

내독소에 의한 돼지의 급성 폐손상에서 산소기의 역할에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

김영환 · 유철규 · 정기호 · 최형석 · 이혁표
한성구 · 심영수 · 김건열 · 한용철

= Abstract =

The Role of Reactive Oxygen Free Radical in the Pathogenetic Mechanism of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Domestic Pigs

Young Whan Kim, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Ki Ho Jeong, M.D., Hyung Seok Choi, M.D.
Hyuk Pyo Lee, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.
Keun Youl Kim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

To identify the pathogenetic role of reactive oxygen free radical-induced oxidation reaction in endotoxin-induced acute lung injury, we infused endotoxin into 8 domestic pigs; endotoxin only (n=3), pretreatment with dimethylthiourea (DMTU) (n=5). We observed the sequential changes in hemodynamic parameters, the concentration of plasma oxidized glutathione (GSSG) in pulmonary arterial and venous blood, and albumin content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

The results were as follows.

- 1) While cardiac output decreased, mean pulmonary arterial pressure, pulmonary vascular resistance, and alveolar-arterial oxygen difference increased over phase 1 (0-2 hr) and phase 2 (2-4.5 hr) by endotoxin, DMTU attenuated the above changes only during phase 2.
- 2) While the concentration of plasma GSSG increased significantly by endotoxin during phase 2, there were no significant differences between pulmonary arterial and venous GSSG contents during both phases. The increase in plasma GSSG content was attenuated by DMTU.
- 3) The content of BALF albumin was significantly lower in DMTU group than that of endotoxin group.

These results suggest that reactive oxygen free radical-induced oxidation reaction may have an important pathogenetic role in endotoxin-induced acute lung injury in pigs, which seems to be greater during phase 2 rather than phase 1.

서 론

성인호흡곤란증후군은 다양한 원인에 의해 급격히 발

본 연구는 1991년 서울대학교병원 특진연구비의 보조로 이루어 졌음.

생하는 폐부종으로 심인성 폐부종이 폐모세혈관압의 상승에 의한 것과는 달리 폐모세혈관 투과성의 증가에 의해 발생한다고 알려져 있다. Ashbaugh등이 성인호흡곤란증후군을 처음 기술한 이래¹⁾ 속(shock)에서의 소생술이 발전함에 따라 성인호흡곤란증후군은 임상에서 흔히 보는 질환중의 하나가 되었으나 기계호흡등 고식적 치료

의 비약적 발전에도 불구하고 아직도 높은 사망율을 유지하고 있는 것은^{2,3)} 폐혈관 투과성의 증가에 대한 기전이 자세히 밝혀져 있지 않아 이에 대한 특이적 치료법이 없기 때문이다. 오래전부터 급성 폐손상환자의 부검시 폐혈관, 폐간질 및 폐포내에 많은 호중구의 침윤이 관찰되었고⁴⁻⁶⁾, 성인호흡곤란증후군 환자의 기관지폐포세척액에서 호중구와 호중구의 과립내에 존재하는 엘라스타제(elastase)가 급성 폐손상의 초기에 증가됨이 관찰되어⁷⁻⁹⁾, 급성 폐손상의 병인론에 호중구가 관여한다는 사실을 시사해 주고 있다. 양의 폐-림프 누공모델(lung-lymph fistula model)에서 Gram 음성균을 투여하거나 미세색전증(microembolism)을 일으키면 폐혈관의 투과성 증가를 관찰할 수 있는데, 혈액내의 호중구를 제거하면 폐부종이 감소되어 투과성의 증가에는 반드시 호중구가 필요함을 시사하고 있다¹⁰⁻¹³⁾. 양이외의 다른 동물을 이용한 실험에서도 비슷한 결과가 관찰된다¹⁴⁾. 과산소증도 폐혈관 투과성 증가에 의한 폐부종과 호흡부전을 일으키는데 토끼에서 호중구 고갈후 과산소증에 의한 폐손상이 완화되고, 이 경우 남아있는 호중구의 숫자와 폐손상의 정도간에 밀접한 상관관계가 관찰되어 호중구가 폐손상에 관여함을 시사하고 있는 반면¹⁵⁾, 이와 상반된 결과도 알려져 있어^{16,17)} 과산소증에 의한 폐손상에서 호중구의 역할은 이점이 있는 실정이다. 이처럼 호중구 고갈의 효과에 차이를 보이는 것은, 급성 폐손상을 일으키는 원인마다 각각 다른 기전에 의해 폐손상이 야기되기 때문인지, 또는 호중구를 통한 공통적인 기전이 있으나 실험방법 및 사용된 실험동물의 차이 때문인지는 확실치가 않다. 그러나 심한 호중구 감소증이 있는 환자에서 발생한 성인호흡곤란증후군의 증례보고가 있어 인체내에서는 호중구가 관여하지 않는 다른 기전이 있을 가능성도 배제할 수 없다¹⁸⁻²²⁾. 호중구가 급성 폐손상을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 것은 분명하지만, 어떤 기전을 통해 호중구가 폐손상에 관여하는지는 확실히 규명되어 있지 않다. 호중구는 단백질 분해효소(proteases), arachidonate 대사물, 산소의 독성 환원물질(toxic reduced species of oxygen)인 산소기(reactive oxygen free radical) 등의 여러 독성 물질을 분비할 수 있다는 사실로부터 이런 독성 물질이 급성 폐손상에 관여할 가능성이 부각되었는데 최근에는 산소기에 대한 관심이 고조되고 있다. 토끼의 격리순환폐모델에서 xanthine oxidase와 glucose oxidase에 의해 생성된 산소기

에 의해 급성 폐손상이 생기고, hydroxyl radical 탐식제인 dimethylthiourea (이하 DMTU로 약함)가 PMA와 호중구 투여에 의한 폐부종을 감소시키며, 산소기 형성이 불가능한 만성 육종성 질환(chronic granulomatous disease) 환자의 호중구와 PMA 투여시는 폐손상이 생기지 않는다는 사실은 급성 폐손상에서 산소기의 중요한 역할을 강력히 시사하는 소견이다^{23,24)}. 이와같이 급성 폐손상을 일으키는 여러 원인에서 산소기가 직접 투과성 증가에 의한 폐부종을 일으키는 것으로 알려져 있으나 임상에서 자주 문제가 되는 성인호흡곤란증후군의 가장 흔한 원인인 Gram 음성균에 의한 폐혈중에서의 역할은 확실히 규명되어 있지 못한 실정이다^{25,26)}. 폐혈중에 의한 성인호흡곤란증후군에서 산소기의 역할을 규명하는 것은 특이적 치료법의 개발이 시급한 현 시점에서 중요한 과제라 하겠다. 산소기는 체내에서 강력한 산화작용을 통해 조직손상을 초래하리라 생각되지만 이에 관한 연구는 미미한 실정이다. 내독소에 의한 급성 폐손상에서 혈액학적 변화와 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 대한 산소기의 역할을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 성에 관계없이 10~14주된 체중 20 Kg 내외의 집돼지를 서울대학교 병원 동물실험실에서 구입했고, 먹이와 물은 자유로이 먹을 수 있도록 공급하였다. 외견상 이상이 없었으며 실험직전에 동맥혈가스분석을 시행해 동맥혈산소분압이 80 mmHg 이상이고 동맥혈이산화탄소분압이 45 mmHg 이하인 동물만을 실험에 사용하였다.

2. 실험군

모두 8마리의 집돼지를 무작위로 2개의 실험군중 한군에 배정하였다. 제 1군(내독소 투여군: 3마리)은 *Escherichia coli* 055-B5 (Sigma Chemical) 내독소 5 μ g/Kg를 1시간동안 정맥내로 점적하고 그 후 3.5시간동안은 2 μ g/Kg/hour의 속도로 투여하였다. 제 2군(DMTU 전처치군: 5마리)은 DMTU 1g/Kg를 1:3의 용적비율로 생리식염수에 용해시켜 1~2 ml/min의 속도로 내독소 투여전 1시간동안 정맥내로 점적한 후 제

1군에서와 같이 내독소를 투여하였다.

3. 실험동물의 준비

Kg당 15 mg의 ketamine을 근육주사해 잠재운 후 25 mg/Kg의 pentobarbital sodium으로 마취를 유도하고 실험기간동안 5 mg/Kg/hour의 속도로 점적하여 마취 상태를 유지시켰다. 기관절개술로 기관내에 튜브를 삽관한 후 Bear II 인공호흡기를 이용해 실내공기로 기계호흡을 시켰다. 이때 호흡수는 분당 14~18회, 호흡량 (tidal volume)은 15 ml/Kg로 조정하였다. Atropine 0.5 mg을 주사해 기도내의 분비물생성을 억제하였으며 필요에 따라 간헐적으로 흡입 카테타로 분비물을 제거하였다. 또한 pancuronium bromide 2 mg을 정맥주사하여 자기호흡을 억제시켰고, 이 후 자기호흡이 관찰될때마다 1 mg을 간헐적으로 주사하였다. 양쪽 외경정맥 (external jugular vein)을 박리해 왼쪽에는 polyethylene관을 삽입하여 약제투여의 경로로 사용하였고, 반대 쪽에는 5-F triple-lumen Swan-Ganz 카테타(Edward Laboratories, USA)를 삽입해 카테타의 끝이 폐동맥에 위치하여 풍선을 팽창시키면 폐모세혈관쇄기압 (pulmonary capillary wedge pressure)이 기록되고 풍선의 공기를 제거하면 폐동맥압이 측정되도록 조절하였다. 좌측 총 경동맥 (common carotid artery)에도 polyethylene관을 삽입하였는데 이것과 Swan-Ganz카테타는 각각 압력변환기 (pressure transducer)에 연결하여 전신동맥압과 폐동맥압 및 폐모세혈관쇄기압을 측정하는데 사용하였다. 간헐적으로 heparin이 섞인 생리식염수를 주입하여 혈액응고로 카테타가 막히지 않도록 하였다. 두 압력변환기는 모두 좌심방 높이에서의 압력이 0이 되도록 조절하였다. 위의 준비과정이 완료되고 1 시간동안 실험동물을 안정시킨 후 각 군별로 실험을 진행했는데 실험기간동안 5% 포도당이 생리식염수를 7.5 ml/min의 속도로 점적하였다.

4. 혈액학적 지표의 측정

내독소 투여한 때를 0시간으로 하여 평균 전신동맥압, 평균 폐동맥압, 평균 폐모세혈관쇄기압과 심박출량을 30분 간격으로 측정하였다. 압력의 측정은 압력변환기에 Swan-Ganz 카테타와 polyethylene관을 연결하고 multichannel oscilloscopic recorder (Electronics for Medicine Inc., USA)를 이용해 측정하였다. 심박출량

은 cardiac output computer (Edward Laboratories, USA)로 열희석법 (thermodilution method)으로 매 30 분마다 측정하였는데 5번을 측정해 최고치와 최저치를 제외한 나머지 세 측정치의 평균을 사용해 측정에 따른 오차를 줄였다. 체중 차이에 의한 심박출량의 오차를 줄이기 위해 심박출량을 체중으로 나눈 것을 심계수로 정의하였다. 이상의 측정치들로부터 다음 공식에 의해 폐혈관저항을 구했다.

Pulmonary vascular resistance (PVR) = $(P_{pa} - P_{paw}) / CO$

P_{pa} ; mean pulmonary arterial pressure

P_{paw} ; mean pulmonary capillary wedge pressure

CO; cardiac output

5. 동맥혈가스분석과 일반혈액검사

30분 간격으로 동맥혈을 채취해 AVL 995 Automatic Blood Gas System (AVL Biomedical Inc., USA)을 이용해 pH, 이산화탄소분압, 산소분압을 측정하였다. 이로부터 폐포동맥간산소분압차를 공식에 의해 구했다.

$AaDO_2 = (760 - VP) \times FiO_2 - PaCO_2 / 0.8 - PaO_2$

$AaDO_2$; alveolar arterial oxygen difference

VP; vapor pressure (about 47)

FiO_2 ; oxygen concentration of inspired air (0.21)

또한 매 30분 간격으로 EDTA가들어있는 용기에 혈액을 채취하여 Sysmex CC-780 (TOA 사, 일본)으로 적혈구용적, 혈소판, 총백혈구를 측정하였다.

6. Glutathione의 측정

1시간 간격으로 전신동맥혈과 폐동맥혈을 채취해 각각 혈장내의 전체 glutathione (GSH/GSSG) 농도와 산화 glutathione (GSSG)의 농도를 Sies등의 방법으로²⁷⁾ 측정하였다. 자발적인 산화반응에 의해 환원 glutathione (GSH)이 GSSG로 자동산화되는 것을 막기 위해 가능한 한 혈액을 채취한 즉시 glutathione의 농도를 측정하였다.

1) GSH/GSSG의 측정

채취한 혈액 3 ml에 HClO₄와 EDTA를 섞어 각각의 농도가 2 M과 4 mM이 되도록 만든 용액 3 ml를 섞어 혈액내의 단백질성분을 응고시켰다. 5000 g의 속도로 5 분간 4°C에서 원심분리하여 밑에 가라앉은 단백질성분

을 제거하고 상청액 1 ml를 2 M KOH와 0.3 M N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) 용액으로 pH 7.4로 중화시켰다. pH를 7.0으로 맞춘 0.1 M의 potassium phosphate 완충용액에 EDTA를 첨가해 최종농도가 1 mM이 되도록 조절한 용액 1 ml, 검체 100 μ l, 0.5% sodium bicarbonate에 녹여 최종농도를 4 mg/ml로 맞춘 NADPH 50 μ l, 0.5% sodium bicarbonate에 용해시킨 1.5 mg/ml의 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 20 μ l와 0.1 M potassium phosphate 완충용액으로 6 unit/ml로 희석시킨 glutathione reductase 20 μ l를 25°C에서 혼합해 분광비색계(spectrophotometer)로 412 nm에서 1분 간격으로 15분간 흡광도의 변화를 기록하였다. 이때 검체대신 3차 증류수 100 μ l를 넣은 용액을 blank로 사용하였다. 15분간의 흡광도 변화곡선의 기울기를 이용해 표준농도곡선(standard curve)에서 농도를 구했다.

2) GSSG의 측정

혈액 3 ml와 동량의 2 M HClO₄와 4 mM EDTA를 섞어 5000 g의 속도로 5분간 4°C에서 원심분리한 후 밑에 가라앉은 단백질을 제거했다. 상청액 1 ml에 N-ethylmaleimide (NEM)의 최종농도가 50 mM이 되도록 NEM을 첨가해 GSH와 NEM을 결합시켜 GSH의 자동산화반응을 억제시켰다. 2 M KOH와 0.3 M MOPS 용액으로 pH를 6.2로 조절한 후 GSSG의 측정에 영향을 미칠 수 있는 GSH와 결합하고 남은 NEM을 QAE-25 Sephadex를 담은 유리관을 통과시켜 제거하였다. QAE-25 Sephadex 유리관은 pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액으로 부풀린 후 유리섬유(glass wool)를 다져 넣은 Pasteur pipet에 gel 1 ml를 부어서 만들었다. pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액 10 ml로 유리관을 씻어내고 NEM이 첨가된 검체 2 ml를 유리관의 위쪽에 조심스럽게 주입한 후 다시 pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액을 유리관에 부어 GSH와 결합하지 않은 NEM을 씻어내었다. 유리관으로부터 용액이 나오지 않은 것을 확인하고 pH 6.2의 0.25 M potassium phosphate 완충용액 4 ml를 부어 GSSG를 얻었다. column에서 받은 용액을 2 M KOH와 0.3 MOPS로 pH를 7.2로 조정하였다. pH를 7.0으로 맞춘 0.1 M의 potassium phosphate 완충액에 EDTA를 첨가해 최종농도가 1 mM이 되도록 조절한 용액 1 ml, 검체 100 μ l, 0.5% sodium

bicarbonate에 녹여 최종농도를 4 mg/ml로 맞춘 NADPH 50 μ l, 0.5% sodium bicarbonate에 용해시킨 1.5 mg/ml의 DTNB 20 μ l와 0.1 M potassium phosphate 완충용액으로 6 unit/ml로 희석시킨 glutathione reductase 20 μ l를 25°C에서 혼합한 후 분광비색계로 421 nm에서 흡광도의 변화를 1분간격으로 15분간 측정하였다. GSH/GSSG의 측정에서와 같이 기울기로 부터 농도를 구했다.

7. 기관지폐포세척액과 혈청 알부민농도의 측정

내독소를 투여하고 4.5시간이 경과한 후 실험동물을 pentobarbital sodium으로 희생시켰다. 흉골을 절개해 양측 흉벽을 제거한 후 심장과 폐를 체외로 적출하였다. 16-F Foley 카테타를 폐의 하엽에 삽입하고 양측에서 생리식염수 20 ml로 기관지폐포세척술을 시행하였다. 기관지폐포세척액을 2000 g의 속도로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 알부민측정 kit (Sigma Chemical, USA)을 이용해 bromcresol green으로 착색시켜 분광비색계로 628 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 공식으로 혈청과 기관지폐포세척액의 알부민 농도를 구했다.

$$\text{BALF albumin} = (A_{\text{sample}} / A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard}}$$

BALF albumin; albumin content in BAL fluid

A_{sample} ; absorbance of sample

A_{standard} ; absorbance of standard albumin solution

C_{standard} ; concentration of standard albumin solution

기관지폐포세척액내의 알부민농도와 혈청 알부민농도의 비를 구해 폐포와 모세혈관사이의 투과성계수(permeability index)로 사용하였다.

$$\text{PI} = \text{BALF albumin} / \text{Serum albumin}$$

PI; permeability index

Serum albumin; albumin content in serum

8. 유의성 검정

SPSSPC+ 통계 package를 이용해 유의성 검정을 시행했는데, 시간별로 각각 기저치와의 차이를 구한 후 군 전체의 비교에는 비모수검정법중 Kruskal-Wallis one-way ANOVA by ranks를 사용했고 유의한 차이를 보였던 항목만 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test로 차이를 보인 두 군을 확인했으며 각 군내의 시간경과에 따른 기저치와의 비교에는 Wilcoxon

Matched-pairs Signed-ranks Test를 사용했다.

결 과

1. 전신동맥압

내독소를 투여하고 약 1시간이 경과한 후부터 전신동맥압은 감소하기 시작했고 이후 실험기간동안 계속 기저치보다 유의하게 낮은 상태가 유지되었으며($p > 0.05$), 두 군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(data not shown).

2. 심계수

심계수는 내독소 투여 30분후 기저치에 비해 일시적으로 유의하게 감소했고($p < 0.05$) 그 후 회복돼 phase 1(0~2 hr)에서는 기저치와 유의한 차이를 보이지 않았지만($p > 0.05$) phase 2(2~4.5 hr)에서는 기저치에 비해 유의하게 점차 감소했다($p < 0.05$). DMTU 전처치군에서는 내독소투여군과 비교해 phase 2에서만 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 1).

3. 평균 폐동맥압

내독소 투여 후 평균 폐동맥압은 급격히 증가해 30분

후 최고치를 보였고 실험기간동안 기저치보다 계속 유의하게 높았다($p < 0.05$). DMTU로 전처치한 군에서도 평균 폐동맥압은 실험기간동안 기저치보다 높게 유지되었지만($p < 0.05$), phase 2에서는 내독소투여군과 비교해 평균 폐동맥압이 DMTU 전처치군에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 2).

4. 평균 폐모세혈관쇄기압

내독소 투여군과 DMTU 전처치군에서는 평균 폐모세혈관쇄기압이 30분후 급격히 증가했다가 다시 원상으로 회복되는 양상을 보였고 이 후에는 기저치 및 두 군간의 유의한 차이를 보이지 않았다(data not shown).

5. 폐혈관저항

내독소 투여군에서 폐혈관저항은 30분 후 일시적으로 증가했다가 약간 감소한 후 phase 2에 다시 증가하는 양상을 보였다. DMTU로 전처치한 군에서는 실험기간동안 기저치보다 폐혈관저항이 높게 유지되었고, phase 1에서는 내독소투여군과 DMTU로 전처치한 군 사이에 유의한 차이가 없었으나 phase 2에서는 내독소투여군과 비교해 평균 폐동맥압이 DMTU 전처치군에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 3).

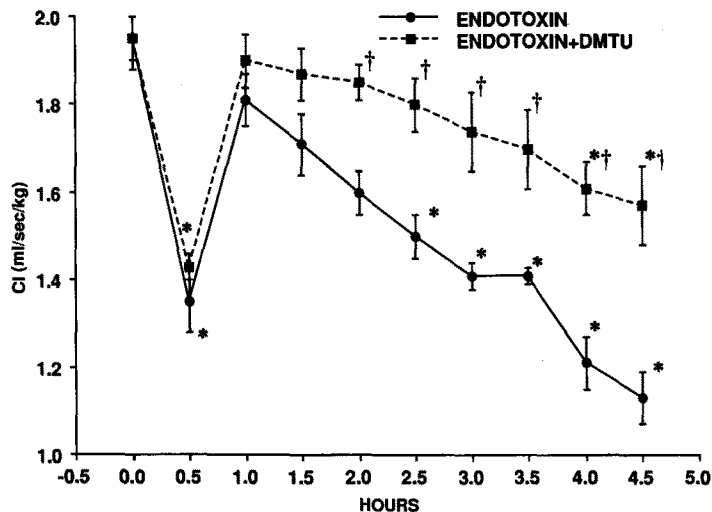


Fig. 1. Effects of endotoxin alone and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU) on cardiac index (CI).

Values are means \pm SE.

* $p < 0.05$ compared with baseline.

† $p < 0.05$ compared with endotoxin at respective time.

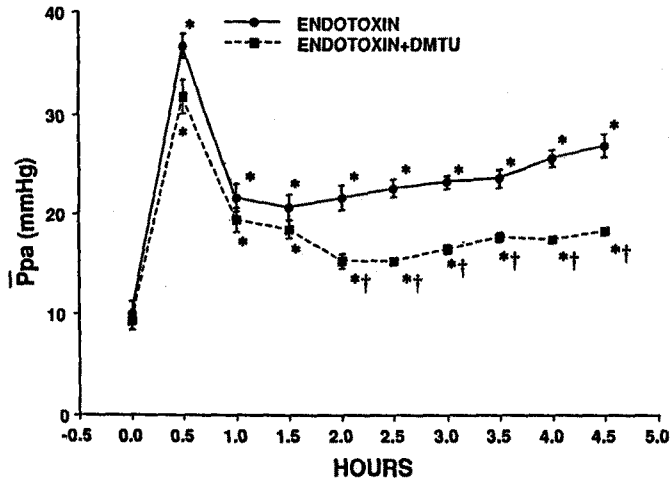


Fig. 2. Effects of endotoxin alone and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU) on mean pulmonary artery pressures ($\bar{P}pa$). Values are means \pm SE. * $p < 0.05$ compared with baseline. † $p < 0.05$ compared with endotoxin at respective time.

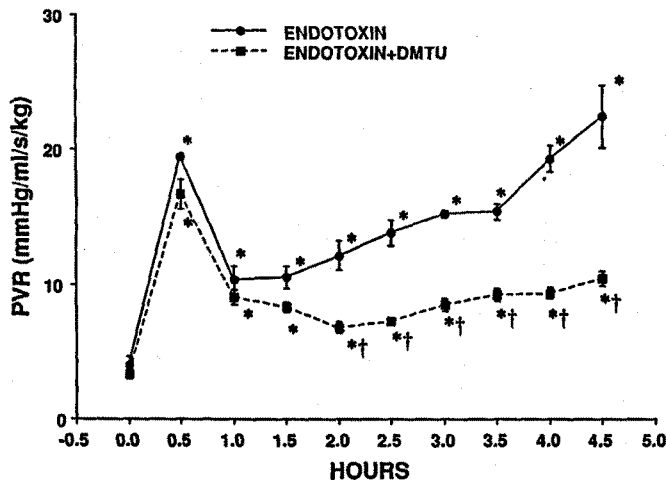


Fig. 3. Effects of endotoxin alone and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU) on pulmonary vascular resistance (PVR). Values are means \pm SE. * $p < 0.05$ compared with baseline. † $p < 0.05$ compared with endotoxin at respective time.

6. 동맥혈산소분압

동맥혈산소분압은 내독소 투여 30분만에 감소했다가 약간 증가한 후 다시 지속적으로 감소하는 양상을 보였는데 실험기간동안 기저치와 비교해 유의하게 낮은 상태

가 유지됐다($p < 0.05$). DMTU로 전처치한 군에서도 실험기간내내 기저치에 비해 감소되어 있었지만, phase 1에서는 내독소투여군과 DMTU로 전처치한 군 사이에 유의한 차이가 없었고 phase 2에서는 DMTU 전처치군의 동맥혈산소분압이 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Fig.

4).

차이를 보이지 않았다(data not shown).

7. 동맥혈이산화탄소분압

8. 폐포동맥간산분압차

동맥혈이산화탄소분압은 실험기간내내 두 군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았고 기저치에 비해서도 유의한

내독소 투여로 폐포동맥간산분압차는 30분에 증가했다가 1시간에 약간 감소한 후 다시 지속적으로 증가하

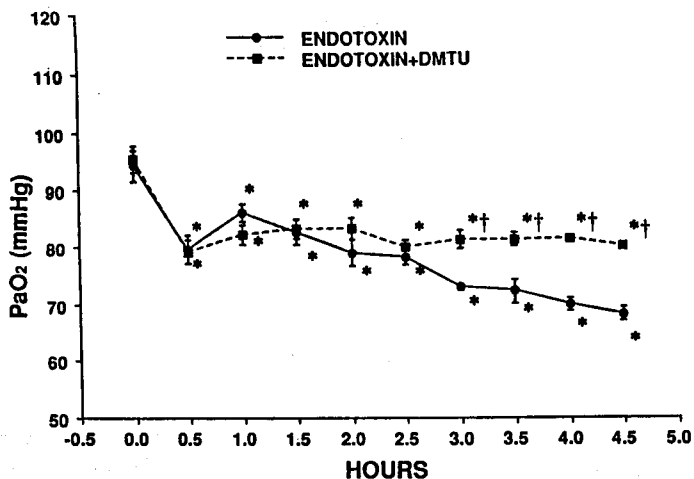


Fig. 4. Effects of endotoxin alone and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU) on arterial oxygen tension (PaO₂).

Values are means±SE.

*p<0.05 compared with baseline.

†p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

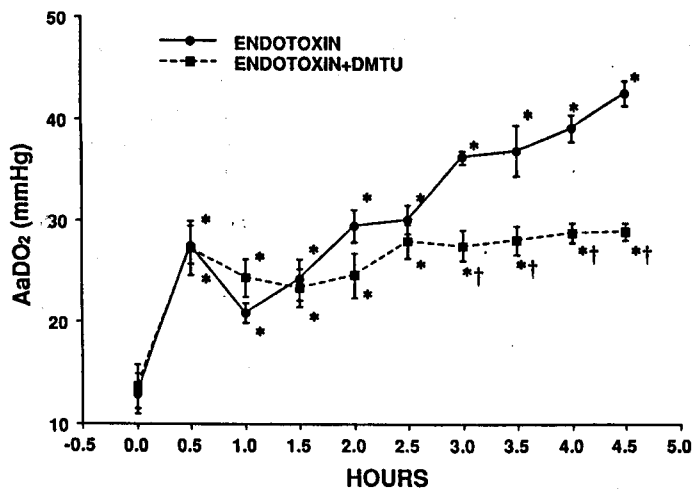


Fig. 5. Effects of endotoxin alone and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU) on the room air alveolar-arterial O₂ gradient (AaDO₂).

Values are means±SE.

*p<0.05 compared with baseline.

†p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

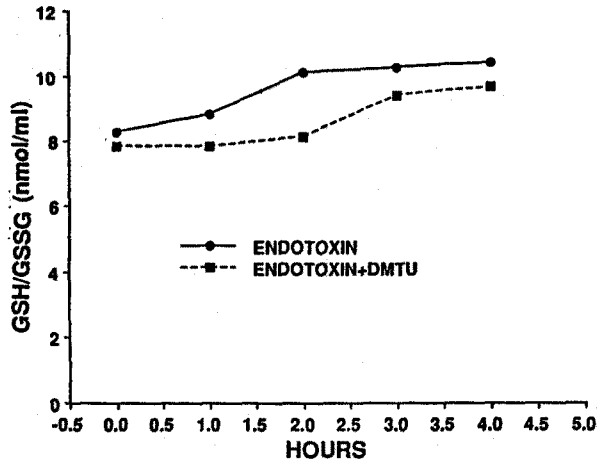


Fig. 6. Changes of plasma total glutathione (GSH/GSSG) in endotoxin and endotoxin+dimehtylthiourea (DMTU)-treated pigs. Values are means. $p > 0.05$ between groups at respective time.

는 양상을 보였는데 실험기간동안 기저치에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$). DMTU로 전처치한 군에서는 실험기간동안 기저치에 비해 증가되어 있었고 phase 1에서는 내독소투여군과 DMTU로 전처치한 군 사이에 유의한 차이가 없었지만($p > 0.05$) phase 2에서는 내독소투여군과 비교해 DMTU 전처치군의 폐포동맥간산소분압차가 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 5).

9. 말초혈액내 백혈구수

두 군 모두에서 말초혈액내 백혈구수는 급격히 감소되어 30분후부터 기저치와 비교해 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), 1시간에는 기저치의 1/3수준까지 저하되었고 이 후에는 큰 변화없이 유지되었다. 두 군간에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(data not shown).

10. 말초혈액내 혈소판수

세군 모두에서 말초혈액내혈소판수는 시간이 경과하면서 지속적으로 감소하는 양상을 보였는데 1시간후부터 기저치와 비교해 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), 두 군간에는 유의한 차이가 없었다(data not shown).

11. 혈장내 GSH/GSSG

두 군 모두에서 혈장내 GSH/GSSG는 시간이 경과하면서 증가하는 양상을 보였으나 기저치와 통계적으로 유

Table 1. Concentrations of Oxidized Glutathione (nmol/ml) of Arterial and Venous Blood in Endotoxin-Treated Group

Time (hr)	Artery	Vein
0	0.41 ± 0.21	0.38 ± 0.15
1	0.49 ± 0.26	0.42 ± 0.19
2	0.92 ± 0.24*	0.95 ± 0.21*
3	1.02 ± 0.32*	0.99 ± 0.25*
4	1.05 ± 0.27*	1.08 ± 0.23*

Values are mean ± SE.

* $p < 0.05$ compared with basal value (time 0)

There is no significant difference between artery & vein ($p > 0.05$).

의한 차이는 보이지 않았고($p > 0.05$), 두 군간에도 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 6).

12. 혈장내 GSSG

내독소 투여군에서 폐동정맥간의 농도 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$) (Table 1). 내독소 투여군의 혈장내 GSSG는 phase 2에서 기저치에 비해 유의하게 증가하였고($p < 0.05$) DMTU 전처치군에서는 phase 2의 GSSG가 내독소투여군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 7).

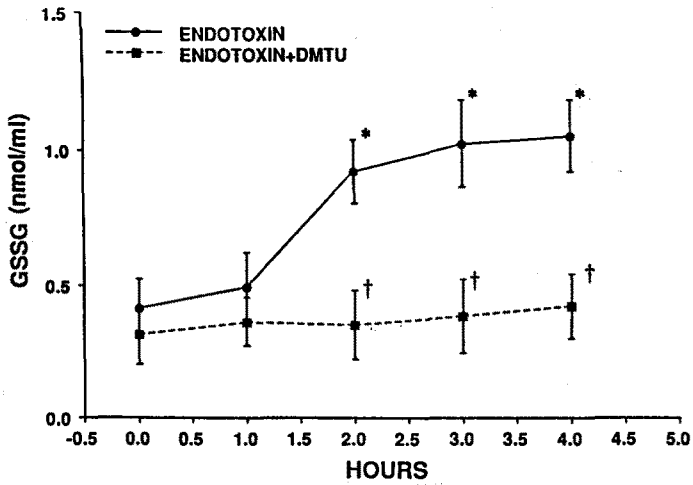


Fig. 7. Changes of plasma oxidized glutathione (GSSG) in endotoxin- and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU)-treated pigs. Values are means±SE. *p<0.05 compared with baseline. †p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

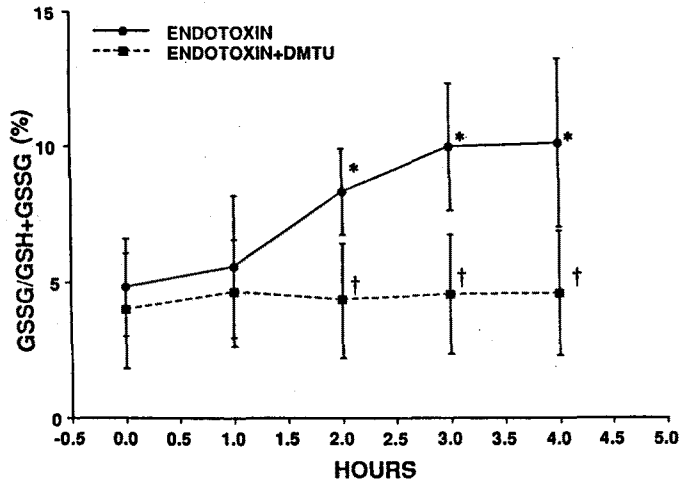


Fig. 8. Changes of plasma oxidized glutathione-to-total glutathione ratio (GSSG/GSH+GSSG) in endotoxin- and endotoxin+dimethylthiourea (DMTU)-treated pigs. Values are means±SE. *p<0.05 compared with baseline. †p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

13. GSSG와 GSH/GSSG의 비

내독소 투여군에서는 phase 2에서 기저치에 비해 유의하게 증가되었고 (p<0.05) DMTU 전처치군에서는 GSSG와 GSH/GSSG의 비가 내독소투여군에 비해 유

의하게 낮았다 (p<0.05) (Fig. 8).

14. 기관지폐포세척액의 알부민농도와 투과성계수

기관지폐포세척액의 알부민농도와 폐포와 모세혈관사

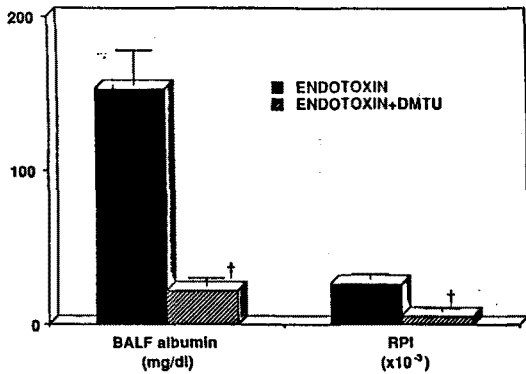


Fig. 9. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) albumin content (left) and relative permeability index (RPI) (right) in endotoxin- and endotoxin+ dimehtylthiourea (DMTU)-treated pigs. Values are mean \pm SE. $\uparrow p < 0.05$ compared with endotoxin.

이의 투과성계수는 내독소투여군에 비해 DMTU 전처치군에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 9).

고 찰

실험동물의 종류에 따라 내독소에 대한 예민도는 차이를 보인다고 한다. 즉, 양, 돼지, 염소, 고양이등은 소량의 내독소에도 민감한 반응을 보이는 반면 백서, 마우스, 원숭이, 개, 토끼등은 내독소에 대해 비교적 저항을 보인다고 알려져 있다. 이런 차이의 원인은 정확히 알려져 있지 않지만 근년에 밝혀진 폐혈관내 대식세포의 유무와 관련이 있을 것으로 생각된다. 즉, 내독소에 민감한 반응을 보이는 실험동물에서는 폐혈관내 대식세포가 관찰되지만, 내독소에 민감한 반응을 보이지 않는 실험동물에서는 폐혈관내 대식세포가 관찰되지 않아 외부에서 체내로 들어간 내독소가 폐혈관내 대식세포의 도움을 받아 급성 폐손상을 일으키는 것으로 생각되고 있다²⁸⁾. 체외로부터의 이물질이 폐혈관내 대식세포의 의해 탐식되고, 폐혈관내 대식세포에서 여러 염증매개성 물질이 분비된다는 사실이 이를 뒷받침하고 있다²⁹⁻³¹⁾. 본 실험도중 내독소를 μg 단위로 소량 투여했는데도 5마리가 내독소를 투여하고 2~3시간만에 극심한 혈압강하로 사망해 돼지가 내독소에 극히 예민함을 보여주고 있다. 돼지는 소량의 내독소로도 인체의 성인호흡곤란 증후군과 비슷한 병태생리학적 변화를 보이고 또한 몸체

가 커서 직접 혈력학적 지표를 측정할 수 있는 장점이 있어 본 실험에서 집돼지를 실험동물로 사용했다.

실험동물에 Gram 음성균의 내독소를 주입하면 성인 호흡곤란증후군과 유사한 병태생리학적 변화가 관찰되는데, 이는 양의 폐-림프 누공 모델에서 잘 알려져 있다. 이 경우 시간에 따른 폐의 구조적, 기능적 변화는 크게 두 단계로 나누어 지는데, 초기 단계(Phase 1, 0-2 hr)에서는 폐동맥압의 상승, 기도저항, 폐유순도의 감소, 심박출량의 감소, 저산소혈증과 단백질함량이 낮은 림프유량의 증가를 보인다. 시간이 경과함에 따라(Phase 2, 2-4.5 hr) 폐동맥압은 점차 감소하는 반면에 폐혈관의 투과성이 증가하여 단백질 함량이 높은 림프유량의 증가가 주로 관찰된다^{32,33)}. 본 연구에서도 내독소 투여로 같은 현상이 관찰되었다. 폐혈증의 경우 SOD 투여에 의해 폐혈관의 투과성 증가가 약화되고 catalase로 투과성 증가와 초기의 혈액학적 변화가 모두 완화되는데, SOD가 superoxide로부터 hydrogen peroxide와 hydroxyl radical의 형성을 촉진하는 사실을 감안하면 폐혈증에서 superoxide 자체보다는 hydrogen peroxide가 폐손상을 일으키는 주된 산소기일 것으로 추측된다^{34,35)}. 본 연구에서는 심계수의 감소, 평균 폐동맥압의 증가, 폐혈관저항의 증가, 동맥혈산소장력의 감소와 폐포동맥간산소분압차의 증가는 산소기 제거제인 DMTU에 의해 phase 1에서는 완화되지 않았으나 phase 2에서는 유의하게 완화되어 산소기가 phase 1보다는 phase 2에서 이런 지표들의 변화를 초래했을 가능성을 시사해 주고 있다. 그러나 DMTU로 위 지표들의 변화가 기저치와 같은 정도로 완전히 완화되지는 않아 산소기외의 다른 물질이 동시에 관여할 가능성도 배제할 수는 없다.

내독소 투여 후 호중구가 초기에 폐에 축적되고, 호중구 고갈로 인해 투과성 증가가 완화되는 사실은 폐혈증에서도 호중구가 중요한 병인론적 역할을 하고 있음을 시사하는 소견이며¹³⁾, N-acetylcysteine 투여시 내독소에 의한 모든 병태생리학적 변화가 완화되는데 이는 산소기 탐식작용에 의한 것으로 알려져 있어³⁶⁾ 폐혈증의 경우에도 호중구에서 분비되는 산소기가 폐손상에 중요한 역할을 하고 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서도 내독소 투여로 말초혈액내 백혈구와 혈소판이 감소했는데 이는 내독소에 의해 생성된 주화인자의 작용으로 폐 조직에 침윤된 결과로 알려져 있어³⁷⁻⁴⁰⁾ 이들이 폐손상에 관여한다는 간접적 증거라 할 수 있다. 백혈구는 내

독소 투여후 즉시 감소해 이후 비슷한 수를 유지하는 반면에 혈소판은 시간이 경과하면서 계속 감소하는 양상을 보였는데 본 실험으로 이 둘의 차이가 무엇을 의미하는지는 알 수가 없었다. 이러한 변화는 DMTU에 의해 영향을 받지 않아 산소기가 백혈구와 혈소판의 이동에는 관여하지 않을 것으로 생각된다.

호중구의외의 세포에서도 산소기가 생성될 수 있는 것으로 알려져 있다. 과산화염과 paraquat, 내독소 등은 호중구가 없는 조건하에 배양된 폐실질 세포의 손상을 일으키고 산소기 제거제에 의해 손상이 완화되어 산소기가 호중구에서만 생성되는 것이 아니고 다른 세포에서도 생성이 가능하다는 것을 시사하는 소견이다⁴¹⁻⁴⁶. 따라서 내독소에 의한 폐손상은 두단계의 과정, 즉 내피세포에서 형성된 산소기에 의해 폐조직의 손상이 시작되며, 활성화된 호중구, 폐포내 대식세포등의 염증세포로부터 분비되는 산소기가 이를 더욱 악화시키는 것으로 생각된다.

폐포와 폐모세혈관사이의 투과성 증가를 관찰하는 방법은 여러가지가 있다. 직접흉관에 카테타를 삽입해 폐 림프의 양과 단백질량을 측정하는 방법이 많이 사용되고 있는데⁴⁷, 이는 예민하고 지속적으로 투과성의 변화를 관찰할 수 있는 장점이 있지만, 수기가 복잡하고 어려워 성공률이 약 60%밖에 되지않는 단점이 있다. 알부민에 방사성 동위원소를 붙여 주사한 후 폐의 방사능을 측정해 폐혈관 투과성의 지표로 사용하는 방법도 예민한 장점을 가지고 있으나 특수장비가 필요하고 비용이 많이드는 단점이 있다. 폐를 떼어 즉시 측정할 무게와 3~4주간 고온의 오븐에서 완전히 말린 후의 무게간의 비율(wet to dry weight ratio)도 폐부종의 지표로 사용되는데 이는 시간이 많이 소요되고 폐이외의 조직이 남아 있을 경우 무게측정에 오차가 있을 수 있는 단점을 가지고 있다. 반면에 기관지폐포세척액의 알부민농도는 다른 방법에 비해 예민도가 낮은 단점이 있으나 측정이 간편하고 오차가 적으며 재현성이 있다는 장점이 있어 본 연구에서는 기관지폐포세척액의 알부민농도를 투과성 증가의 지표로 사용했다. 혈청내의 알부민농도에 따라 기관지폐포세척액의 알부민농도가 변할 가능성을 배제하기 위해 본 실험에서는 이 둘의 비를 구해 투과성계수로 사용하였다. DMTU가 내독소에 의한 폐혈관의 투과성 증가에 미치는 효과는 논란이 있는 상태이다. 즉 양의 폐-림프 누공 모델을 이용한 실험에서는 DMTU로

투과성의 증가가 완화되지 않았으나⁴⁸ 본 연구와 같이 폐지를 사용한 실험에서는 반대 결과가 보고되어 있다⁴⁹. 이런 차이는 실험에 사용된 동물의 종류에 기인하는 것일 가능성과함께, 투과성 증가의 지표로 사용한 방법의 차이에서 기인할 가능성도 있다. 즉, 폐-림프 누공 모델에서 고단백의 림프유량의 증가는 폐혈관 내피세포의 투과성 증가에 의하지만, 기관지폐포세척액의 알부민 농도증가는 폐포 상피세포의 투과성 증가를 반영하는 것을 생각되어, DMTU가 폐혈관 내피세포의 투과성 증가에는 영향을 미치지 않고 내독소에 의한 폐포 상피세포의 투과성 증가만을 완화시켜 이런 차이를 보일 가능성도 배제할 수 없을 것으로 생각되며 이것은 추시를 통해 확실히 규명해야할 것으로 여겨진다.

산소기는 필수 세포반응의 정상 산물로 형성되며 세포와 조직의 손상을 가져올 수 있고, 호기성 유기체(aerobic organism)는 이것으로부터 자신을 보호하는 기전을 보유하고 있다. 산소기는 대식세포내에서 균을 파괴하는 유익한 작용을 하는 반면에, 체내의 방어기전을 능가하는 다량의 산소기는 조직손상을 일으키는데, 폐는 고농도의 산소에 접하고 있는 환경적 요인때문에 항상 산소기에 의한 조직손상의 가능성에 노출되어 있는 장기이다. 체내에서 정상적인 대사반응의 부산물로 형성되는 산소기는 여러 방어기전에 의해 중화되고 있다. 그 중 가장 중요한 역할을 하는것이 세포내에 존재하는 glutathione이다. 세포내에서 glutathione은 거의 모두가 환원된 상태(이하 GSH로 약함)로 존재하며 hydrogen peroxide 나 lipid hydroperoxide 등과 반응하면 glutathione peroxidase에 의해 산화된 glutathione(이하 GSSG로 약함)으로 변환된다. 정상 상태에서는 세포내에서 GSSG의 형태로 존재할 수 없기 때문에 hexose monophosphate (HMP) shunt에서 생성된 NADPH의 도움을 받아 glutathione reductase에 의해 다시 GSH로 되돌아가고 일부는 세포밖으로 분비된다⁵⁰. 이렇게 재생된 GSH는 다시 세포의 항산화 방어 기전에 참여하게 된다. 따라서 체내에서 산화반응이 생기면 그 장기의 세포내에 GSSG가 축적되고 일부는 혈장으로 분비되어 장기와 혈장에서의 GSSG농도가 증가하게 되는데 이것은 산화반응에 의한 장기 손상의 유용한 지표가 된다. 예를 들면 과산화염에 노출되면 폐조직의 GSSG 농도가 증가되고 SOD와 catalase로 산소기의 산화반응을 억제하면 GSSG의 농도가 감소된다⁵¹.

혈장내의 GSH와 GSSG는 신장을 통해 신속히 배설되므로 혈장에서의 농도는 손상된 장기로부터 혈장으로 분비되는 속도에 의존하게 된다. 그러나 glutathione은 폐, 간, 신장등 여러 장기에서 생성이 가능하여 혈장에서의 증가된 농도만으로 glutathione이 생성된 장기를 알 수는 없으나, 각 장기에서의 동맥과 정맥의 농도차이를 관찰하면 알 수 있다⁵²⁾. 본 연구에서는 내독소 투여 후 폐동정맥간의 GSSG농도의 차이가 관찰되지 않아 혈장의 증가된 GSSG가 폐혈관의 내피세포로부터 분비된 것이라고 단정지을 수는 없으며 이는 폐순환에서와 같이 체순환의 혈관 내피세포에서도 내독소에 의해 GSSG의 분비가 일어나기 때문일 것으로 생각된다. 폐조직에서의 산화반응 유무를 밝히기 위해서는 폐조직의 GSSG 농도를 직접 측정해야 정확히 알 수 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 GSH는 공기와 접촉시 자동산화되거나 GSSG로 변하게 된다. 따라서 GSH의 자동산화를 막지 않으면 검체내의 GSSG농도가 실제로 훨씬 높게 측정된다. 본 실험에서는 이런 자동산화를 막기 위해 채취한 혈액을 즉시 강산인 2M HClO₄에 섞어 자동산화의 속도를 늦추고, 강산으로 추출한 검체에 NEM을 첨가해 GSH와 결합시켜 자동산화를 막았다. 또한 검체 채취 즉시 측정하였으므로 본 실험에서는 자동산화에 의한 효과를 극소화할 수 있었으리라 생각된다. GSH와 결합하고 남은 여분의 NEM은 GSSG의 측정에 오차를 가져올 수 있는데 이도 역시 QAE-25 Sephadex로 채운 유리관을 통과시켜 제거했기 때문에 여분의 NEM이 GSSG의 측정에 영향을 미치지 않았을 것으로 생각된다. 본 연구에서 내독소에 의해 혈장내 GSH/GSSG는 증가하지 않았으나 GSSG와 이의 GSH/GSSG에 대한 비율은 phase 2에서 유의하게 증가했고 DMTU전처치로 GSSG의 증가가 완화된 것은 DMTU로 혈액학적 지표가 주로 phase 2에서 완화되었다는 사실과 함께 산소기의 phase 2에서의 역할을 강력히 시사하는 증거라 하겠다.

산소기가 직접 세포독성을 보인다는 것은 이상과 같이 잘 알려진 사실이나 다른 간접적인 기전을 통해 조직손상의 악화를 가져올 수도 있다. 활성화된 호중구에서 분비되는 단백질 분해효소, 특히 엘라스타제는 폐손상을 일으킨다고 알려져 있다⁵³⁾. 이는 α -1 proteinase inhibitor (이하 α -1 PI로 약함)에 의해 중화되는데, 산소기가 호중구의 myeloperoxidase와 반응하여 형성되는

hypochlorous acid (HOCl)는 α -1 PI를 불활성화시켜 엘라스타제의 폐손상 작용을 증강시킨다고 알려져 있다^{54,55)}. 또 다른 간접 기전으로는 호중구에 대한 주화작용을 들 수 있다. 산소기와 혈장을 반응시키면 호중구에 대한 주화인자가 형성되는데, 이는 albumin에 결합된 지질(lipid)로 생각되나, 이 지질의 정확한 성상은 알려져 있지 않다⁵⁶⁾. 또한 arachidonate가 산소기에 노출될 때 주화인자가 형성된다고 한다⁵⁷⁾. 따라서 산소기는 직접 조직손상을 일으키는 효과와 함께 염증반응을 증폭시켜 조직손상을 더욱 악화시키는 간접 작용도 있을 것으로 생각된다.

결 론

산소기에 의한 체내의 산화반응이 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전에 관여하는지를 알아보기 위해 총 8마리의 집돼지를 대상으로 DMTU전처치가 내독소에 의한 급성 폐손상에 미치는 영향을 관찰해 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 내독소 투여 후 phase 1 (0-2 hr)과 phase 2 (2-4.5 hr)에 걸쳐서 심박출량은 감소되고 평균 폐동맥압, 폐혈관저항, 폐포동맥간산소분압차는 증가되었으며 DMTU전처치로 주로 phase 2의 변화가 완화되었다.
- 2) 내독소에 의한 말초혈액내의 백혈구와 혈소판의 감소 및 전신동맥압의 저하는 DMTU전처치로 완화되지 않았다.
- 3) phase 2에서 내독소에 의해 GSSG가 기저치에 비해 유의하게 증가했는데 이는 DMTU전처치로 완화되었으나 폐동정맥간의 GSSG농도는 유의한 차이가 없었다.
- 4) 기관지폐포세척액내 알부민농도와 투과성지표는 내독소 투여군에 비해 DMTU전처치군에서 유의하게 낮았다.

이상의 결과로 내독소에 의한 돼지의 급성 폐손상에는 산소기에 의한 산화반응이 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, phase 1 보다는 phase 2에서의 역할이 더 클 것으로 판단된다.

REFERENCES

- 1) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE:

- Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319, 1967
- 2) Stevens JH, Raffin TA: Adult respiratory distress syndrome I: Etiology and mechanisms. *Postgrad Med J* 60:305, 1984
 - 3) Modig J: Adult respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Acta Chir Scand* 152:241, 1986
 - 4) Ratliff NB, Wilson JW, Mikat E, Hackel DB, Graham TC: The lung in hemorrhagic shock: IV. the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Am J Pathol* 65:325, 1971
 - 5) Bachofen M, Weibel ER: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116:589, 1977
 - 6) Thurlbeck WM, Abell MR: *The lung: structure, function and disease.* p 43, Baltimore, Williams and Wilkins Company 1978
 - 7) Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 304:192, 1981
 - 8) McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, Cochrane CG: Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 69:543, 1982
 - 9) Fowler AA, Walchak S, Giclas PC, Henson PH, Hyers TM: Characterization of antiproteinase activity in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 81 (suppl):50S, 1982
 - 10) Brigham KL, Woolverton WC, Blake LH, Staub NC: Increased sheep lung vascular permeability caused by *Pseudomonas* bacteremia. *J Clin Invest* 54:792, 1974
 - 11) Brigham KL, Bowers RE, Haynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* 45:292, 1979
 - 12) Flick MR, Perel A, Staub NC: Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. *Circ Res* 48:344, 1981
 - 13) Heflin AC, Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68:1253, 1981
 - 14) Johnson A, Malik AB: Effect of granulocytopenia on extravascular lung water content after microembolization. *Am Rev Respir Dis* 122:561, 1980
 - 15) Shasby DM, Fox RB, Harada RN, Repine JE: Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J Appl Physiol* 52:1237, 1982
 - 16) Raj JU, Hazinski TA, Bland RD: Oxygen-induced lung microvascular injury in neutropenic rabbits and lambs. *J Appl Physiol* 58:921, 1985
 - 17) Winn R, Maunder R, Chi E, et al: Neutrophil depletion does not prevent lung edema following endotoxin infusion in goats. *J Appl Physiol* 62:116, 1987
 - 18) Braude S, Apperley J, Krausz T, et al: Adult respiratory distress syndrome after allogeneic bone marrow transplantation: evidence for a neutrophil-independent mechanism. *Lancet* 1:1239, 1985
 - 19) Rinaldo JE, Borovetz H: Deterioration of oxygenation and abnormal lung microvascular permeability during resolution of leukopenia in patients with diffuse lung injury. *Am Rev Respir Dis* 131:579, 1985
 - 20) Laufe MD, Simon RH, Flint A, et al: Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am J Med* 80:1022, 1986
 - 21) Maunder RJ, Hackman RC, Riff E, Albert RK, Springmeyer SC: Occurrence of the adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am Rev Respir Dis* 133:313, 1986
 - 22) Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE: Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 315:547, 1986
 - 23) Shasby DM, VanBenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE: Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate; role of oxygen free radicals. *Am Rev Respir Dis* 125:443, 1982
 - 24) Tate RM, VanBenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE: Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 126:802, 1982
 - 25) Newman JH: Sepsis and pulmonary edema. *Clin Chest Med* 6:371, 1985
 - 26) Rinaldo JE, Rogers R: Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 306:900, 1982
 - 27) Sies H, Akerboom TPM: Glutathione disulfide

- (GSSG) efflux from cells and tissues, In Packer L (Ed.) methods in enzymology, vol 105., p 445 Orlando Academic press 1984
- 28) Staub NC: The pulmonary intravascular macrophage. p 79, Mount Kisco, Futura Publishing Company 1989
 - 29) Warner AE, Molina RM, Brain JD: Uptake of blood-borne bacteria by pulmonary intravascular macrophages and consequent inflammatory responses in sheep. *Am Rev Respir Dis* **136**:683, 1987
 - 30) Warner AE, DeCamp MM Jr, Molina RM, Brain JD: Pulmonary removal of circulating endotoxin results in acute lung injury in sheep. *Lab Invest* **59**:219, 1988
 - 31) Bertram TA, Overby LH, Brody AR, Eling TE: Comparison of arachidonic acid metabolism by pulmonary intravascular and alveolar macrophages exposed to particulate and soluble stimuli. *Lab Invest* **61**:457, 1989
 - 32) Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Loyd JE, Lucht WD, Meyrick BO: Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* **3**:719, 1983
 - 33) Meyrick B, Brigham KL: Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep: Structure: Function relationships. *Lab Invest* **48**:458, 1983
 - 34) Traber DL, Adams T Jr, Sziebert L, Stein M, Traber L: Potentiation of lung vascular response to endotoxin by superoxide dismutase. *J Appl Physiol* **58**:1005, 1985
 - 35) Olson NC, Grizzle MK, Anderson DL: Effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase and catalase on endotoxemia in pigs. *J Appl Physiol* **63**: 1526, 1987
 - 36) Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL: Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J Clin Invest* **73**:1772, 1984
 - 37) Kazmierowski JA, Gallin JI, Reynolds HY: Mechanism for the inflammatory response in primate lungs: demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **59**:273, 1977
 - 38) Hunninghake GW, Gallin JI, Fauci AS: Immunologic reactivity of the lung: The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* **117**: 15, 1978
 - 39) Fox RB, Hoidal JR, Brown DM, Repine JE: Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes. *Am Rev Respir Dis* **123**:521, 1981
 - 40) Harada RN, Bowman CM, Fox RB, Repine JE: Alveolar macrophage secretions: inhibitors of inflammation in pulmonary oxygen toxicity. *Chest* **81**:52S, 1982
 - 41) Martin WJ, Gadek JE, Hunninghake GW, Crystal RG: Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J Clin Invest* **68**:1277, 1981
 - 42) Freeman BA, Crapo JD: Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* **256**:10986, 1981
 - 43) Freeman BA, Young SL, Crapo JD: Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* **258**:12534, 1983
 - 44) Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, Gajdusek CM, Schwartz SM, Striker GE: Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest* **48**:269, 1983
 - 45) Brigham KL, Meyrick B: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* **133**:913, 1986
 - 46) Meyrick BO, Ryan US, Brigham KL: Direct effects of E.coli endotoxin on structure and the endothelial layer of intimal implants. *Am J Pathol* **122**:140, 1986
 - 47) Staub N, Bland R, Brigham K, Demling R, Erdmann J, Wooverton W: Preparation of chronic lung lymph fistulas in sheep. *J Surg Res* **19**:315, 1975
 - 48) Wong C, Fox R, Demling RH: Effect of hydroxyl radical scavenging on endotoxin induced lung injury. *Surgery* **97**:300, 1985
 - 49) Olson NC, Anderson DL, Grizzle MK: Dimethylthiourea attenuates endotoxin-induced acute respiratory failure in pigs. *J Appl Physiol* **63**:2426, 1987
 - 50) Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* **16**:397, 1982
 - 51) White CW, Mimmack RF, Repine JE: Accumulation of lung tissue oxidized glutathione (GSSG) as a marker of oxidant induced lung injury. *Chest* **89**: 111S, 1986
 - 52) Adams JD Jr, Lauterburg BH, Mitchell JR: Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* **227**:749, 1983

- 53) Spragg RG, Lonky SA, Loomis WH, Marsh J, Abraham JL: Human neutrophil elastase causes acute high permeability edema in the isolated perfused rabbit lung (abstract). *Am Rev Respir Dis* **125**: 276, 1982
- 54) Schraufstatter IU, Revak SD, Cochrane CG: Proteases and oxidants in experimental pulmonary inflammatory injury. *J Clin Invest* **73**:1175, 1984
- 55) Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**:365, 1989
- 56) Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM: Free radicals and inflammation: the superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **77**:1159, 1980
- 57) Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM: Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generating system. *Inflammation* **4**:313, 1980