

천연물로부터 염증성 포스포리파제 A₂ 저해제 검색

문태철 · 정광원 · 정규찬 · 손건호* · 김현표* · 강삼식** · 장현욱#

영남대학교 약학대학, *안동대학 식품영양학과, *강원대학 약학대학, **서울대학교 천연물과학연구소

(Received September 24, 1997)

Screening of Inflammatory Phospholipase A₂ Inhibitors from Natural Products

Tae Chul Moon, Kwang Won Chung, Kyu Charn Chung, Kun Ho Son*,
Hyun Pyo Kim*, Sam Sik Kang** and Hyeun Wook Chang#

College of Pharmacy, Yeungnam University, Korea,

*Depart. Food & Nutrition, Andong National University, Korea,

**College of Pharmacy, Kangwan National University, Korea,

#Natural Products Res. Institute. Seoul National University, Korea.

Abstract—High levels of extracellular phospholipase A₂ (PLase A₂) associated with inflammatory process in man and animal models have been extensively reported elsewhere. Thus, a logical approach to the treatment of inflammatory diseases should involve the inhibitors of PLase A₂. To develop new PLase A₂ inhibitors from natural products, two hundred crude drugs were screened using group II PLA₂ inhibitory activity. Among them, methanol extract of 5 medicinal plants such as *Raphani Semen*, *Moutan cortex radices*, *Arecae semen*, *Caryophylli Cortex* and *Betulae Cortex* inhibited more than 90% of PLase A₂ activity at a concentration 2.5 µg/ml. Then, 10 methanol extracts sample were transferred into organic solvents, PLase A₂ inhibitory effects were found mainly in CHCl₃ and EtoAc fractions.

Keywords □ Inflammation, Group II Phospholipase A₂ inhibitor, Natural products.

Phospholipase A₂(PLase A₂)는 세균에서부터 고등동물에 이르기까지 광범위하게, 세포막, 과립, 분비액 중에 존재하는 효소로서, glyceropholipid의 2번 위치에 ester결합을 가수분해하여 유리지방산과 lysophospholipid를 생성한다. 과거에는 인지질의 신생과 대사에 관련해서 연구되어 왔으나, 최근에는 여러 생리현상과 병리현상에 직접적으로 관여함이 알려졌다. 다양한 생리현상과 질병에 관여하는 eicosanoid의 전구체인 arachidonic acid는 막 인지질의 2번 위치에 결합하고 있으므로 PLase A₂에 의한 arachidonic acid 유리단계 반응은 생리활성 mediator 생성과정의 율속 효

소임이 예상되고 있다. 또한 최근 극히 미량으로 혈소판을 활성화시키며, 다양한 생리활성 및 질병(기관지 천식, 염증, allergy, endotoxin shock 등)에도 직, 간접적으로 관여함이 알려진 PAF(Platelet Activating Factor)의 생합성 과정에도 PLase A₂가 관여함이 밝혀져¹⁻³⁾ arachidonic acid cascade와 PAF cycle의 관련된 가설이 제기되었다.⁴⁾ PLase A₂의 생화학적 연구는 다량의 정제표품을 쉽게 얻을 수 있는 체장이나 사독의 효소를 이용한 해석이 주된 것이다. 최근에는 실험동물을 이용한 염증 model 즉 gram 음성균에 의한 패혈증⁵⁾, casein 유도 복막염⁶⁾, 지연성 과민증, allergic uveitis⁵⁾ 등과 사람의 질할 즉, 류마치스 관절염 환자의 관절액⁷⁾, 결핵 환자의 흉막액⁸⁾, 건선 피부염 환자의 상피조직⁹⁾과 gram 음성균에 의한 septic shock 환자의

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2811 (팩스) 053-811-3871

혈장⁵⁾ 등에서 높은 세포외성 PLase A₂의 활성과 arachidonic acid 대사산물의 축적이 보고되어 염증반응에 있어서 PLase A₂가 깊이 관여함이 밝혀졌다.

최근 endotoxin shock rat의 조직에서 group II형 PLase A₂의 mRNA level이 증가되며¹⁰⁾, 토끼의 chondriocyte, Rat 신장의 mesangial cell을 TNF나 IL-1등 염증성 cytokine 존재하에 배양했을 때 배양액 중에 세포외성 PLase A₂가 방출됨이 보고되어¹¹⁾, 염증반응에 있어서 PLase A₂의 역할은 더욱 중요시 되고 있다. 따라서 세계의 많은 연구자들이 PLase A₂의 저해물질을 찾아서 새로운 항염증제 개발에 힘을 기울이고 있다. PLase A₂ 저해제의 개발에는 단백질, 천연물, 유기합성, 미생물, 해양생물 등에서 저해제의 개발이 진행되고 있다.¹²⁻¹⁷⁾ 그러나 지금까지 PLase A₂ 저해제의 검색에 사용된 PLase A₂는 예외없이 췌장이나 사독의 group I형 PLase A₂를 효소원하여 행해졌기 때문에, 효소원으로서 적절하지 않다는 문제점이 제기되었다.

한편, 비만세포(mast cell)에서 탈과립반응에도 PLase A₂의 관여가 시사되어 즉시형 allergy 반응에 있어서 PLase A₂의 역할에 대해 최근 관심이 모아지고 있다.¹⁸⁾ 비만세포는 세포막 표면상에 고친화성 Ig E 수용체를 가져서, 항원자극에 응해서 염증성 mediator인 histamine, serotonin 등의 과립내 저장된 내용물을 방출하는 동시에 prostagrandin D₂(PGD₂), leucotriene C₄ (LTC₄), PAF 등의 지질성 mediator를 생산하여 방출한다. 지질성 mediator 생성은 세포막 인지질에서 arachidonic acid 유리에서 시작되며, 자극과 coupling하여 PLase A₂가 활성화되는 현상으로 해석되고 있다. IgE를 개재한 비만세포의 활성화에는 생체막의 미량성분인 lysophosphatidylserine(lyso PS)이 필수적임은 이미 알려져 있기 때문에¹⁹⁾ PS specific 한 PLase A₂의 관여가 예상되고 있다. 최근 즉시형 allergy 반응에 관여하는 PLase A₂ 저해제를 이용한 allergy 치료제 개발이 진행되고 있어 금후 그 결과가 기대되고 있다.

이상에서 기술한 것과 같이 PLase A₂는 각종 염증성 질환에 직, 간접으로 깊이 관여하고 있기 때문에 본 연구진은 지금까지 천연물에서 성분의 분리 및 구조결정에 관한 다년간의 경험을 바탕으로 PLase A₂의 저해제를 찾아서 새로운 차원의 항염증제를 개발하는데 필요한 기초적인 자료를 제공하려고 한다.

실험방법

실험재료 및 시약

실험재료 - 본 연구에 사용한 생약은 한약 도매시장에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

시약 - Tris(hydroxymethyl)aminomethane, CaCl₂ 등은 Sigma사로부터, 1,4-bis(2-(phenyloxazolyl))-benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole(DPO)는 Dojin사로부터 구입하여 사용하였으며, 이외의 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

시료의 조제

건조한 시료 100 g을 methanol로 3시간 3회 열추출하고, 이 추출액을 합한후 농축 건조하여 이를 methanol 추출물로 사용하였다. 각 methanol 추출물을 물로 현탁시킨후 *n*-hexane, CHCl₃, ethylacetate 및 *n*-butanol로 단계적으로 분획하고 마지막 분획을 물분획으로 하여 저해활성 검색에 사용하였다.

기질의 조제

1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine는 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine로부터 Plase D에 의한 base exchange방법²⁰⁾에 의해 제조하였으며, [1-¹⁴C]linoleic acid 및 1-acyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl phosphatidylethanolamine는 Amersham사에서 구입하여 사용하였다.

Phospholipase A₂ 활성의 측정

PLase A₂ 활성 측정은 Ethanol/Toluene(1/1, V/V) 중에 녹아있는 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(1,000 cpm/nmol)을 시험관에 분취한 후, 질소가스로 용매를 휘발시키고 lipid film을 만든 뒤, 일정량의 증류수를 가하여 ultrasonic cleaner(Branson 2200, USA)로 초음파 처리하여 기질로 사용하였다. PLase A₂활성은 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 기질 20 nmol 및 효소(10 ng) 및 천연물 추출액 25 µg/ml를 함유한 반응액을 37°C로, 지정된 시간 동안 반응한 후, 생성된 [¹⁴C]유리지방산을 Dole등의 방법²¹⁾에 따라 추출하여 liquid scintillation counter Minaxi Tri-Carb, Packard, USA)로 측정하여 PLase A₂ 활성으로 환산하였다. 이때, PLase A₂ 활

Table I—Inhibitory activity of methanol extract of crude drugs against group II phospholipase A₂

Korean Name	Pharmaceutical Name	PLase A ₂ Inhibition %
가자	Treminaliae Fructus	21
각갈근	Puerariae Radix	24
갈화	Puerariae Flos	20
감국	Chrysanthemi Flos	22
감수	Euphorbiae Kansui Radix	84
감인	Euryales Semen	88
감초	Glycyrrhizae Radix	58
강활	Angelicae Koreanae Radix	70
강황	Curcumae Longae Radix	62
건강	Zingiberis Rhizoma	59
겨우살이	Visci Herba	23
결명자	Cassiae Semen	51
계내금	Galli Stomachichum Corium	59
고련피	Meliae Cortex	38
고본	Angelicae Tenuissimae Radix	14
골담초근	Caraganae Radix	47
골쇄보	Drynariae Rhizoma	52
과초	Melonis Calyx	43
관중	Crassirhizomae Rhizoma	6
팔류인	Trichosanthis Semen	79
괴곽	Sophorae Fructus	0
구기자	Lycii Fructus	27
구맥	Dianthi Herba	40
구인	Limbricus	54
구판	Testudinis Plastrum	61
굴해	Citri Unshiu Semen	4
금앵자	Rosae Laeuigatae Fructus	12
금은화	Lonicerae Flos	80
길경	Platycodi Radix	0
내복자	Raphani Semen	41
노회	Aloe	90
누로	Echinopsis Radix	41
단삼	Saviae Radix	43
당귀	Angelicae Gigantis Radix	0
대복피	Arecae Pericarpium	39
대풍자	Hydnocarpus Semen	5
대황	Rhei Rhizoma	88
동과자	Benincasae Semen	7
동규자	Malvae Semen	38
두충	Eucommiae Cortex	81
마두령	Aristolochiae Fructus	29
마황근	Ephedrae Radix	80
만형자	Vitidis Fructus	55
맥문동	Liriopsis Tuber	14
맥아	Hordei Fructus Germinatus	75
면실자	Gossypii Semen	61
모려	Oystreae Testa	15
목단피	Moutan Cortex Radicis	90
목적	Equiseti Herba	0
목통	Akebiae Caulis	50
몰약	Myrrha	5
밀몽화	Buddleiae Flos	67
반하	Pinelliae Tuber	32
백강잠	Bombycis Corpus	0
백개자	Sinapis Semen Alba	26
백굴채	Chelidonii Herba	51
백단향	Santali Album Lignum	80
백두구	Ammomi Rotuni Fructus	44

Table I—Continued

Korean Name	Pharmaceutical Name	PLase A ₂ Inhibition %
백두옹	Pulsatille Radix	38
백렴	Ampelopsis Radix	63
백모근	Imperatae Radix	59
백미	Cynanchi Radix	3
백부자	Aconiti Koreani Rhizoma	38
백선펜	Dictamni Radicis Cortex	37
백자인	Thujae Semen	66
백질려	Tribuli Fructus	83
백출	Atractylodes Rhizoma Alba	20
백편두	Dolichoris Semen	7
백합	Lilii Bulbus	5
별갑	Amydae Carapax	58
보두	Strychni Ignatii Semen	0
복령	Hoelen	26
복신	Hoelen Cum Radix	8
봉출	Zedoary	80
부자	Aconiti Tuber	7
부평	Spirodela Herba	70
비파엽	Eriobotryae Folium	83
비해	Tokoro Rhizoma	26
빈랑자	Arecae Semen	92
사간	Belamcandae Rhizoma	55
사삼	Adenophorae Radix	23
사상자	Torilidis Fructus	77
산두근	Sophorae Subprostratae Radix	43
산수유	Curni Fructus	0
산조인	Zizyphi Spimosi Semen	28
삼칠	Notoginseng Radix	40
상기생	Loranthi Ramulus	26
상육	Phytolaccae Radix	70
상표초	Vagina Ovorum Mantidis	37
색견지황	Rehmanniae Radix	0
석곡	Dendrobii Herba	0
석창포	Acori Graminei Rhizoma	24
선모	Curculiginis Rhizoma	54
선복화	Inulae Flos	69
세신	Asuasari Radix	18
소맥	Tritici Semen	15
소목	Caesalpiniae Lignum	81
소엽	Perillae Herba	70
소자	Perillae Semen	47
소태실	Picrasmae Fructus	69
소회향	Foeniculi Fructus	50
쇄양	Cynomorii Herba	65
숙지황	Rehmanniae Radix Preparata	17
승마	Cimicifugae Rhizoma	83
신이	Magnoliae Flos	61
양강	Alpiniae Officinarum Rhizoma	78
애엽	Artemisiae Asiaticae Herba	70
어성초	Hoitiyniae Herba	37
여정실	Ligudri Fructus	39
연교	Forsythiae Fructus	52
연자육	Nelumbinis Semen	84
영신초	Polygalae Japonicae Herba	47
영지	Ganoderma	57
오가피	Acanthopanax Cortex	76
오미자	Schizandrae Fructus	24
오배자	Galla Rhois	75
오수유	Evodiae Fructus	51

Table I — Continued

Korean Name	Pharmaceutical Name	PLase A ₂ Inhibition %
오약	Linderae Radix	72
오적골	Sepiae Os	0
와송	Orostachys Herba	19
왕불유행	Melandrii Herba	48
용골	Fossilia Ossis Mastodi	17
용규	Solanii Herba	70
용안육	Longanae Arilus	5
우슬	Achyranthis Radix	10
원방풍	Gleniae Radix	0
원지	Polygalae Radix	31
위령선	Clematidis Radix	33
유근피	Ulmi Pumilae Cortex	71
유황	Sulfur	74
육두구	Myristicae Semen	30
육계	Cinnamomi Cortex Spissus	72
육종용	Cistanchis Herba	37
의이인	Coicis Semen	35
익모초	Leonuri Herba	70
음양곽	Epimedii Herba	57
인진호	Artemisiae Capillaris Herba	51
일천궁	Cnidii Rhizoma	3
작약	Paeoniae Radix	86
저령	Polyporus	40
저실자	Broussonetiae Fructus	60
적석지	Halloysitum Rubrum	27
전충	Buthus	26
전호	Anthrisci Radix	7
정공피	Sorbus Cortex	79
정향	Caryophylli Flos	70
정향피	Caryophylli Cortex	92
조각자	Gleditsiae Spina	59
조구등	Uncariae Ramulus et Uncus	34
조협	Gleditsiae Fructus	53
종유석	Stalactium	73
죽여	Bambusae Caulis in Taeniam	55
죽엽	Bambusae Folium	51
지각	Auranthii Fructus	20
지모	Anemarrhenae Rhizoma	7
지부자	Kochiae Fructus	48
차전자	Plantaginis Semen	24
천마	Gastrodiae Rhizoma	22
천련자	Meliae Fructus	82
천산갑	Manitis Squama	77
천오	Aconitii Tuber	20
천화분	Trichosanthes Root	14
천황련	Coptidis Rhizoma	10
청목향	Aristolochiae Radix	0
청피	Aurantii Immatri Pericarpium	34
초과	Amomi Tsao-ko Fructus	66
초두구	Alpiniae Katsumadaii Semen	83
측백엽	Biotae Orientalis Folium	68
택란	Lycopi Herba	69
택사	Alismatis Rhizoma	40
토복령	Smilacis Rhizoma	70
토사자	Cuscutae Semen	18
파고지	Psoraleae Semen	77
파극	Morindae Radix	25
패장	Patriniae Radix	60
편축	Polygoni Avicularis Herba	68

Table I — Continued

Korean Name	Pharmaceutical Name	PLase A ₂ Inhibition %
포공영	Taraxaci Herba	17
필팔	Piperis Longi Fructus	32
하고초	Prunellae Spica	50
하수오	Polygoni Multiflori Radix	16
한수석	Glauberite	65
해당근	Rosae Rugosae Root	70
해동피	Kalopanacis Cortex	64
해분	Notarchi Eachii Ovum	32
향부자	Cyperi Rhizoma	0
향유	Elsholtziae Herba	63
현삼	Scrophulariae Radix	83
현초	Geranii Herba	69
현호색	Corydalis Tuber	0
혈갈	Draconis Sarguis	56
형개	Schizonopetae Herba	0
호마인	Sesami Semen	10
호황련	Picrorrhizae Rhizoma	38
홍화	Carthami Flos	41
홍화인	Carthami Semen	25
화피	Betulae Cortex	91
황금	Scutellariae Radix	68
황기	Astragali Radix	0
황정	Polygonati Rhizoma	10
흑축	Pharbitidis Semen	16

성을 측정하여 90% 이상의 저해를 나타낼때 +4, 89~80% 저해일때 +3, 79~70% 저해일때 +2, 69~60% 저해를 나타낼때 +로, 그이하일때는 -로 표시하였다.

결과 및 고찰

한방과 민간에서 사용되고 있는 생약을 무작위로 200종을 선택하여, 유기용매법으로 추출한 후 염증반응에 직·간접적으로 관여하고 있음이 알려진 염증성 PLase A₂를 효소원으로 사용하여 저해활성을 검색한 결과를 Table I에 요약하였다.

Table I의 결과에 Rat platelet로 부터 정제한 group II PLase A₂를 효소원으로 저해활성을 검색한 결과는 다음과 같다.

1) 90% 이상의 저해활성을 나타내는 생약은 다음과 같다.

노회, 목단피, 빈랑자, 정향피, 화피 5종류의 생약에서 강한 저해활성이 있음을 알수 있었다.

2) 89~80%의 저해활성을 나타내는 생약은 다음과 같다.

감수, 감인, 금은화, 대황, 두충, 마황근, 백단향, 백질려, 복신, 비파엽, 소목, 승마, 연자육, 작약, 천련자,

Table II — Inhibitory activity of organic solvent soluble fractions of crude drugs on group II phospholipase A₂

생약	분획	% Inhibition Rate ^b					
		Methanol	Hexane	CHCl ₃	EtOAc	Butanol	H ₂ O
부 평		+2	+3	+3	-	-	-
토복령		+2	+3	+4	+4	+2	-
금은화		+3	+4	+4	+4	+3	-
작 약		+3	+3	+4	+4	+3	-
노 회		+3	+4	+3	+4	+	-
포공영		-	+3	+4	+4	+3	-
연 교		-	+1	+3	+1	+3	-
황 금		+	-	+1	+4	+4	-
측 백		+	+1	+1	+4	+4	-
애 엽		+2	+1	+3	+4	+4	-

^a Concentration 25 µg/ml

^b Above 90% : +4, 89~80% : +3, 79~70% : +2, 69~60% : +, below 60% : -

^c All samples were tested duplicate

초두구, 현삼 17종의 생약이었다.

Table II 결과에는 200종의 생약 중 활성이 강한 것과 약한 것 10종을 선별하여 유기용매법으로 단계적으로 분획한 후 저해활성을 검색한 것이다.

3) PLA₂ 저해제 개발가능성이 높은 생약으로서는 토복령의 CHCl₃, EtOAc층, 금은화의 hexane, CHCl₃, EtOAc층, CHCl₃, EtOAc층, 작약의 CHCl₃, EtOAc, Butanol층, 노회의 methanol, hexane, CHCl₃, Butanol층, 포공영의 CHCl₃, EtOAc층 등이었다. 황금의 EtOAc, butanol, 애엽의 EtOAc, butanol층 등이었다.

저자들은 이러한 방법으로 금은화의 EtOAc분획으로부터 새로운 구조를 갖는 PLase A₂ 저해제인 ochnaflavone를 분리하여 보고하였다.²²⁾

금후 계속적으로 PLase A₂저해활성이 강한 생약을 선택하여 유기용매분획법으로 분리한 검체를 사용하여 저해제를 검색하면 지금까지 보고된 저해제와는 다른 구조를 가진 항염증 및 항알러지제의 개발에 필요한 기초적인 자료가 제공될수 있으리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 선경인더스트리 및 보건복지부 신약개발과제에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문헌

1) Morley, J., Page, C. P., Mazzoni, L., Sanjar, S. :

Effect of ketotifen upon responses to platelet activating factor: A basis for asthma prophylaxis. *Annals of Allergy*, **56**, 335 (1986).

2) Mallet, A. I., Cunningham, F. M. : Structural identification of platelet activating factor in psoriatic scale. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 192 (1985).

3) Doebber, T. W., Wu, M.S., Robbins, J.C., Choy, B. M., Chang, M. N., Shen, T. Y. : Platelet activating factor(PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptors antagonist Kadsurenone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 799 (1985).

4) Benveniste, J., Chignard, M., Le Couedic, J. P., Vargaftig, B. B. : Biosynthesis of platelet activating factor(PAF-acether). Involvement of phospholipase A₂ in the formation of PAF-acether and lyso-PAF-acether from rabbit platelet. *Throm. Res.*, **25**, 375 (1982).

5) Vadas, P., Pruzanski, P. : Biology of diseases. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of diseases. *Lab. Invest.*, **55**, 391 (1986).

6) Chang, H. W., Kudo, I., Hara, S., Inoue, K. : Extracellular phospholipase A₂ activity in peritoneal cavity of casein-treated rats. *J. Biochem.*, **100**, 1099 (1986).

7) Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W., Inoue, K. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis" *J. Biochem.*, **105**, 395 (1989).

- 8) Baek, S. H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K., Chang, H. W. : Detection and characterization of extracellular phospholipase A₂ in pleural effusion of patients with tuberculosis. *Life Sci.*, **49**, 1095 (1991).
- 9) Forster, S., Ilderton, E., Norris, J. F. B., Yardley, H. J. : Characterization and activity of phospholipase A₂ in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *Br. J. Dermatol.*, **112**, 135 (1985).
- 10) Nakano, T., Ohara, O., Teroka, H., Arita, H. : Group II phospholipase A₂ mRNA synthesis is stimulated by two distinct mechanisms in rat smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **261**, 171 (1990).
- 11) Schalkwijk, C., Pfeilschifter, J., Marki, F., Van den Bosch, H. : Interleukin-1 β , tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 268 (1991).
- 12) Lanni, C., Becker, E. L. : Inhibition of neutrophil phospholipase A₂ by p-bromophenacylbromide, nordihydroguaiaretic acid, 5, 8, 11, 14-eicosatetrayenoic acid and quercetin. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.*, **76**, 214 (1985).
- 13) Jacobson, P. B., Marshall, L. A., Sung, A., Jacobs, R. S. : Inactivation of human synovial fluid phospholipase A₂ by the marine natural product, Manolide. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1557 (1990).
- 14) Wilkerson, W. W. : Anti-inflammatory phospholipase A₂ inhibitors. *Drug of the future* **15**(2), 140 (1990).
- 15) Nixon, J. S., Wilkinson, S. E., Davis, P., Bloxham, D. P. : The inhibitory profiles of hog pancreatic and human rheumatoid synovial phospholipase A₂. *Agents and Actions*, **17**, 299 (1985).
- 16) Fletcher, J., Kistler, P., Rosenberg, H., Michaux, K. : Dantrolene and mepacrine antagonize the hemolysis of human red blood cell by halothane and bee venom phospholipase A₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **90**, 410 (1987).
- 17) Dennis, E. A. : Regulation of eicosanoid production: Role of phospholipase and inhibitors. *Biotechnology*, **5**, 1294 (1987).
- 18) Murakami, M., Hara, N., Kudo, I., and Inoue, K. : Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A₂. *J. Immunol.*, **151**, 5675 (1993).
- 19) Horigome, K., Tamori-Natori, Y., Inoue, K., Nojima, S. : Effect of serine phospholipid structure on the enhancement of concanavaline A induced degranulation in rat mast cell. *J. Biochem.*, **100**, 571 (1986).
- 20) Arai, H., Inoue, K., Nishikawa, K., Banno, Y., and Nojima, S. : Properties of acid phospholipase in lysosome and extracellular medium of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biochem.*, **99**, 125 (1986).
- 22) Chang, H. W., Baek, S. H., Chung, K. W., Son, K. H., Kim, H. P. and Kang, S. S. : Inactivation of phospholipase A₂ by naturally occurring biflavonoid, ochonaflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 843 (1994).