□ 원 저 □

내독소 투여후 쥐의 폐조직내 Antioxidant (Superoxide Dismutase, Catalase, GSH-Peroxidase)의 변화에 대한 연구

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

송정섭 · 김치홍 · 권순석 · 김영균

김관형 · 한기돈 · 문화식 · 박성학

= Abstract =

The Change of Antioxidant Enzyme (Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase) in the Endotoxin Infused Rat Lung

Jeong Sup Song, M.D., Chi Hong Kim, M.D., Soon Seog Kwon, M.D., Young Kyoon Kim, M.D.
Kwan Hyoung Kim, M.D., Ki Don Han, M.D., Hwa Sik Moon, M.D. and Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background: Gram-negative bacterial endotoxin induced septicemia is known to be a leading cause in the development of adult respiratory distress syndrome(ARDS). The mechanism of endotoxin induced lung injury is mainly due to the activated neutrophils which injure the capillary endothelial cells by releasing oxidant radical and resulted in pulmonary edema. We studied the change of antioxidant enzyme in the case of large or small, intermittant dose of endotoxin infused rat lungs.

Methods: Endotoxin was given to the rat through the peritoneal cavity in the dose of 7 mg/kg body weight in the large dose group and 1 mg/kg for 10 days in the small dose group. Bronchoalveolar lavage (BAL) was done and rats were killed at 6, 12, 24 hours after single endotoxin injection in the large dose group and 3, 7, 10 days after daily endotoxin injection for 10 days in the small dose group. The lungs were perfused with normal saline through the pulmonary artery to remove the blood and were homogenized in 5 volume of 50 mM potassium phosphate buffer containing 0.1 mM EDTA. After centrifuging at 100,000 g for 60 minute, the supernatant was removed and stored at -70°C until measuring for superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) and protein.

Results: We observed the following results.

1) The lung wet/dry weight ratio and albumin concentration in the BAL fluids were increased to peak at 12 hours and neutrophil number in the BAL fluids were peak at 6 hours after endotoxin injection in the large dose group.

2) Cu, Zn SOD (IU/mg protein) was significantly decreased after 6, 12 hours after endotoxin injection in the large dose group.

3) There were no significant change in the level of Mn SOD, catalase, GSH-Px after endotoxin injection in both groups.

Conclusion: Endotoxin in the large dose group produced the acute pulmonary edema and decreased the Cu, Zn SOD in the lung tissue after injecting endotoxin at 6 and 12 hours. These phenomenon may be due to the cell membrane damage by endotoxin. Further research would be necessary whther

*본 논문은 1993년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구 조성비로 이루어 졌음.

*본 논문의 요지는 1992년도 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표 되었음.

giving SOD by intratracheal route or method to increase the synthesis of SOD may lessen the acute lung injury by endotoxin.

Key Words: Endotoxin, antioxidant enzyme.

서 론

그람 음성균의 내독소(endotoxin)에 의해서 성인 호흡곤란 증후군(ARDS: adult respiratory distress syndrome)이 유발되는 사실은 잘 알려져 있으며 그러한 급성 폐손상의 기전에 대하여는 주로 활성화된 호중구가 관여하는 때문으로 생각되고 있다. 즉 내독소에 의해서 직접, 간접적으로 활성화된 호중구에서 합성하여 분비하는 arachidonic acid metabolite, 단백질 해효소 및 superoxide, H_2O_2 , $OH^\bullet$, HOCL 등의 산소기에 의해서 모세혈관 내피세포와 type I 폐포 상피세포(alveolar epithelial cell)등이 일차적으로 손상을 받기 때문이다¹⁻⁴⁾.

산소기에 의한 세포독성을 줄이기 위한 방어기전으로 세포내에는 여러가지 항산화효소가 존재하는데 대표적인 것이 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-PX)로서 이들이 내독소에 의한 급성 폐손상시 활성도가 증가되는지 또는 감소되는지에 대하여는 많은 연구가 되어 있지 않다. 단지 내독소를 쥐에 투여시는 그후 95% 이상의 고농도의 산소에 노출시켰을때 산소독성(oxygen toxicity)에 의한 사망율이 감소되고 그 이유는 폐조직내 SOD의 양이 증가하거나^{5,6)} SOD, catalase 및 GSH-Px가 증가하기 때문⁷⁻¹⁰⁾이라는 보고들이 있다.

저자들은 쥐에 내독소를 대량 1회 투여하였을때 또는 소량 반복투여하였을때 폐조직내 항산화효소가 어떻게 변화하는지를 알아보고자 본 실험을 하였다.

재료 및 방법

건강한 250~300 g의 숫놈 쥐에 내독소(E. coli 011: B4 lipopolysaccharide, Difco)를 대량 1회 투여군에는 7 mg/kg body weight로 복강내 주입하였고 6, 12, 24 시간후에 각각 살해하였다. 소량 반복투여군에는 내독소를 1 mg/kg body weight로 10일간 복강내 주입하였고 3, 7, 10일 후에 각각 살해하였다.

각 군은 8마리씩으로 하여 그중 2마리는 기관지 폐포 세척술 및 조직검사를 하였다. 기관지 폐포세척술은 4°C의 생리 식염수를 5 cc씩 기도에 주입하고 회수하기를 4회 반복하였으며 회수된 세척액은 즉시 원심분리하여 상층액은 -70°C에 보관하였다가 후에 albumin 농도를 측정하였고 세포 침전물은 2회 HBSS (Hanks balanced salt solution)로 세척후 총 세포수를 세고 세포의 농도를 1×10^6 /ml로 맞춘후 이를 200 μ l 취하여 cytocentrifuge (Shandon Cytospin 2)하고 Diff-Quick 염색으로 감별세포 계산을 하였다. 나머지 쥐들에 대하여는 폐동맥을 통하여 4°C의 생리식염수를 주입하여 가능한한 혈액을 제거한후 적출하였다. 폐의 큰 혈관이나 기관지를 제거한후 폐의 무게를 측정하였고 무게의 5배되는 0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer를 가한후 3분간 homogenize 시켰다. 균질화된 용액은 4°C에서 100,000 g의 속도로 60분간 원심분리하였고 상층액은 -70°C의 냉장고에 보관하였다가 항산화효소의 활성도를 측정하였다.

SOD는 Salin등¹¹⁾의 방법을 이용하였으며 xanthine-xanthine oxidase 반응으로 superoxide를 발생하게 하여 superoxide에 의한 ferricytochrome C의 환원을 50% 억제하는 것을 SOD 1 단위로 하였고 분광측정기(spectrophotometer) 418 nm에서 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 20 mM sodium carbonate 완충액(pH 10.0)에 xanthine(50 μ M), cytochrome C (30 μ M)을 가한후 1분에 환원되는 ferricytochrome C의 농도가 0.025 absorbance 단위가 되도록 xanthine oxidase의 농도를 결정하였고 분당 cytochrome C의 환원 정도가 0.0125 absorbance 단위가 되는 것을 SOD 1 단위로 하였다. 그중 Mn SOD는 KCN 1 mM을 가해서 측정하였고 Cu, Zn SOD는 전체 SOD에서 Mn SOD를 뺀 값으로 계산하였다. Catalase는 Aebi H¹²⁾의 방법을 응용하였고 분광측정기로 240 nm에서 0.05 M tris buffer (pH 7.0)내 30 mM H_2O_2 의 분해되는 정도를 측정하여 catalase의 표준곡선과 비교하여 계산하였다. GSH-Px는 Paglia등¹³⁾의 방법을 응용하여 0.005 M EDTA를 함유한 phosphate buffer (pH 7.0)에

NADPH (0.0028 M), glutathione reductase (type 3), sodium azide (1.125M), glutathione (0.15M)을 혼합하고 H₂O₂ (0.0022M) 0.1 ml를 가한후 2분에서 4분 동안 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 분광측정기 340 nm에서 측정하여 NADPH의 molar extinction coefficient 6.22×10^{-6} 를 이용하여 계산하였다. 단백질은 Bio-Rad사의 microassay procedure로 측정하였다. 즉 bovine serum albumin을 적당히 희석하여 1~10 ug/ml의 농도로 만든후 이렇게 만든 표준 농도액 또는 페포세척액 800 μ l와 BIORAD 염색약 200 μ l을 혼합후 15분 경과후부터 분광측정기 595 nm에서 측정하였다.

폐의 wet/dry 중량비는 기관지 폐포세척술을 시행하기 전에 쥐의 우상엽 기관지를 결찰후 폐포세척술을 끝낸 다음 우상엽을 떼어 무게를 측정하였고 다시 oven에 48시간 건조시킨후 무게를 측정하여 그 비를 계산하였다.

결 과

각군에서 시행한 기관지 폐포세척술의 결과는 다음과 같다(Table 1). 대조군은 총 세포수가 1.5×10^6 개 이고 그중 대부분(98%)를 폐포 대식세포가 차지하고 있었다. 내독소 대량투여군은 염증세포가 현저히 증가하였고 특히 전체 폐포세척세포중 호중구가 차지하는 비율이 6시간 및 12시간후에서 각각 54%와 30%로 각각 현저하게 증가되었다. 내독소를 10일간 소량 반복투여한 군에서는 세포수의 큰 증가는 없었으나 3일, 7일, 10일후에

Table 1. BAL Cellular Profile in the Endotoxin Infused Rat Lungs

	Cell No ($\times 10^6$)	Macro- phage (%)	Lym- phocyte (%)	Neutro- phil (%)
Control	1.5	98	0.5	1
Endotoxin				
6 hr	6.56	40.5	5.58	53.95
12 hr	5.16	39.43	31	30
24 hr	2.36	81.4	11.91	6.7
3 day	1.34	88	3.5	8
7 day	1.7	77	15	8
10 day	2.36	86	9	5.5

각각 호중구 및 임파구가 10% 내외로 증가되어 있었다.

Cu, Zn SOD는 대조군 66.7 ± 26.3 U/mg protein에 비해 내독소 대량투여후 6시간 및 12시간 지난 군에서 21.9 ± 5.8 , 32.0 ± 9.5 로 각각 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.05$) 24시간후 및 소량반복 투여한 군에서도 감소되어 있었으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 1).

Mn SOD는 대조군 3.76 ± 3.18 U/mg protein에 비

Fig. 1. The Cu, Zn SOD levels in the endotoxin infused rat lung tissues.

Fig. 2. The Mn SOD levels in the endotoxin infused rat lung tissues.

Fig. 3. The catalase levels in the endotoxin infused rat lung tissues.

Fig. 4. The GSH-Px levels in the endotoxin infused rat lung tissues.

해 내독소 대량투여군 및 소량 반복투여군 모두에서 큰 변화가 없었다(Fig. 2).

Catalase는 대조군 32.3 ± 22.4 U/mg protein에 비해 대량 및 소량 반복투여군 모두에서 큰 변화가 없었고(Fig. 3), GSH-PX도 대조군 43.3 nM/mg protein에 비해 양군 모두에서 큰 변화가 없었다(Fig. 4).

폐의 wet/dry 중량비는 대조군이 5.7인데 비하여 내

Fig. 5. The lung wet to dry weight ratio in the endotoxin infused rat.

Fig. 6. The albumin concentration in the bronchoalveolar lavage fluids of endotoxin infused rat lung.

독소 대량투여후 12시간 후에 11.32로 제일 현저히 증가하였고(Fig. 5), 기관지 폐포세척액내 albumin 농도도 대조군 49 ug/ml에 비해 대량투여후 12시간에 1410 ug/ml로 최고치로 상승하였다(Fig. 6).

고 찰

성인 호흡곤란 증후군의 진단기준에 심부전증이 아닌

원인에 의한 폐부종이 꼭 포함되어야 하는데 그러한 폐부종이 생기는 기전은 정상적으로 폐 모세혈관내의 수분의 이동을 방해하는 내피세포가 손상을 받기 때문이다. 성인 호흡곤란 증후군의 원인중에는 그람음성 세균에 의한 패혈증이 으뜸을 차지하며 내독소는 그람음성 세균의 구성물질로서 폐 내피세포에 독성 효과를 나타내어 생체 또는 실험실내에서 성인 호흡곤란 증후군과 유사한 조건을 나타낼 수 있다.

양(sheep)은 성인 호흡곤란 증후군의 실험모델로 많이 이용되고 있는데 E. coli 내독소를 정맥내 주사하면 1시간내에 폐동맥 고혈압과 기도저항의 증가, compliance의 감소등이 나타난다¹⁴⁻¹⁶⁾. 내독소 주입후 1시간내에 말초혈액에는 호중구가 감소하는 leukopenia가 나타나 수시간 동안 지속되는데¹⁷⁾ 저자들의 실험에서도 쥐에 내독소 1회 대량투여후 6시간 및 12시간에 시행한 기관지 폐포세척액에서도 호중구가 현저히 증가한 것으로 미루어 말초혈액에서는 leukopenia가 있었을 것으로 추정된다.

양에 내독소 주입후 나타나는 병태 생리학적 변화는 arachidonic acid 대사물과 관련이 있는데^{18,19)} 즉 1시간내에 폐의 임파액 및 혈장(plasma)에 cyclooxygenase 대사물인 thromboxane A₂와 prostacycline이 증가하며 이는 폐동맥 고혈압이 나타나는 시간과 일치한다²⁰⁾. 또한 arachidonic acid의 lipoxigenase 대사물인 5-HETE (hydroxyeicosatetraenoic acid), 12-HETE, LT (leucotriene)-C₄, D₄, E₄ 및 LT-B₄가 증가하는데^{1,20,21)} 특히 LT-B₄의 증가는 leukopenia의 시기와 일치하므로 LT-B₄가 말초혈액의 호중구를 폐로 이동시키는데 관여하였을 것으로 생각된다. 저자들의 실험에서 폐의 wet/dry 중량비는 내독소 대량투여후 12시간에 제일 증가하였는데 이는 그때 폐부종이 제일 현저하였음을 의미하며 이러한 폐부종은 meclofenamate나 indomethacin 같은 cyclooxygenase 억제제에 의하여 현저히 감소하므로^{14,21,22)} 폐부종 및 폐동맥 고혈압의 발생에 arachidonic acid의 cyclooxygenase 대사물이 관여하였을 것으로 추정된다.

내독소로 인한 폐부종 및 폐동맥 고혈압의 발생에 산소기(oxygen radical)가 관여한다는 직접적인 증거를 관찰하기는 힘들지만 N-acetylcysteine같은 oxygen radical scavenger를 투여하였을때 폐동맥 고혈압등의 소견이 현저히 경감되는 것으로 미루어²³⁾ 산소기가 중요

한 역할을 하리라고 생각된다. 증가된 산소기는 아마도 내독소에 의해서 폐로 이동되고 활성화된 호중구에서 주로 분비하며²⁴⁾ 활성화된 폐포 대식세포에서도 분비하는 것도 일부 관여하리라고 생각된다. 실험실내에서 소량의 세균성 내독소(lipopolysaccharide)는 인체의 단핵구나 대식세포^{25,26)} 또는 호중구²⁷⁾를 prime시켜 phorbol myristate acetate (PMA)나 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP)등으로 자극하였을 때 superoxide나 hydrogen peroxide의 생성이 증가된다. 혈청내에 증가된 superoxide는 호중구의 유주인자(chemotactic factor)로도 작용하여 호중구에 의한 조직손상을 촉진시키며^{28,29)} superoxide와 H₂O₂도 조직에 독성을 나타내지만 이들 둘이 Haber-Weiss 반응으로 만들어낸 hydroxy radical (OH^{*})이 더욱 독성이 현저하며 이러한 산소기가 폐내에 많이 만들어지면 모세혈관 내피세포가 일차적인 목표가 되어 손상을 받으므로³⁰⁾ 폐부종이 발생하는 것으로 알려져 있다.

생체내에는 산소기의 조직손상을 막기 위하여 여러가지 항산화효소가 존재하는데 그중 대표적인 것이 SOD, catalase, GSH-Px등이다. SOD는 두가지 형태로 존재하며 mitochondria내에 있는 것은 Mn을 함유하고 세포질내의 것은 Cu, Zn을 함유한다. SOD는 두 분자의 superoxide를 수소이온과 반응시켜 H₂O₂로 변환시키고 catalase와 GSH-Px는 H₂O₂를 분해한다. 따라서 이들 항산화효소가 증가되면 산소기에 의한 조직손상을 막거나 경감시킬 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 쥐에 저농도(10%)의 산소를 투여하고 그후 고농도의 산소를 준 경우 고농도의 산소에 의한 사망율이 현저히 감소하였는데 이는 저농도의 산소에 의해서 SOD, catalase, GSH-Px가 증가한 때문이었다^{31,32)}.

내독소에 의해서 폐조직내 산소기가 많이 만들어진 경우 항산화효소의 변화에 대해서는 이론이 많다. Kubo들³³⁾은 양(sheep)에 100% 산소를 투여하거나 대장균 내독소를 정맥주사한 경우 Mn SOD는 증가하나 Cu, Zn SOD는 증가하지 않음을 관찰하였다. 반면에 Hass들⁵⁾은 쥐에 내독소를 주입하고 95% 이상의 산소를 투여시 Cu, Zn SOD의 생성이 증가되나 내독소만 단독으로 투여시는 그러한 현상을 관찰할 수 없다고 하였다. Jenkinson들¹⁰⁾은 selenium이 결핍된 쥐에 소량의 내독소를 매일 복강내에 주입하면서 고농도의 산소에 노출시켰을때 selenium의 감소로 인해 GSH-Px의 농도도 현

저히 낮았고 SOD 및 catalase도 증가되지 않았으나 사망률은 현저히 감소하는 것을 관찰하여 SOD, catalase, GSH-Px 이외의 다른 어떠한 기전에 의해서 고농도의 산소에 의한 사망률이 감소되는 것으로 발표하였다.

반면에 Frank 등⁷⁾은 쥐에 내독소로 전처치후 고농도의 산소에 72시간 노출시켰을 때 전처치하지 않은 군에 비하여 사망률이 현저히 감소하였고 그들의 폐조직내에서는 SOD, catalase, GSH-Px가 증가되어 있음을 관찰하였다.

저자들은 쥐에 내독소를 대량(7 mg/kg) 1회 투여하여 ARDS를 만들었을 때와 소량(1 mg/kg)을 1주일간 반복 투여후에 폐조직내 항산화효소의 변동을 관찰하여 보았다. 대량투여군에서는 약 40%의 치사율을 보였으며 소량 반복투여군에서는 사망한 쥐는 없었는데, 그 결과 당초 예상과는 달리 CuZn SOD는 내독소 대량 1회 투여후 6시간 및 12시간에 현저히 감소하다가 24시간후에는 정상치로 회복하였고 소량 반복투여후 3일, 7일, 10일에는 대조군에 비하여 감소되어 있지만 유의한 차이는 없었다. 그밖에 Mn SOD, catalase, GSH-Px는 대량 및 소량투여군 모두에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다. 즉 본 실험에서는 내독소를 대량 치사량을 투여하였을 때 항산화효소중 특히 Cu, Zn SOD의 감소가 현저함이 특징할만한 사항이었다. 이러한 현상은 아마도 내독소에 의해서 Hageman 인자가 활성화되어 범발성 혈관 내 응고 증(disseminated intravascular coagulation)이 일어나 세포막이 손상되거나 내독소에 의해서 보체가 활성화되어 호중구가 모세혈관벽에 모여있다가 모세혈관벽의 손상으로 폐포로의 이동이 증가되고 활성화된 호중구에서 분비하는 lysosomal enzyme, 산소기 등에 의해 폐의 세포가 손상을 받아 세포질에 풍부히 존재하는 Cu, Zn SOD가 감소된 것으로 추정된다.

저자들의 실험과 유사한 결과를 얻은 논문으로 Iqbal 등³⁴⁾은 쥐에 내독소를 투여후 폐조직내 Cu, Zn SOD의 양이 감소되어 있었으나 그때 Cu, Zn SOD mRNA의 양은 증가되어 있음을 관찰하여 내독소가 Cu, Zn SOD mRNA의 양은 증가시키나 translation 단계를 방해하여 Cu, Zn SOD의 양이 감소한 것으로 설명하였고, 지속적으로 Cu, Zn SOD mRNA가 증가되어 Cu, Zn SOD의 양이 많아진 경우는 내독소 투여후 95% 이상의 산소를 72시간 투여한 경우에만 볼 수 있었다고 하였다.

본 실험에서는 내독소 투여후의 Cu, Zn SOD를 포함

한 항산화효소의 mRNA의 양은 측정하지 못하였으나 앞으로 이들 mRNA의 변화도 측정하고 또 SOD를 포함한 항산화효소를 증가시켰을 때 폐조직 손상이 감소될 수 있는지에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : 그람 음성균의 내독소는 ARDS를 유발하는 제일 흔한 원인으로 알려져 있으며 그 기전중에 내독소에 의해서 폐로의 유입이 증가되고 활성화된 호중구에서 분비하는 산소기가 증가하여 모세혈관 내피세포등에 손상을 입히기 때문이라는 설이 유력하다. 그러한 증가된 산소기를 처리하는 항산화효소가 내독소를 대량 투여하거나 소량 반복투여시 어떻게 변화하는지 알아보고자 본 실험을 하였다.

방법 : 250~300 g 되는 쥐에 내독소 대량투여군은 7 mg/kg body weight로 내독소를 1회 복강내 주사하였고 소량 반복투여군은 1 mg/kg body weight로 10일간 매일 복강내 주사하였다. 대량투여군은 주사후 6, 12, 24시간후에, 소량 반복투여군은 주사후 3, 7, 10일에 각각 기관지 폐포세척술을 시행하고 살해하였다. 폐동맥을 통하여 생리 식염수를 주입하여 적혈구를 제거한후 양측 폐를 들어내고 무게를 잰후 무게의 5배되는 용량의 50 mM potassium phosphate 완충액 하에 3분간 homogenize시켰다. 이들 4°C에서 60분간 100,000 g의 속도로 원심분리하여 상층액을 -70°에 보관하였다가 Cu, Zn SOD, Mn SOD, catalase, GSH-Px와 albumin 농도를 측정하였다.

결과 :

1) 폐의 wet/dry 무게비 및 기관지 폐포세척액내 albumin 농도는 내독소 대량투여후 12시간에 최고로 증가하였고 기관지 폐포세척액내 호중구는 내독소 대량투여후 6시간에 최고로 증가하였다.

2) Cu, Zn SOD (IU/mg protein)는 대조군(66.7±26.3)에 비해 대량투여군에서 6시간후(21.86±5.79)와 12시간후(31.96±9.54)에 각각 유의있는 감소를 나타냈으며 소량 반복투여군에서는 큰 변화가 없었다.

3) Mn SOD, catalase, GSH-Px의 양은 대량 또는 소량투여군 모두에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다.

결론 : 내독소를 대량투여시 급성 폐부종의 소견과 함께 폐조직내 Cu, Zn SOD가 6시간 및 12시간후에 현저

히 감소함을 관찰할 수 있었는데 이러한 현상은 내독소에 의해서 폐의 세포가 손상을 받은 때문으로 생각된다. 따라서 SOD를 외부에서 보충해주거나 폐내에서 합성을 증가시키는 방법으로 급성 폐손상의 진행을 막을수 있는 지에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Ogletree ML, Oates JA, Brigham KL, Hubbard WC: Evidence for pulmonary release of 5-HETE during endotoxemia in sheep. *Prostaglandins* **23**:459, 1982
- Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, Gajdusek CM, Schwartz CM, Striker GE: Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest* **48**:269, 1983
- Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA: Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* **69**:1126, 1982
- Varini J, Fligiel SEG, Till GO, Kunkel RG, Ryna US, Ward PA: Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils: possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest* **6**:656, 1985
- Hass MA, Frank L, Massaro D: The effect of bacterial endotoxin on synthesis of (Cu, Zn) superoxide dismutase in lungs of oxygen-exposed rats. *J Biol Chem* **257**:9379, 1982
- Crapo JD, Tierney DF: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* **226**:1401, 1974
- Frank L, Yam J, Roberts RJ: The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen-induced lung toxicity. *J Clin Invest* **61**:269, 1978
- Frank L, Summerville J, Massaro D: Protection from oxygen toxicity with endotoxin: Role of endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J Clin Invest* **65**:1104, 1980
- Frank L, Roberts RJ: Endotoxin protection against oxygen-induced acute and chronic lung injury. *J Appl Physiol* **47**:577, 1979
- Jenkinson SG, Long RJ, Lawrence RA: Endotoxin protects selenium-deficient rats from hyperoxia. *J Lab Clin Med* **103**:143, 1984.
- Salin ML, McCord JM: Superoxide dismutase in polymorphonuclear leucocytes. *J Clin Invest* **54**:1005, 1974
- Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**:121, 1984
- Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**:158, 1967
- Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Loyd JE, Lucht WD, Meyrick B, Newman JH, Niedermeyer ME, Ogletree ML, Sheller J, Snapper JR: Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* **3**:719, 1983
- Brigham KL, Bowers R, Haynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* **45**:292, 1979
- Snapper JR, Hinson JM, Hutchinson AA, Lefferts PL, Ogletree ML, Brigham KL: Effects of platelet depletion on the unanesthetized sheep's pulmonary response to endotoxemia. *J Clin Invest* **74**:1782, 1984
- Snapper JR, Bernard GR, Hinson JM, Hutchinson AA, Loyd JE, Ogletree ML, Brigham KL: Endotoxemia-induced leukopenia in sheep. Correlation with lung vascular permeability and hypoxemia but not with pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* **127**:306, 1983
- Brigham KL: Metabolites of arachnoidic acid in experimental lung vascular injury. *Federation Proc* **44**:43, 1985
- Brigham K, Duke S: Prostaglandin and lung disease: adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Med* **7**:11, 1985
- Ogletree ML, Begley CJ, King G, Brigham KL: Influence of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory agents on accumulation of arachnoidic acid metabolites in plasma and lung lymph after endotoxemia in awake sheep. Measurement of prostacyclin and thromboxane metabolites and 12-HETE. *Am Rev Respir Dis* **133**:55, 1986
- Snapper JR, Hutchinson AA, Ogletree ML, Brigham KL: Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanesthetized sheep. *J Clin Invest* **72**:63, 1983
- Begley CJ, Ogletree ML, Meyrick BO, Brigham KL: Modification of pulmonary responses to endotoxemia in awake sheep by steroidal and nonsteroidal antiinflammatory agents. *Am Rev Respir Dis* **130**:1140, 1984
- Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL: Effects of N-acetylcysteine on the pulmonary response to en-

- dotoxin in awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J Clin Invest* **73**:1772, 1984
- 24) Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak M, Johnson RB, Henson PM: Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* **119**:101, 1985
- 25) Pabst MJ, Johnston RB: Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med* **151**:101, 1980
- 26) Pabst MJ, Hedegaard HB, Johnston RB: Cultured human monocytes require exposure to bacterial products to maintain an optimal oxygen radical response. *J Immunol* **128**:123, 1982
- 27) Lindsay A, Guthrie A, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB: Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **160**:1656, 1984
- 28) McCord JM, Wong K: Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. *Ciba Found Symp* **65**:343, 1979
- 29) McCord JM, Wong K, Strokes S, Petrone W, English D: Superoxide and inflammation: a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand Suppl* **492**:25, 1980
- 30) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**:412, 1982
- 31) Frank L: Protection from O₂ toxicity by preexposure to hypoxia: lung antioxidant enzyme role. *J Appl Physiol* **53**:475, 1982
- 32) Paegle RD, Bernhard WN, Turndore H: Intermittent exposure to 40 percent oxygen prolongs rat survival in 100 percent oxygen. *Anesth Analg* **56**:847, 1977
- 33) Kubo K, Shiki Y, Kobayashi T, King LS, Newman JH, Burr I: Induction of manganese but not copper zinc superoxide dismutase by 100% oxygen or endotoxin in sheep lungs. *Am Rev Respir Dis* **135**:A12, 1987
- 34) Iqbal J, Clerch LB, Hass MA, Frank L, Massaro D: Endotoxin increases lung Cu, Zn superoxide dismutase mRNA: O₂ raises enzyme synthesis. *Am J Physiol* **257**:L61, 1989
-