 억제한다⁸. 즉 호중구의 침윤과 동시에 호중구의 respiratory burst를 유발하는 조건이 필요한 것이다. 본 연구에서 내독소에 의해 호중구의 침윤이 증가한 점, 단백누출의 증가 즉 폐부종이 유발된 점, 동시에 PLA₂의 활성도가 증가하고 mepacrine이 이러한 변화를 억제하여 조직의 손상을 감소시키는 것으로 보아서도 PLA₂의 역할이 호중구의 산소기 생성에 따른 폐손상에 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

이에 더하여 내독소에 의한 호중구로부터의 산소기 형성 및 oxidative stress의 증거로는 내독소 투여 후 폐장 조직 내 MDA의 증가, 특히 glutathione이 감소한 경우에는 MDA가 더욱 증가한 점, 또한 세포에 oxidative stress가 가해진 경우 증가하는 GGT의 활성도³⁵가 내독소에 의해 증가하고 glutathione의 고갈에 의해 더욱 증가한 점을 들 수 있다. 내독소가 조직에서 호중구를 포함한 염증세포에서 산소기를 형성한다는 것은 잘 알려져 있으나 그 경로는 아직 확실치가 않다. 내독소는 대식세포를 자극, TNF나 IL-1과 같은 cytokine을 형성하고³⁶, 이러한 cytokine이 일정한 신호전달체계를 거쳐서 PLA₂의 활성화에 따라 생성되는 lysophosphatidylcholine (PC), arachidonic acid, PAF와 같은 지질분자들이 호중구의 화학주성을 유발하고, 혈관내피세포의 adhesion molecule을

활성화하면서 조직으로의 호중구 침윤을 유도한다³⁷⁻³⁹. 또한 Lee 등^{40,41}은 내독소나 IL-1 또는 gut I/R에 의한 ARDS model에서 PLA₂의 활성화에 따른 PAF의 증가는 lysoPAF의 remodelling, 즉 lysoPAF의 acetyltransferase의 활성도의 증가에 따른 것이라고 하였다. 본 연구에서도 mepacrine에 의한 PLA₂의 억제가 lipid peroxidation을 감소시키고 GGT의 활동도를 감소시킨 것으로 보아 내독소에 의해서도 PLA₂의 활성도에 따른 oxidative stress가 생긴 것으로 보인다. 내독소에 의한 PLA₂의 활성화에 따른 폐장 내 oxidative stress의 또 다른 증거로는 폐장 내 제 2형 폐포세포의 변형 및 pulmonary surfactant 대사의 변화이다. Martensson 등⁴²은 glutathione이 고갈된 흰쥐에게 고농도의 산소를 흡입시키면 제 2형 폐포세포의 lamellar body의 비후 및 공포현상이 일어남을 관찰하고 동시에 surfactant 분비이상에 따른 surfactant의 고갈을 보고하고 있다. 본 연구에서는 내독소 투여 후 surfactant의 분비가 감소하고 형태학적으로는 제 2형 폐포세포의 변형, 즉 lamellar body의 공포화 현상이 나타난 것으로 미루어 oxidative stress가 그 원인인 것으로 추정된다. ARDS시에 나타나는 surfactant 분비양상의 변화는 대개 초기에는 그 분비가 증가하다가 시간이 경과할수록 감소한다⁴³. 본 연구에서는 급성 폐손상시 BALF 내의 surfactant 함량의 변화는 제 2형 폐포세포의 분비과정을 명확히 설명할 수는 없으나 적어도 제 2형 폐포세포의 기능이 산소기의 영향을 받은 것으로 생각된다. Lewis 등⁴⁴은 oxidative stress시에는 surfactant의 subtype 중 light density surfactant의 함량이 증가 한다고 하였는데 이는 본실험의 결과와 일치 하는 것이다.

미세구조 및 세포화학적 실험 결과에서도 이러한 주장을 뒷받침하고 있다. 내독소 및 glutathione이 고갈된 폐장의 미세구조적인 변화는 전형적인 ARDS의 소견을 보이고 있으며 이러한 변화는 mepacrine에 의해 완화되었는데, 본 실험결과는 Hybertson 등⁴⁵의 실험결과와 일치하는 것이다. 또한 조직 내 과산화

수소와 cerium chloride의 대사산물인 cerrous perhydroxide도 내독소에 의해 생성이 증가되고 glutathione이 고갈된 후에는 그 양상이 현저하였다. 흥미롭게도 PLA₂의 억제제는 이러한 cerrous perhydroxide의 형성을 억제하였다. 이러한 모든 결과들은 내독소에 의한 급성 폐손상의 발병기전에는 호중구에 의한 산소기의 형성이 중요한 인자이며 이때 산소기의 형성에는 PLA₂가 관여한다는 것을 의미한다. Mepacrine은 비특이성 PLA₂ 억제제이므로 본 연구에서는 어떤 종류의 PLA₂가 산소기의 형성에 관여하는지는 알 수 없으나, 내독소 투여 후 폐장 조직 내의 PLA₂의 발현을 역전사효소-연쇄증합반응을 이용하여 검정한 결과 제 2형 분비형 PLA₂의 발현이 확인되었다⁴⁶.

결론적으로 본 연구의 결과로 미루어 내독소에 의한 급성 폐손상은 호중구의 산소기 형성에 따른 oxidative stress가 그 중요한 원인이며, 급성 폐손상이 glutathione이 고갈된 경우 더욱 현저한 점으로 미루어 이러한 사실이 확인되었다. 또한 oxidative stress의 원인인 호중구의 respiratory burst는 PLA₂의 활성화가 필수적이라는 사실도 확인하였다.

요 약

연구배경 :

패혈증에 의해 발병하는 ARDS의 기전은 아직까지 명확히 알려져 있지 않다. 특히 패혈증시 폐 혈관내피 세포 및 제 1, 2형 폐포세포의 손상이 호중구의 respiratory burst에 따른 oxidative stress에 의한 것인지는 아직도 논란의 대상이다. 또한 이때 oxidative stress의 직접적인 원인인 산소기 생성기전도 명확하지가 않다. 본 연구에서는 패혈증에 의한 ARDS 발병기전을 PLA₂의 작용과 호중구의 산소기 생성을 연관시켜 알아보려고 하였다.

방 법 :

Sprague-Dawley종 흰쥐에서 diethylmaleate (DEM)를 이용하여 glutathione을 고갈시킨 뒤 내독소를 기도 내로 분무하여 급성 폐손상을 유발하였다. 이때

oxidative stress를 평가할 수 있는 방법들, 즉 단백 누출지수, 폐세척액 내 단백질량, 폐장 내 myelo-peroxidase (MPO)의 활동도, malondialdehyde (MDA)의 측정 및 GGT의 활성도를 측정하고 동시에 oxidative stress에 관여하는 PLA₂의 역할을 확인하기 위하여 비특이적 PLA₂ 억제제인 mepacrine (50mg/kg)을 복강 내 투여한 후 폐장 내 PLA₂의 활성도를 측정하였다. 또한 미세구조적 변화 및 세포화학적 방법을 통해 조직 내 산소기의 생성을 확인, 비교하여 산소기 형성에 관여하는 PLA₂의 역할을 규명하였다.

결 과 :

Diethylmaleate에 의해 폐장 내 glutathione을 고갈시킨 뒤 내독소를 투여한 흰쥐에서, 내독소는 폐장 내 현저한 조직의 손상을 유발하였고, 동시에 oxidative stress의 증가를 관찰하였다. 즉 lipid peroxidation의 증가 및 GGT 활성도의 증가를 관찰하였다. 이러한 변화들은 폐장 내 호중구 침윤의 증가 및 PLA₂ 활성도와 관계가 있음을 확인하였고, 미세구조적 및 세포화학적 방법으로 조직 내의 산소기 형성의 증가도 관찰하였다. 이러한 변화들이 비특이적 PLA₂ 억제제인 mepacrine의 작용에 의해 감소하는 것으로 미루어 보아 PLA₂가 내독소에 의한 oxidative stress에 관여한다고 생각되었다.

결 론 :

내독소에 의해 유발되는 급성 폐손상에서 조직손상의 원인은 호중구의 respiratory burst에 따른 oxidative stress임을 확인하였고 이때 oxidative stress에 PLA₂의 활성화에 따라 생성되는 지질분자가 그 원인으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Connelly KG, Repine JE. Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. Ann Rev Med 1997;48: 429-45.
2. 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-L112.
3. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂-a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12:143-6.
4. Tithof PK, Peters-Golden M, Gagny PE. Distinct phospholipase A₂ regulates the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide production in neutrophils. *J Immunol* 1998;160:953-960.
5. Swain SD, Bunger PL, Sipes KM, Jutila KL, Boylan SM, Quinn MT. Platelet activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional response in bovine neutrophils. *J Leukoc Biol* 1998;64:817-27.
6. Terada LS, Hybertson BM, Connelly KG, Weill D, Piermattei D, Repine JE. XO increases neutrophil adherence to endothelial cells by a dual ICAM-1 and P-selectin-mediated mechanism. *J Appl Physiol* 1997;82:866-73.
7. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* 1999; 79:967-74.
8. 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.
9. Lee YM, Park Y, Kim T, Cho HG, Lee YJ, Repine JE. Effect of the inhibition of phospholipase A₂ in generation of free radicals in intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury. *Kor J Physiol Pharmacol* 1999;3:263-73.
10. Furue S, Kuwabara K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, et al. Crucial role of group II A phospholipase A₂ in oleic acid induced acute lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1292-302.
11. Seeds MC, Jones DF, Chilton FH, Bass DA. Secretory and cytosolic phospholipases are activated during TNF priming of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1998;1389: 273-84.
12. Liu L. Regulation of lung surfactant secretion by phospholipase A₂. *J Cell Biochem* 1999;72:103-10.
13. Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL. Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 1985;58:571-4.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
15. Paglia GE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathion peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
16. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Bio Chem* 1975; 250(14):5475-80.
17. Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: The first enzymatic acid step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-9.
18. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 1989;102:1152-60.
19. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 1985;59:

- 1978-85.
20. Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, Huang YT. Differential expression of arginine and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 1998;24:253-68.
21. Meister A, Tate SS, Griffith W. Gamma glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol* 1981;77:273-83.
22. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. Rapid assay for activity of phospholipase A₂ using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1986;154:676-81.
23. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.
24. Hess HH, Derr JE. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomolar range. *Anal Biochem* 1975;63:607-13.
25. Corbet A, Creegan J, Frink J, Rudolph AJ. Distension produced phospholipid secretion in post mortem in situ lungs of normal rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:695-701.
26. Repine JE. Interleukin-1 mediates acute lung injury and tolerance to oxidative injury. *Environ Health Perspec* 1994;102(suppl):75-8.
27. Tang G, White GE, Lumb PD. Role of endogenous cytokines in endotoxin and interleukin-1 induced pulmonary inflammatory response and oxygen tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:339-44.
28. Arbibe L, Vial D, Rosinski-Chupin I, Havet N, Huerre M, Vergafig BB, et al. Endotoxin induces expression of type II phospholipase A₂ in macrophage during acute lung injury in guinea pigs. *J Immunol* 1997;159:391-400.
29. Bautista A, Spitzer JJ. Acute endotoxin tolerance downregulates superoxide anion release by the perfused liver and isolated hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1995;21:855-62.
30. Rinaldo JE, Christman JW. Mechanism and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990;11:621-32.
31. Jaeschke H, Wayne SC. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Leukoc Biol* 1997;61:647-53.
32. Dana R, Leto TL, Levy R. Essential requirement of cytosolic phospholipase A₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998;273:441-5.
33. 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.
34. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced acute lung leak in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:472-8.
35. Liu RM, Hu H, Robinson TW, Forman HJ. Increased gamma glutamylcysteine synthetase and gamma glutamyl transpeptidase activities enhance resistance of rat lung epithelial L2 cells to quinone toxicity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;14:192-7.
36. Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E. Extracellular phospholipase A₂ secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumor necrosis factor action. *Immunol Letter* 1991;28:187-93.
37. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R, Lianxi L, Granger DN. Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: Role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997;272:H2976-H2982.
38. Hotter G, Closa D, Prats N, Felip P, Gelpi E,

- Rosello-Catafau J. Free radical enhancement promotes leukocyte recruitment through a PAF and LTB₄ dependent mechanism. *Free Radical Biol Med* 1997;22:947-54.
39. Bienvenu K, Granger DN. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Cells* 1993;19:279-89.
40. Lee YM, Park Y. PAF contributes to intestinal ischemia/reperfusion- induced acute lung injury through neutrophilic oxidative stress. *Kor J Physiol Pharmacol* 1999;3:405-14.
41. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho OJ, Repine AJ et al. Platelet activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 α intratracheally. *Am J Physiol* 2000;in press.
42. Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PAM, Meister A. Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat : A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9360-4.
43. Nakos G, Kitsiouli EI, Tsangris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phase of ARDS. Alterations in leukocytes, protein, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 1998;24:296-303.
44. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Metabolism of exogenously administered surfactant in the acutely injured lungs of adult rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:19-23.
45. Hybertson BM, Lee YM, Cho HG, Cho OJ, Repine JE. Alveolar type II cell abnormalities and peroxide formation in lungs of rats given IL-1 intratracheally. *Inflammation* 2000;24:289-303.
46. Lee YM. PAF mediates acute lung injury via remodelling of lysoPAF in the lungs of rats given endotoxin intratracheally (unpublished data).
-