

내독소로 유도된 급성폐손상에서 PLA2의 억제제인 Rutin의 효과

김 성 은*, 이 영 만¹, 박 원 학
영남대학교 이과대학 생물학과, ¹대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Effect of PLA2 Inhibitor Rutin on Endotoxin-Induced Acute Lung Injury

Seong Eun Kim*, Young Man Lee¹ and Won Hark Park

Department of Biology, Yeungnam University, Kyungbuk, 712-749, Korea

¹Department of Physiology, Catholic University of Daegu, Daegu, 705-718, Korea

(Received January 9, 2004; Accepted February 6, 2004)

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a kind of acute lung injury characterized by inflammatory disruption of alveolar capillary barrier and notorious for its high mortality. Neutrophils cause cell damage through the production of free radicals, inflammatory mediators, and proteases in ARDS. PLA₂ might serve a primary regulatory role in the activation of neutrophils. This present study was performed to elucidate the effect of rutin known as PLA₂ inhibitor on ARDS induced by endotoxin. Endotoxin had increased lung myeloperoxidase (MPO) activity, BAL (bronchoalveolar lavage) protein content, numbers of neutrophils in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) compared with those of control rat ($p < 0.001$). In addition, histological evidence of lung injury was correlated with neutrophil influx into alveolar space and cerrous perhydroxide granules were found in lining of endothelial cell, alveolar type I, II cells. In contrast, pretreated group of rutin had significantly decreased all of the parameters ($p < 0.001$). These data suggest that inhibition of PLA₂ is one step approach that block the process of ARDS.

Accordingly, we conclude that rutin can be used as the prophylactic agent for ARDS on the bases of these experimental results.

Key words : Acute lung injury, ARDS, Endotoxin, Neutrophils, Rutin

서 론

급성호흡곤란증후군 (acute respiratory distress syn-

drome, ARDS)은 다양한 원인으로 초래되는 급성 염증성 폐 질환으로써 폐혈관 내피세포 및 폐포세포가 손상을 받아 폐포의 주요기능인 가스교환 및 수분 또는 체액의 폐포내 삼출방지 기능에 이상이 초래되는

* Correspondence should be addressed to Seong Eun Kim, Department of Biology, Yeungnam University, Kyungbuk, 712-749, Korea. Ph.: 053-810-2371, FAX: 053-815-3061, E-mail: dodohanse@hanmail.net
Copyright © 2004 Korean Society of Electron Microscopy

병리손상을 포괄적으로 일컫는 증후군이다(Villar & Slutsky, 1989).

ARDS 환자들에서 나타나는 폐장의 형태학적 변화 및 기능적 변화는 심한 저산소혈증 및 모세혈관의 투과성 증가로 인한 폐부종(Ware & Matthay, 2000; Downey, 1999)과 폐용압률의 감소 등이며, 1967년 Ashbaugh & Bigelow에 의해 처음으로 기술된 이래 쇼크를 동반한 외상의 합병증으로 주목받았으나, 1994년 American-European Consensus Conference에서 inflammation syndrome으로 정의된 후 부상 외에도 타 장기의 바이러스 감염, 위 내용물의 흡인, 독성가스 흡입, 패혈증, 심한 화상, 혈액투석, 약물과다 등이 ARDS를 일으키는 원인인 것으로 보고되었다(Villar & Slutsky, 1989). ARDS의 진행에는 체내의 다양한 과정이 연관되고 많은 체액성 인자가 동시에 발효(Glauser, 2000)되기 때문에 한 가지 과정의 차단으로는 ARDS를 효과적으로 치료할 수 없을 뿐만 아니라 병인론의 확립에도 많은 어려움이 있다(Connelly & Repine, 1997).

패혈증(sepsis)과 함께 수반되는 ARDS도 여전히 병인론이 밝혀지지 않았으며(Bannerman & Goldblum, 2003), 실험동물을 이용한 ARDS model들 중에서 내독소(endotoxin)의 주입은 사람에서의 패혈증 기작과 유사하여 실험적인 원형(prototype)으로 사용되어지고 있다(Vadas et al., 1993). 내독소로 유도된 ARDS에서 조직 손상을 일으키는데 관여하는 직접적인 기전이 밝혀지지 않았으나, 여러 인자들 중 호중구는 내독소를 주입 한지 6시간이 지나면 폐포강 내에서 현저히 증가되며(Weiland et al., 1986), 폐장 내에서 호중구가 활성화되면 elastase, myeloperoxidase(MPO)와 같은 neutral protease를 분비할 뿐만 아니라 많은 양의 자유산소기(free radicals)를 생성하여(Lee et al., 2000) 폐부종을 일으키는 주요 원인으로 작용한다(Rinaldo & Roger, 1982).

Schoenberg & Beger(1993)는 호중구 활성화와 축적에는 hypoxanthin-xanthine oxidase system에 의해 생성된 자유산소기(free radicals)가 "molecular trigger"로 작용하고, Ca^{2+} 의 농도 증가에 의한 PLA_2 (phospholipase A_2)의 활성화가 "enzymatic trigger"로 작용한다고 하였다. 또 Aldridge(2002)는 호중구의 활성화는 Ca^{2+} 의 농도와 Protein Kinase C의 활성화에 의한

PLA_2 의 농도 증가에 기인한다고 하였다.

1983년 Vadas & Hay는 실험동물을 이용한 endotoxin shock 모델에서 혈장 내의 PLA_2 활성이 증가되는 것을 보고한 이래 Durham & Selig(1990)은 실험동물에게 PLA_2 를 직접 주입한 실험에서 폐장의 간질성 부종과 염증세포의 침윤, 폐포벽의 비후와 같은 전형적인 ARDS의 특징들을 관찰함으로써 혈장 내에서 증가된 PLA_2 의 농도는 패혈증뿐만 아니라 ARDS로의 진행과도 밀접한 관련이 있다고 하였다(Baur et al., 1989).

이에 본 연구에서는 호중구의 폐장 내 축적에 따른 산화적 스트레스가 ARDS를 일으키는 가장 큰 원인으로 보고, 호중구를 활성화시키는데 중요한 PLA_2 를 억제하고자 flavonoid 계열의 rutin을 투여함으로써 폐장내 변화를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 체중 280 g 내외의 Sprague-Dawley 중수컷 흰쥐로, 생리적식염수를 기도로 투여한 대조군과 동량의 내독소 투여군, rutin을 전처리 한 후 내독소를 투여한 군으로 나누어 수행하였다. Enflurane (아리테인[®])은 일성신약주식회사, xylazine은 Haver사(New York, NY, USA)에서 구입하였고, 그 외 모든 시약은 Sigma Chemical Company (Sigma Co. St. Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 흰쥐에서의 급성폐손상의 유도

급성폐손상 유발을 위해 실험동물을 enflurane으로 마취시킨 후 대장균의 내독소(*E. Coli* endotoxin, type 0127; B8) 100 μ g을 0.5 ml의 생리적식염수에 녹여 기도내로 분무하고 5시간 경과한 뒤 호흡곤란 증세와 급성폐손상이 일어났음을 확인하였다. Rutin (5 mg/kg)은 5% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 복강으로 투여하여 60분간 방치한 후 내독소를 분무하였다.

2) 내독소에 의한 폐포세척액 내의 호중구 산정

내독소를 투여한지 5시간 후 폐포세척액내 호중구를 산정하였다. 즉 8.0 ml의 생리적 식염수로 기관지 폐세척 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행한 후 얻은 6.0 ml의 폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 상온에서 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하고 침전층을 생리적식염수로 재부유시키고 염색한 뒤 hemocytometer를 이용해 백혈구를 산정하였다. 전체 백혈구 중 호중구를 산정하여 백분율로 환산하고 폐세척액 내 호중구의 수를 계산하였다.

3) 폐세척액 내 단백질 함량 측정

혈관내피세포의 손상 정도를 알아보기 위해 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 경정맥으로 주사하여 실험동물을 치사시켜 기관절개술을 시행하고 폐세척을 시행하였다. 이 때 얻어진 폐세척액을 1,500 rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 Brown et al. (1989)의 방법에 따라 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 폐장내 myeloperoxidase (MPO) 활성도의 측정

호중구 침윤을 확인하기 위하여 Goldblum et al. (1985)의 방법에 따라 myeloperoxidase (MPO)의 활성도를 측정하였다. Ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 Masterflex perfusion pump (Cole-Parmer, USA)로 폐장을 관류시킨 후 좌측폐장을 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 담겨 Polytron homogenizer (Switzerland)로 마쇄하고 18,000 g (Beckman, USA)로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 그 후 침전층에 0.5% hexadecyl tetramethyl ammonium bromide (HTAB)가 함유된 50 mM potassium phosphate (pH 6.0) 용액을 4.0 ml씩 첨가한 후 4°C에서 90초간 Vibracell (Sonics & Materials Inc. USA)로 초음파처리하였다. 그 뒤 균질액을 60°C에서 120분간 반응시키고 1.0 ml를 실온에서 12,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상층액을 *o*-dianisidine이 함유된 500 μ M 과산화수소용액과 반응시켜 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 때 구한 dA/dt 의 수치에 13.5를 곱한 값을 폐장의 무게로 나누어 MPO의 활성도 (U/g of wet lung)

를 계산하였다.

5) 광학현미경을 이용한 조직학적 관찰

Rutin의 효과를 형태학적으로 확인하기 위하여 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 마취하고 개흉술을 시행하여 폐장을 적출하였다. 적출된 폐장을 포르말린에 넣어 조직내 공기를 제거한 후 알코올의 농도를 순차적으로 증가시켜 탈수시키고 xylene으로 여분의 알코올을 제거 후 포매하였다. 제작된 블록을 박절기 (Microtome, Model 45, Lipshaw)를 이용해 4~5 μ m로 박절 후 hematoxylin과 eosin으로 염색, 봉합 후 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

6) 전자현미경을 이용한 미세구조변화의 관찰

내독소에 의한 폐 손상시 rutin의 효과를 미세구조적으로 관찰하기 위해 폐장을 세절하여 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 2~4시간 전고정시키고, 4°C의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척 후 1% osmium tetroxide에 90분간 후고정시켰다. 그 후 알코올의 농도를 증가시켜 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 epoxy resin에 침투시키고 포매하여 37°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 동안 열중합시켜 블록을 제작하였다. 블록은 초박절편기 (Ultramicrotome, Reichert Supernova)를 이용해 60~80 nm로 초박절한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

7) 폐장내 산소기 형성의 관찰

산소기 형성을 확인하기 위해 Hobson et al. (1991)의 방법에 따라 $CeCl_3$ cytochemical electron microscopy를 시행하였다. 적출한 조직을 세절한 후 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole, 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.0002% triton X-100으로 조제된 기질에 담그고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 후 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.5)와 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 수세하고 2.5% glutaraldehyde로 고정하여 alcohol-propylene oxide 계열로 탈수와 치환을 수행하였다. 그 후 epoxy resin에 포매하고 열중합과정 후 블록을 제작하

여 초박절편기 (ultramicrotome)로 초박절한 뒤 uranyl acetate로 염색 후 투과전자현미경으로 관찰하였다.

8) 통계처리

통계처리는 SPSS WIN 통계 프로그램을 이용하여 유의수준을 95%로 하여 ANOVA test를 실시하였다.

결 과

내독소로 유도된 흰쥐의 급성폐손상에서 PLA₂의 억제제인 rutin의 효과를 규명하기 위하여 시행한 실험 결과는 다음과 같다.

내독소를 흰쥐의 기관 (trachea)으로 주입한 후 각

Table 1. Comparison of Lung weight $\times 10^3$ /Body weight ratio

Group	Control	ETX	ETX +Rutin
lung weight $\times 10^3$ / Body weight ratio	1.61 \pm 0.088 (n=5)	2.08 \pm 0.063*** (n=10)	1.71 \pm 0.046*** (n=11)

Each values are given as mean+S.E. The number of experiments is in the parentheses. ***p<0.001; significantly different from the control. ###p<0.001; significantly different from the ETX. ETX; endotoxin-treated group. ETX+Rutin; rutin was treated prior to endotoxin.

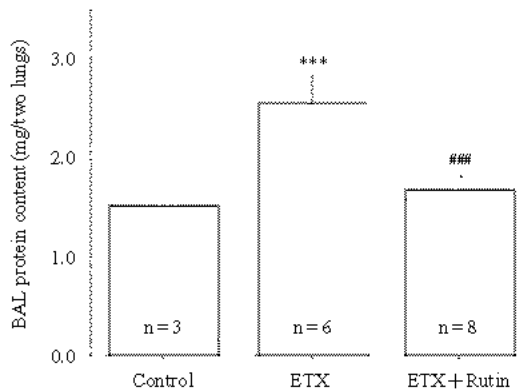


Fig. 1. Effect of rutin on the BAL protein content. Endotoxin had increased ($p<0.001$) lung leak denoted by the protein content (mg/two lungs) in BALF compared with that of control rats. Rutin had decreased ($p<0.001$) the lung leak denoted the decreased content of BAL protein compared with that of endotoxin treated rats. Number of experiments was in the parentheses. ***p<0.001; significantly different from control. ###p<0.001; significantly different from ETX.

group 간의 폐장 무게를 비교한 결과 내독소 투여군 (ETX)은 2.08 ± 0.063 로 대조군의 1.61 ± 0.088 과 비교하여 현저히 ($p<0.001$) 증가하였으나 rutin을 처리한 군 (ETX+Rutin)은 1.71 ± 0.046 으로 유의하게 ($p<0.001$) 감소하여 rutin에 의해 급성폐부종이 억제되었음을 관찰하였다 (Table 1). 폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 내 단백질량은 내독소를 투여함으로써 1.24 ± 0.285 (mg/two lungs)에서 2.43 ± 0.117 으로 현저히 ($p<0.001$) 증가되었으며, Rutin을 처리한 군에서는 1.76 ± 0.060 으로 유의하게 ($p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 1). ETX군의 BALF 내에서 산정된 호중구의 수 (millions/two lungs)는 3.98 ± 0.474 로 대조군의 0.69 ± 0.064 와 비교해 현저히 ($p<0.001$) 증가해 호중구가 혈관 내에서 폐포강내로 이동하였음을 확인하였으나 rutin을 전처리하면 0.66 ± 0.077 로 유의하게 ($p<0.001$) 감소하였다 (Fig. 2). 폐장내 MPO 활성도의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. ETX군은 MPO 활성도가 47.79 ± 4.308 로 대조군의 3.73 ± 0.175 (U/g of wet lung)에 비해 현저히 증가하였으나 ($p<0.001$), rutin을 처리하면 27.27 ± 4.430 으로 유의하게 감소되었다 ($p<$

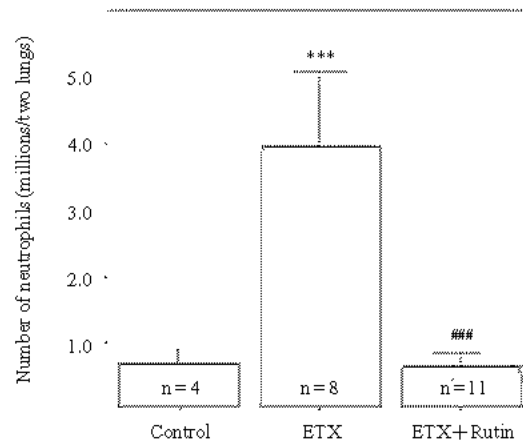


Fig. 2. The number of neutrophils in the BALF was reflecting their extravasation. Comparing with control rats, endotoxin treated rats showed increased ($p<0.001$) migration of neutrophils into alveolar space. In contrast, pretreatment group of rutin had significantly decreased ($p<0.001$) number of neutrophils compared with endotoxin treated rats. Number of experiments was in the parentheses. ***p<0.001; significantly different from control. ###p<0.001; significantly different from ETX.

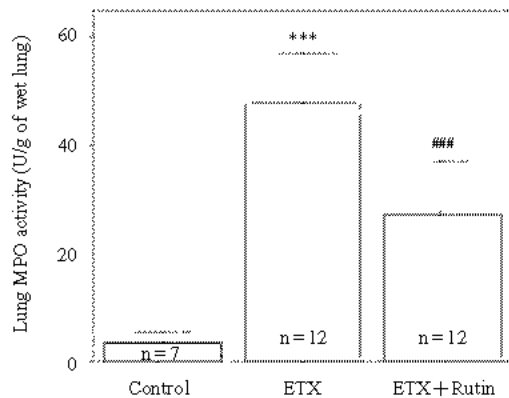


Fig. 3. Changes in myeloperoxidase (MPO) activity in endotoxin treated with rutin rats. Endotoxin had increased ($p < 0.001$) the pulmonary MPO activity which was reversed ($p < 0.05$) by pretreatment of rutin prior to endotoxin instillation in rats. Number of experiments was in the parentheses. *** $p < 0.001$; significantly different from control. ### $p < 0.05$; significantly different from ETX. ETX; endotoxin treated group. ETX +Rutin; rutin was treated prior to endotoxin.

0.05).

광학현미경적으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에서는 정상적인 조직학적 소견을 보이지만(Fig. 4-a), 내독소 투여군은 혈관주위의 부종(perivascular cuffing)과 함께 폐포강의 크기가 감소하고 폐포내 단백질 및 무기폐가 관찰되었다(Fig. 4-b). 그러나 rutin을 처리하면 혈관 주위의 부종이 상당히 감소되었으며, 폐포강의 크기도 대조군과 유사하게 관찰되었다(Fig. 4-c).

전자현미경적 관찰 결과 대조군의 폐조직은 정상적인 소견을 보이지만(Fig. 5), 내독소 투여군은 폐장내 호중구의 침윤이 관찰되었으며(Fig. 6), 특히 alveolar type II cell 내의 lamellar body의 변성과 공포화 현상이 두드러지게 관찰되어 surfactant의 분비에 이상이 있음을 알 수 있었다. 또, Fig. 6에서 알 수 있듯이 혈관내피세포의 부종 및 괴사와 함께 alveolar type II cell의 cytoplasm에서 공포(vacuoles)가 형성되었고 폐포강의 크기도 감소하였다. Rutin군에서는 혈관내피세포의 부종이 나타나지는 했으나 내독소 투여군과 비교해 그 정도가 두드러지게 감소하였고, 특히 alveolar

type II cell 내의 lamellar body의 구조도 비교적 잘 보존되어 있었다(Fig. 7).

세포화학적 방법을 이용하여 폐장 내에서 생성되는 과산화수소를 관찰한 결과 대조군에서는 Fig. 8에서 보듯이 cerrous perhydroxide granules이 관찰되지 않았으나 ETX군에서는 cerrous perhydroxide granules의 형성이 현저히 증가되었고(Fig. 9), 특히 alveolar type II cells의 막표면을 따라 매우 강하게 반응하였다. 반면, rutin 처리군에서는 폐장내 cerium chloride와 반응하는 과산화수소의 형성이 내독소를 투여한 군과 비교하여 볼 때 두드러지게 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 10).

고 찰

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 급성 염증성 폐질환으로써 모세혈관의 투과성 증가로 인한 폐부종과 심한 저산소혈증 및 폐포의 주요기능인 가스교환 기능에 이상이 초래되는 병리손상을 일컫는 증후군이다(Villar & Slutsky, 1989).

ARDS는 다양한 원인에 의해 유발되지만 이 중 패혈증(sepsis)은 ARDS를 일으키는 가장 흔한 원인이며 대부분의 병인론 연구가 집중되어 있으나, 현재까지도 확실한 병인론이 정립되어 있지 않은 채 여러 가지 가능성들이 언급되고 있다(Terada et al., 1992). 그러나 ARDS의 진행에는 폐장내 축적된 호중구(neutrophils)와 호중구에서 유리되는 elastase, myeloperoxidase (MPO)와 같은 protease 그리고 많은 양의 자유산소기(free radicals)가 관여한다는 실험적 증거들이 제시되고 있다(Wiener-Kronish et al., 1990; Lee et al., 2000).

1987년 Chang 등은 많은 실험결과들을 조사한 결과 여러 가지 질병에서 나타나는 염증이나 조직 손상은 PLA_2 와 많은 연관성을 가진다고 하였으며, 실험동물에게 PLA_2 를 주입한 후 일정시간 경과하면 ARDS 환자들에게서 나타나는 surfactant의 손상과 alveolar type II cell의 necrosis가 두드러진다(Vadas et al., 1993). 이와 같은 PLA_2 가 활성화되면 lysophosphatidylcholine, 아라키돈산, PAF와 같은 염증성 지질분자

들은 호중구의 화학주성을 유발하여 폐장내 호중구의 침윤을 유발하므로(Bomalaski et al., 1989) PLA₂의 농도와 ARDS의 진행과의 관계는 매우 밀접하다고 사료된다.

이에 본 연구에서는 호중구의 폐장 내 축적에 따른 산화적 스트레스가 ARDS를 일으키는 가장 큰 원인으로 보고, 호중구를 활성화시키는데 중요한 PLA₂를 억제하고자 flavonoid 계열의 rutin을 투여함으로써 폐장내 변화를 알아보았다.

본 실험 결과 내독소의 주입으로 유도된 급성폐손상에서 폐세척액 내 단백질 함량, 호중구의 침윤 그리고 폐장 내의 MPO의 활성도는 rutin을 전처리함으로써 유의하게 감소하였다. 이것은 내독소 주입으로 유도된 alveolacapillary unit의 손상과 염증세포의 혈관외 유출이 rutin의 작용으로 인해 억제되어 호중구에 의한 oxidative stress가 감소되었을 것으로 사료된다. 또한 광학현미경, 전자현미경을 이용한 미세구조의 변화 관찰은 이러한 결과를 뒷받침하는 증거로서, 내독소 투여군에서 나타난 alveolar type II cell 내의 lamellar body의 변성과 두드러진 공포화 현상으로 인해 surfactant의 분비에 이상이 있음을 알 수 있었으나, rutin을 투여한 군에서는 alveolar type II cell 내의 lamellar body, 혈관 내피세포 등의 손상이 매우 감소하였다. 세포화학적 방법을 이용한 과산화수소의 생성을 알아보기 위한 실험 결과 내독소 투여군은 cerrous perhydroxide의 과립이 alveolar type I, II cell의 표면에서 현저히 증가한 것이 관찰되어 폐포내 호중구 침윤에 의해 산소기 생성이 두드러졌으나 rutin을 투여한 군에서는 cerrous perhydroxide 과립이 나타나지는 했으나 호중구 막 주변에서만 소수 관찰되었다. 이러한 폐장조직내의 산소기 생성은 호중구의 침윤 및 혈관내피세포의 괴사, alveolar type II cell의 변형과 lamellar body의 팽대 및 공포화현상과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

이러한 실험적 증거들은 rutin에 의한 PLA₂의 작용 억제가 호중구의 침윤 및 이동을 억제하고 호중구성 산화적 스트레스의 감소를 통해 조직 손상을 억제하였음을 시사한다. 이것은 ARDS가 PLA₂에 의한 호중구성 산화적 스트레스가 원인이라고 주장하는 Lee et al. (1997)의 결과와 일치하였다.

이와 같은 실험결과들로 유추해 볼 때 PLA₂에 의한 호중구의 활성화는 급성폐손상을 야기할 수 있는 주된 원인이며, PLA₂ 억제제인 rutin은 급성폐부종, 호중구의 침윤 및 산소기 형성 감소에 효과가 있는 것으로 확인되었으므로 이러한 결과들은 급성폐손상 환자의 치료를 위해 rutin을 임상적으로 적용하는데 있어 중요한 근거가 되는 자료라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Aldridge AJ: Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 168(4) : 204-214, 2002.
- Ashbaugh DG, Bigelow DG: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2 : 319-323, 1967.
- Bannerman DD, Goldblum SE: Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(6) : L899-914, 2003.
- Baur M, Schmid TO, Landauer B: Role of phospholipase A₂ in multiorgan failure with special reference to ARDS and acute renal failure (ARF). *Klin Wochenschr*, 67(3) : 196-202, 1989.
- Bomalaski JS, Baker D, Resurreccion NV, Clark MA: Rheumatoid arthritis synovial fluid phospholipase A₂ activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil degranulation and superoxide ion production. *Agents Actions* 27(3-4) : 425-437, 1989.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ: Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 180 : 136-139, 1989.
- Chang Joseph, Musser JH, McGregor Herb: Phospholipase A₂ : Function and Pharmacological regulation. *Biochem pharmacol* 36(15) : 2429-2436, 1987.
- Connelly KG, Repine JE: Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Annu Rev Med* 48 : 429-445, 1997.
- Durham SK, Selig WM: Phospholipase A₂ induced pathophysiologic changes in the guinea pig lung. *Am J Pathol* 136(6) : 1283-1291, 1990.
- Downey GP: Regulation of neutrophil activation in acute lung injury. *Chest* 116(1 suppl) : 46S-54S, 1999.
- Glauser MP: Pathophysiologic basis of sepsis: Considerations

- for future strategies of intervention. Crit Care Med 28(9 Suppl.): S4 S8, 2000.
- Goldblum SE, Wu KM, Jay M: Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. J Appl Physiol 59 : 1978 1985, 1985.
- Hobson J, Wright J, Chung A: Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette smoke exposed tracheal explants. Am J Pathol 139 : 573 580, 1993.
- Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine AJ, Repine JE: Platelet activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin 1 intratracheally. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(1) : L75 80, 2000.
- 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 155(5) : 1624 8, 1997.
- Rinaldo JE, Rogers RM: Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. N Engl J Med 306(15) : 900 9, 1982.
- Schoenberg MH, Beger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med 21(9) : 1376 86, 1993.
- Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE: Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia reperfusion. Am J Physiol 263(3 Pt 1) : L394 401, 1992.
- Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W: Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease states. Journal of Lipid Mediators 8: 1 30, 1993.
- Vadas P, Hay JB: Involvement of circulating phospholipase A₂ in the pathogenesis of the hemodynamic changes in endotoxin shock. Can J Physiol Pharmacol 61(6) : 561 6, 1983.
- Villar J and Slutsky AS: The incidence of the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 14 : 814 6, 1989.
- Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. N Eng J Med 342 : 1334 1349, 2000.
- Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE: Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. Am Rev Respir Dis 133(2) : 218 25, 1986.
- Wiener Kronish JP, Gropper MA, Matthay MA: The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis, pathogenesis and treatment. Br J Anaesth 65(1) : 107 29, 1990.

< 국문초록 >

급성폐손상 중 가장 심한 형태인 급성호흡곤란증후군(ARDS)의 원형으로 사용되는 패혈증 모델에서 PLA₂의 억제제로 알려진 flavonoid 계열의 rutin이 폐장에 미치는 효과를 확인해봄으로써 ARDS의 치료제로써의 가능성을 검토하고자 하였다. 본 실험 결과 각 group간 폐장의 무게는 내독소 투여군이 대조군보다 현저히 높게 나타났으며, rutin을 전처리한 군은 내독소 투여군과 비교하여 폐장의 무게가 감소하였다. 또, MPO, 폐포세척액(BALF)내 단백질량과 호중구의 수를 측정 한 결과, 내독소를 투여한 군은 대조군보다 증가하였으나 rutin을 전처리한 군은 현저히 감소하였고, 조직학적 및 미세구조적 관찰에서도 내독소를 투여한 군에서 나타나는 혈관주위의 부종, 폐포강 내의 호중구의 축적 및 무기폐, 폐포세포의 괴사와 lamellar body의 공포화 현상과 같은 전반적인 병리학적 소견이 감소하였다. 폐장내 산소기 형성의 관찰 결과, rutin 투여군에서는 내독소 군에 비해 cerous perhydroxide granules이 감소함으로써 rutin에 의해 산소기의 형성이 감소하였음을 확인하였다.

이러한 실험 결과를 종합하여 볼 때 내독소에 의한 급성폐손상은 호중구의 활성화에 따른 산화적 스트레스 때문이라고 사료된다. 뿐만 아니라 PLA₂의 억제제인 rutin을 전처리함으로써 폐장의 손상이 유의하게 감소하였다는 점은 PLA₂가 호중구의 활성화에 매우 중요한 인자라고 생각되며, 기존의 사용되어지고 있는 ARDS의 치료법은 효과가 크지 않으므로 본 실험 결과 입증되어진 rutin은 앞으로 ARDS의 효과적인 치료제로써 사용될 수 있는 가능성이 매우 높다고 사료된다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 4.** Histological changes in the lungs of rats given endotoxin and rutin-pretreated. In control, the normal pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were well preserved (a). 5h after endotoxin challenge, perivascular edema (*) and intrapulmonary hemorrhage (arrow head) and formation of hyaline membrane (arrow) were observed (b). In the lungs of endotoxin with rutin, perivascular edema was less prominent compared with the lungs of endotoxin treated rat. And alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved (c). Bar indicates 50 μm .
- Fig. 5.** Representative electron microscopic findings of the normal lung in control group stained with uranyl acetate and lead citrate. In control, the normal pulmonary architectures such as endothelial cells, alveolar septa and alveolar lumen (AL) were well preserved. Lamellar bodies (LB) of alveolar type II cell were well preserved and microvillies (double arrow head) were shown clearly. In endothelial cells (En), basal lamina (BL) was intact. N: nucleus, Np: neutrophil, RBC: red blood cell. Bar indicates 1.7 μm .
- Fig. 6.** Representative electron microscopic findings of endotoxin treated lung. Necrosis of alveolar type II cells (arrow head) and vacuoles (*) in the alveolar type II cell were noted in endotoxin-treated lung. AL: alveolar lumen. Bar indicates 2.9 μm .
- Fig. 7.** Representative electron microscopic findings in lungs of pretreated with rutin. In the lungs of rat treated with rutin, lamellar bodies (LB) of alveolar type II cell were relatively well preserved. The lungs of rat pretreated with rutin showed intact lamellar bodies (LB) and microvilli (MV, arrow head) of alveolar type II cells which denoted well preserved and constant features. BL: basal lamina, RBC: red blood cell. Bar indicates 1.25 μm .
- Fig. 8.** Representative cytochemical electron microscopic findings of the lungs of control rats stained with uranyl acetate. Deposits of cerrous perhydroxide granules were not found in the lungs. Bar indicates 2.5 μm .
- Fig. 9.** Cytochemical electron microscopic findings of the lungs in endotoxin treated rats. In endotoxin-treated rats, dense granules of cerrous perhydroxide (arrow heads) were observed along the membranes of alveolar type I and II cells compared with control lung. Bar indicates 2 μm .
- Fig. 10.** Cytochemical electron microscopic findings of the lungs of rats given rutin prior to endotoxin. Few cerrous perhydroxide deposits were found (arrow head) compared with endotoxin treated rat's lung. Bar indicates 2 μm .

