

□ 원 저 □

## 백서폐포대식세포에서의 Superoxide 생산에 미치는 내독소 및 Verapamil의 영향

원자력병원 내과, 서울대학교의과대학 내과학교실\*

이 춘 택 · 김 건 열\*

= Abstract =

### Effects of Endotoxin and Verapamil on Superoxide Production by Rat Alveolar Macrophage

Choon-Taek Lee, M.D. and Keun Youl Kim, M.D.\*

Department of Internal Medicine, Korea Cancer Center Hospital and Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,\* Seoul, Korea

**Background:** Superoxide anion which was produced by macrophage and neutrophil has a defensive role to kill invasive microorganisms and also an injurious role to produce self lung damage.

Production of oxygen free radicals including superoxide is a main mechanism of acute lung injury caused by bacterial endotoxin. Endotoxin is known to activate alveolar macrophage to produce increased oxygen free radicals after the stimulation with various biological materials (priming effect). Calcium is a very important intracellular messenger in that cellular process of superoxide production.

**Method:** This experiment was performed to elucidate the effects of endotoxin and calcium on superoxide production by phorbol myristate acetate-stimulated alveolar macrophage and the effect of verapamil on priming effect of endotoxin.

**Results:**

1) Preincubation of macrophages with endotoxin (E. coli 055-B5) primed the cells to respond with increased superoxide production after the stimulation with PMA. Priming with endotoxin ( $10^{-1}$ ug/ml) produced a maximal enhancement of superoxide production (43%).

2) Verapamil could inhibit the superoxide production by PMA stimulated macrophage regardless of the presence of extracellular calcium. This means that the inhibitory effect of verapamil is caused by a mechanism independent of blocking calcium influx.

3) Verapamil could inhibit the priming effect of endotoxin on alveolar macrophage (from 30% increment to 13% increment) and could inhibit the superoxide production by PMA-stimulated macrophage preincubated with endotoxin.

**Conclusion:** We concluded that verapamil could inhibit the superoxide production by PMA-stimulated rat alveolar macrophage and also inhibit the priming effect of endotoxin on alveolar macrophage. These inhibitory effects of verapamil could be one of the mechanisms of verapamil effects on endotoxin induced lung injury.

**Key Words:** Alveolar macrophage, Superoxide, Endotoxin, Verapamil, Priming effect.

서 론

호흡기는 항상 외기와 접촉하면서 산소를 흡수하고 이

산화탄소를 배출한다. 따라서 호흡기는 외기에 포함된 여러 미생물 및 유해물질들과 항상 접촉하게 되어 신체를 보호하기 위한 방어기전이 필요하다. 여러가지 방어기전중 말초기관지와 폐포에서는 폐포대식세포(pulmo-

nary alveolar macrophage, PAM) 및 호중구(neutrophil)에 의한 식균작용이 중요역할을 한다. 그러나 폐포 대식세포 및 호중구는 폐의 방어기전에 중요역할을 하는 한편 반대로 폐조직에 해를 끼치는 과정에도 관여하고 있어 여러 종류의 급성 및 만성폐질환의 원인이 되기도 한다<sup>1)</sup>.

이중 폐포대식세포는 interleukin 1.6, tumor necrosis factor, interferon, neutrophil chemotactic factor 등 여러 종류의 cytokine 및 lysozyme, elastase, collagenase 등의 효소 및 antiprotease, fibronectin 등의 단백질과 superoxide, hydrogen peroxide 및 hydroxy radical 등의 산소유리기(oxygen free radical)를 분비할 뿐 아니라 다양한 종류의 표면수용체를 발현하여 폐의 면역반응 및 염증 반응을 조절하는 중추적인 역할을 한다<sup>2)</sup>. 이중 산소유리기들은 인체내로 침범한 세균을 파괴하는 유익한 작용을 보이는 반면에<sup>3,4)</sup> 인체의 방어기능을 초과할 경우 여러 종류의 손상을 일으킨다. 즉 단백질의 변성이나 불활성화, catalase의 활성의 억제, 세포막불포화지방산의 과산화, 다당류의 파괴, 돌연변이의 유발 등이 있으며, 상피세포 기저막의 주성분인 hyaluronic acid의 파괴를 일으켜 조직에 장애를 주고 핵산을 파괴하기도 한다. 폐의 손상을 보면 폐혈관 내피세포에 작용하여 투과성을 증가시키고 antiprotease를 불활성화시켜<sup>5)</sup> 호중구 elastase에 대한 감수성을 증가시켜 폐손상을 일으킨다. 폐기종, 폐섬유화증, 유육종증 등의 만성폐질환환자 및 흡연을 하는 사람의 폐포대식세포는 정상인의 대식세포보다 superoxide 생성능이 증가되어 있어 이 질환들의 중요 기전의 하나로 알려져 있다<sup>6-9)</sup>.

이러한 산소유리기에 의한 급성폐손상증 임상에서 가장 흔히 접할수 있고 중요한 질환이 그람음성세균에 의한 패혈증시 발생되는 성인성 호흡장애증후군이다. 이 경우 그람음성세균의 내독소(endotoxin; lipopolysaccharide; LPS)가 중요역할을 하게 된다. 내독소에 의한 급성폐손상시 대식세포의 변화를 관찰한 실험으로 Jacobs등<sup>10)</sup>은 생체내 내독소를 투여했을 때 폐포대식세포는 정상 폐포대식세포에 비해 zymosan의 자극에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생산이 증가하고 chemiluminescence도 증가하였으나 세균에 대한 탐식력 및 살균력은 감소하였다고 보고하였다. 그외에 체외에서 내독소가 대식세포에 미치는 영향을 보면 Pabst등<sup>11)</sup>은 체외에서 배양된 대식세

포를 내독소에 노출시킨후 PMA로 자극시 superoxide 생산이 증가되는 현상(priming 효과)을 밝혔다.

이와 같이 폐의 방어기전 및 폐손상에 중요역할을 하는 산소 유리의 발생기전에 대한 연구와 이를 이용하여 산소유리의 영향을 억제하기 위한 연구들이 많이 진척되어 있다<sup>12)</sup>. 이러한 연구중의 하나로 그람음성세균의 내독소에 의한 급성폐손상시 verapamil의 영향에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있다. Verapamil은 백서에서 내독소에 의한 폐손상시 생존율을 증가시켰고<sup>13,14)</sup>, 동물의 폐를 분리하여 이용한 실험에서 verapamil은 PMA 자극에 의한 폐투과성의 증가를 완화시켰다<sup>15,16)</sup>. 또한 Parker등<sup>17)</sup>에 의하면 양에서 내독소에 의한 폐손상시 verapamil을 투여한 경우 내독소의 영향인 phase I의 급성폐등맥고혈압과 phase II의 폐림프액의 증가를 완화시켜 폐손상을 줄이는 것을 밝히고 또한 체외에서 verapamil이 호중구에서 PMA 자극에 의한 superoxide 생산을 감소시키는 것을 밝혀 내독소에 의한 폐손상시 verapamil 효과의 한 기전이 된다고 주장하였다.

이러한 내독소에 의한 폐손상에는 산소유리기가 주요 역할을 하는데 이 과정중에 중요한 현상이 priming 효과이다. Priming 이란 대식세포 및 호중구가 어떤 물질에 노출후 PMA, FMLP 등의 여러 자극을 받으면 superoxide 생산이 증가하나 자극이 없을 때는 변화가 없는 현상이다. 이런 priming 효과는 대식세포나 호중구가 내독소, gamma-interferon, 세균세포막 성분인 muramyl dipeptide, 단백질분해효소, sodium periodate 등에 노출시 일어나며 특히 내독소에 의한 priming 효과는 임상적으로 매우 중요한 의미를 갖는다. Pabst 등<sup>11)</sup>은 체외에서 내독소로 처리한 대식세포를 PMA나 FMLP로 자극시 훨씬 많은 superoxide가 생산되는 것을 증명하였다. 이러한 respiratory burst를 증가시키는 priming 효과는 대식세포 활성화의 중요 현상이며 세균을 죽이는 방어기전 일뿐 아니라 증가된 산소유리가 인체의 항산화능력을 초과하여 급성폐손상을 증가시킬수 있는 양면성을 가지고 있다.

Priming 효과에서의 칼슘의 역할에 대한 연구는 지금까지 많이 이루어지지 않은 상황이다. Superoxide의 생성과정에 칼슘이 매우 중요한 역할을 하는 예로 내독소에 노출된 세포에서 세포내 유리칼슘의 증가가 알려져 있으며 또한 Finkel등<sup>18)</sup>은 priming 효과에서의 칼슘의

역할을 밝히기 위해 대식세포를 특이적 calcium ionophore인 ionomycin 으로 전처치한 후 FMLP 및 PMA 로 자극시 각각 7배 및 2배의 superoxide를 분비하는 것을 밝혔다. 즉 priming 효과에 칼슘의 역할이 중요하며 PMA 자극에 의한 superoxide 생산에도 칼슘이 중요한 역할을 하리라 생각 된다. 그러나 임상적으로 중요한 내독소에 의한 priming 효과에서도 칼슘이 중요한 역할을 한다는 보고는 없다.

이에 저자는 백서의 폐포대식세포에서 PMA 자극에 의한 superoxide 생산에 내독소가 미치는 효과(priming effect)를 측정하고 또한 verapamil이 미치는 역할을 측정하며, priming 효과에 칼슘이 중요한 역할을 한다면 priming 효과가 verapamil에 의해 억제되리라는 가정하에 본 실험을 시도하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley rat는 서울대학교 동물실험실에서 구입한 것으로 모두 숫컷이었다. 몸무게는 130~170 gm 정도를 사용하였고 해부시 폐의 육안소견상 폐렴, 농양 등의 염증소견이 있는 동물은 제외하였다.

### 2. 방법

#### 1) 백서에서의 폐포대식세포의 분리

백서에 소디움펜토탈을 200 mg/kg씩 복강내 주사한 후 복강을 열고 하대정맥 혹은 횡격막을 열고 심장을 천자하여 혈액을 최대한 제거후 기관에 혈관도관(#16)을 삽입한후 37°C로 조절된 생리적 식염수 10 ml를 넣은후 서서히 흉벽을 마사지하면서 주사기로 흡입하였다. 이를 평균 8회 반복시행하여 기관지 폐포세척액을 얻었다. 이 기관지폐포세척액을 거어조로 여과하여 불순물을 제거한후 Beckman 원심분리기에서 4°C에서 400 G로 10분간 원심분리후 상층액을 버린 다음 5 ml의 Hank's balanced salt solution without Ca, Mg(이하 HBSS-로 약함)로 희석후 4°C, 400 G에서 10분간 원심분리하여 세척한다. 이과정을 2번 반복후 침전된 세포를 RPMI 1640+10% FCS+Penicillin/SM(이하 RPMI로 약함)에 희석하여 improved Neubauer hemocytometer에서  $1.0 \times 10^6$ /ml의 농도로 조정한다(이 용액을

Giemsa-Wright staining 으로 세포의 구성비율을 측정한다). 이 RPMI 용액을 55 mm 세포배양용 petri dish (Nunc)에 5 ml씩 분주후 5% CO<sub>2</sub> incubator(Forma, USA)에서 37°C에서 1시간동안 배양시켜 대식세포를 흡착시킨다(Adherence). 1시간 배양후 petri dish의 상층액을 분리한후 37°C의 HBSS 용액으로 2차례 세척한다. 이 상층액과 세척액을 모아 세포 수와 Giemsa-Wright 염색으로 대식세포의 비율을 측정한다. Petri dish에 흡착된 대식세포를 떼어내기 위해 4°C의 차가운 HBSS- 용액에 30분간 노출시키는 cold shock 방법을 사용하였다. 분리된 세포용액을 4°C, 400 G로 10분간 원심분리후 상층액을 제거한후 HBSS-로 2차례 원심 분리 세척후, HBSS+로  $5 \times 10^5$ /ml로 희석하였다. 이 용액에서 Giemsa-Wright 염색으로 대식세포의 비율을 측정하고 trypan blue dye exclusion test로 대식세포의 생존율을 측정하였다.

#### 2) 기저상태 및 PMA 자극시 Superoxide 생산 측정

24well Linbro plate에  $5 \times 10^5$  폐포대식세포(pulmonary alveolar macrophage, PAM)/ml의 HBSS+를 1 ml를 넣고 ferricytochrome C 80 uM과 PMA 자극군은 PMA를 500 ng/ml를, 기저상태군은 HBSS를 넣고 또한 SOD 군은 SOD(10 ug/ml)를 넣고 blank 군은 대식세포를 제외한 모든 시약을 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 배양후 4°C에서 반응을 중단시킨 후 각 well의 상층액을 4°C, 1000 G에서 5분간 원심분리후 spectrophotometer(Kontron, USA)에서 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유무에 따르는 흡광도의 차이를 extinction coefficient( $21.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )로 나누어 nmole superoxide/ $5.0 \times 10^5$  PAM/hr 단위로 superoxide의 생산량을 측정하였다<sup>19)</sup>(n=24). 또한 2 mM EGTA로 처리한 세포의 칼슘이 없는 HBSS-하에서도 같은 실험을 시행하여 세포의 칼슘이 PMA 자극에 의한 superoxide 생산에 미치는 영향을 알아보았다(n=6).

#### 3) 내독소에 의한 폐포대식세포의 Superoxide 생성능의 변화

대장균의 내독소가 체외에서 폐포대식세포의 superoxide의 생성능에 미치는 영향을 알아보기 위해 분리된 폐포대식세포를 HBSS+용액에  $5.0 \times 10^5$ /ml의 농도로 희석후 내독소를 각각  $10^{-4}$  ug/ml,  $10^{-3}$  ug/ml,  $10^{-2}$  ug/ml,  $10^{-1}$  ug/ml 및 1 ug/ml씩 첨가한 후 37°C, 5%

CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 배양후 2)에서 설명한 방법에 따라 기저상태 및 PMA로 자극한 상태에서 superoxide의 생성능을 측정하였고 내독소에 의한 superoxide 생산의 변화가 최대로 되는 내독소의 농도를 결정하였다(n=9).

#### 4) Verapamil에 의한 폐포대식세포에서의 PMA 자극에 의한 Superoxide 생산의 변화

칼슘길항제인 verapamil이 PMA 자극에 의한 폐포대식세포의 superoxide 생성능에 미치는 영향을 알기 위해 폐포대식세포( $5 \times 10^5$ /ml, HBSS+) 1ml 씩에 verapamil을 0.01 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM 및 1.0 mM의 농도로 첨가한후 15분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에 배양후 나)에서 설명한 방법대로 PMA 자극후 superoxide의 생산을 측정하였다(n=10). 또한 세포의 칼슘의 유무에 따른 변화를 알기 위해 칼슘이 없는 HBSS-에 폐포대식세포를 배양하여 같은 실험을 시행하였다(n=9). 위의 결과에서 superoxide의 감소(기저상태에서의 생산량을 제외)가 약 50% 정도 일어나는 verapamil의 농도를 결정하였다.

또한 verapamil의 효과가 비특이적인 세포독성효과에 의한 것인지를 알기위해 대식세포를 각 농도의 verapamil에 1시간 처리후 trypan blue dye exclusion test를 시행하여 대식세포의 viability를 측정하였다(n=10).

#### 5) 폐포대식세포의 Superoxide 생산에 대한 내독소와 Verapamil의 복합효과

내독소에 의한 폐포대식세포의 superoxide의 생산의 증가(priming 효과)에 대한 verapamil의 효과를 알아보기 위해 폐포대식세포를 4군으로 나누어 실험하였다. 첫번째 군은 대조군으로 내독소와 verapamil의 처리없이 HBSS+하에서 1시간 동안 배양후 2)에서 설명한 방법대로 PMA 자극후 superoxide의 생산을 측정하였다(C-group). 두번째 군은 내독소를 0.1 ug/ml로 1시간 동안 처리후 PMA로 자극후 superoxide 생산을 측정하였고(L-group) 세번째 군은 verapamil을 0.3 mM로 1시간 처리후 같은 방법으로 측정하였으며(V-group) 마지막 군은 내독소와 verapamil을 함께 넣고 1시간 배양후 같은 방법으로 측정하였다(V+L-group)(n=10).

#### 6) 연구결과의 분석

각 연구결과는 SPSS의 paired T test를 사용하여 분석하였고 4)의 결과분석중 내독소와 verapamil의 상호

작용은 3 way Anova test로 분석하였다. P-value가 0.05 이하인 경우에 통계적 유의성을 인정하였다(mean±S.D.).

## 결 과

### 1. 백서 기관지 폐포세척액내의 세포수, 세포의 구성비 및 흡착율(Adherence Rate)

기관지폐포세척액은 80 ml의 생리적 식염수를 넣어 90%이상의 회수율을 보였다. 평균 세포수는  $13.2 \times 10^6$  개로  $7.0 \times 10^6$ 에서  $24 \times 10^6$ 까지 분포되어 있었다. 그중 대식세포가 89.9%를 차지하고 임파구가 6.8%, 호중구가 3.0% 및 호산구가 0.3%로 대식세포가 대부분을 차지하였다.

RPMI에 회석하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 흡착후 흡착되지 못한 상층액 및 세척액내의 세포중 대식세포의 수를 측정하여 흡착율을 측정한 결과 평균 66%의 흡착율을 보였다. 흡착후 cold shock 방법으로 떼어낸 세포는 trypan blue dye exclusion test상 90%이상의 생존율을 보였고 Giemsa-Wright 염색상 97% 이상이 대식세포였다.

### 2. 폐포대식세포에서 기저상태 및 PMA(500 ng/ml)로 자극후 생산된 Superoxide의 측정

기저상태에서 폐포대식세포의 superoxide의 생산량은  $2.93 \pm 1.99$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr 였고, PMA로 자극한 폐포대식세포의 superoxide 생산량은  $9.24 \pm 3.39$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr으로 3.15배의 증가를 보였다( $p < 0.001$ )(Fig. 1).

세포의 칼슘의 유무에 따른 기저상태 및 PMA 자극에 의한 superoxide 생산량을 비교한 결과 HBSS+하에서는 기저상태에서는  $3.32 \pm 2.44$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr, PMA 자극후  $9.34 \pm 3.30$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr, 칼슘이 없는 HBSS-하에서 기저상태에서는  $1.97 \pm 2.13$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr, PMA 자극후  $8.24 \pm 3.00$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr로 두군간에 기저상태 및 PMA 자극상태 모두 유의한 차이가 없었다(Fig. 2). 이 결과로 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산은 세포의 칼슘의 농도와 상관없이 있음을 알수 있었다.

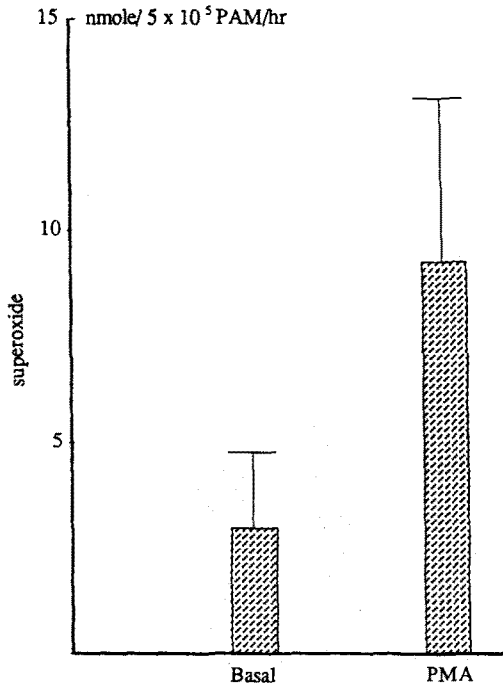


Fig. 1. Basal and PMA stimulated superoxide production by rat alveolar macrophage (mean  $\pm$  S.D., n=24) ( $p < 0.001$ )

### 3. 내독소 농도변화에 따른 폐포대식세포의 Superoxide 생산능의 변화

폐포대식세포를  $10^{-4}$ ug/ml 부터 1ug/ml의 내독소로 1시간 동안 전처치후 PMA로 자극시 superoxide의 생산의 변화를 보았다. 기저상태에서는 2.62 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가 생산되었고  $10^{-4}$ ug/ml의 내독소로 1시간 전처치후 기저상태에서는 2.46 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-3}$ ug/ml의 내독소에 노출후 2.54 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-2}$ ug/ml의 내독소에 노출후 2.89 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-1}$ ug/ml의 내독소에 노출후 2.80 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr, 1ug/ml의 내독소에 노출후 2.99 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가 생성되어 PMA로 자극하지 않을 경우 LPS는 통계적으로 유의한 superoxide의 생성의 증가를 보이지 못했다. 내독소의 전처치없이 PMA로 자극시 8.67 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-4}$ ug/ml의 내독소로 전처치후 PMA로 자극시 9.47 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-3}$ ug/ml의 내독소로 전처치후 자극시 9.68

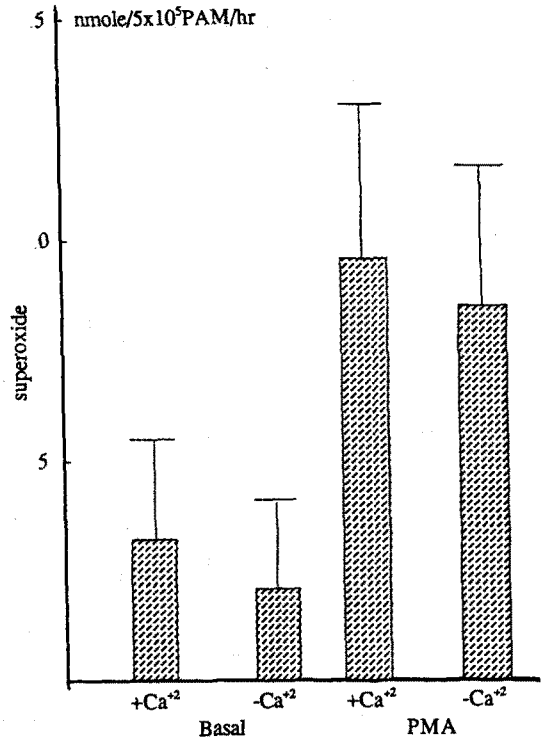


Fig. 2. PMA stimulated superoxide production in  $Ca^{+2}$  (1.3 mM) media and  $Ca^{+2}$  free media (mean  $\pm$  S.D., n=6) (\*: NS-compared with +  $Ca^{+2}$ )

nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-2}$ ug/ml의 내독소로 전처치후 자극시 11.14 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr,  $10^{-1}$ ug/ml의 내독소로 전처치후 자극시 12.37 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr, 1ug/ml의 내독소로 전처치후 자극시 11.02 nmole/5  $\times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가 생산되었으며  $10^{-2}$ ug/ml 및  $10^{-1}$ ug/ml의 농도하에서 각각  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ 로 superoxide의 생산이 유의하게 증가하였다. 특히  $10^{-1}$ ug/ml의 농도에서 내독소의 priming 효과는 최대로 측정되어 superoxide의 생산량을 뺀 PMA 자극시의 증가량은 61% 증가하였다(Fig. 3).

### 4. PMA 자극에 의한 Superoxide 생산에 미치는 Verapamil의 효과

칼슘길항제인 verapamil이 대식세포에서 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고 또한 세포의 칼슘의 유무에 따른 차이가 있는가를 알아보았다. 우선 칼슘이 있는 HBSS+에서 폐포대식세포를 verapamil의 전처치없이 PMA로 자극한

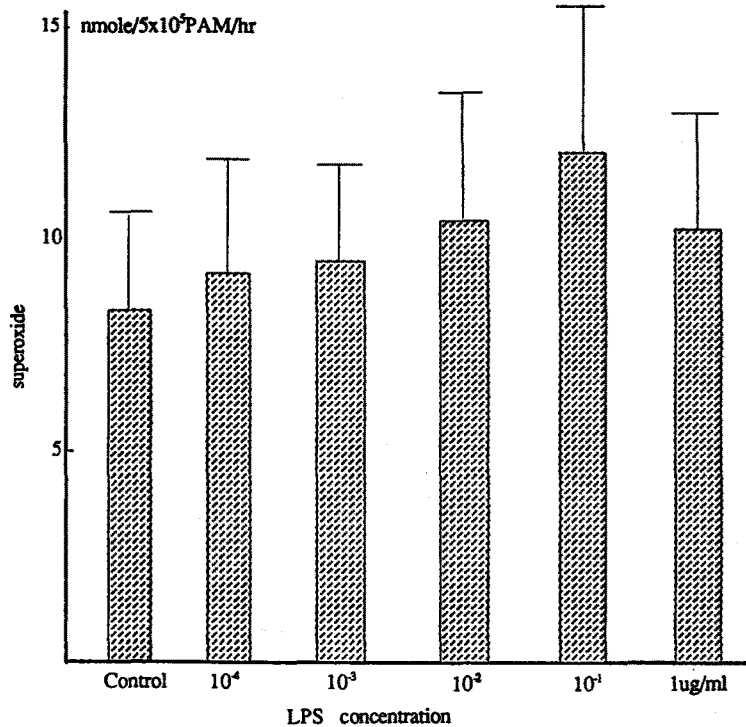


Fig. 3. Effects of endotoxin pretreatment on superoxide production by PMA stimulated rat alveolar macrophage (mean  $\pm$  S.D., n=9)

군에서 12.32 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr의 superoxide가 생산되었고 verapamil의 용매인 DMSO로 처리후 PMA로 자극한 군은 12.21 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr로 유의한 차이가 없었다. Verapamil로 전처치한 군은 verapamil의 농도의 변화에 따라 0.1mM로 처리후 11.69 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr, 0.3mM로 처리후 7.60 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr, 0.5mM로 처리후 6.88 nmole/hr 및 1.0mM로 처리후 4.55 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr의 superoxide가 생산되어 verapamil의 농도의 증가에 따라 superoxide의 생산의 감소가 심해지며 0.3mM 이상의 농도에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 4). 특히 1.0mM의 verapamil로 처리시에는 기저상태의 superoxide 생산량인 4.24 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr 과 유의한 차이가 없어 완전히 억제됨을 알 수 있었다.

다음으로 세포의 칼슘이 없는 HBSS-내에서 verapamil의 효과를 보면 PMA로 자극시 superoxide의 생산량은 10.05 nmol/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr 이었고 verapamil의 용매인 DMSO로 처리후 PMA로 자극시

10.10 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr로 유의한 차이가 없었다. Verapamil의 농도에 따른 superoxide의 생산량의 변화를 보면 0.01mM로 전처치후 10.71 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr, 0.1mM로 전처치후 8.10 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr, 0.3mM로 전처치후 4.95 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr, 0.5mM로 전처치후 4.90 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr 및 1.0mM로 전처치후 4.85 nmole/5 $\times$ 10<sup>5</sup> PAM/hr로 verapamil의 농도가 증가하면서 감소의 정도가 커지며 0.3mM 이상의 농도에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 5).

또한 verapamil의 전처치 1시간후 trypan blue dye exclusion test의 결과 폐포대식세포의 생존율은 0.01mM의 verapamil로 처리시 94%, 0.1mM로 처리시 94%, 0.3mM로 처리시 91%, 0.5mM로 처리시 92% 및 1.0mM로 처리시 90%로 대조군의 92%와 유의한 차이가 없어 verapamil의 효과가 비특이적 세포독성에 기인하지 않음을 알 수 있었다(Table 1).

이상의 결과에서 verapamil은 PMA 자극에 의한 대

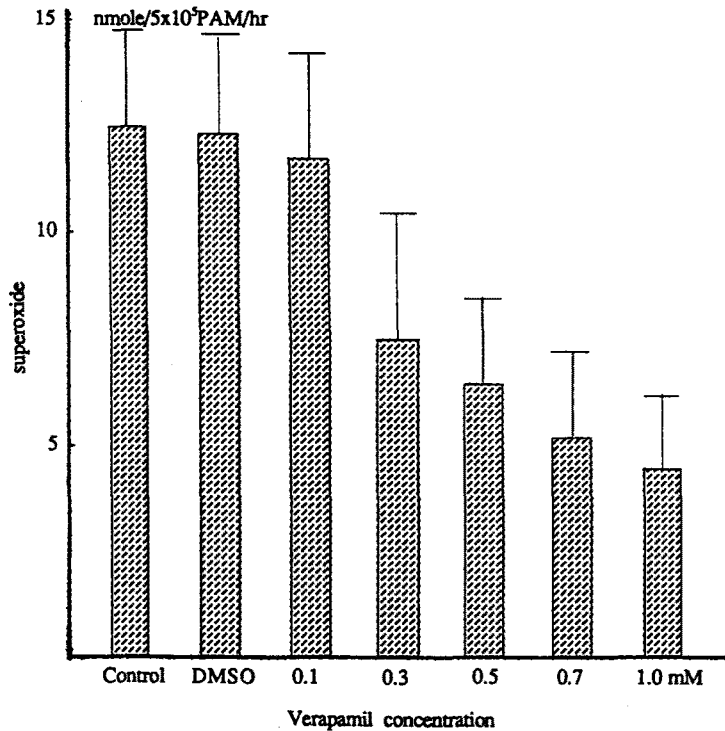


Fig. 4. Verapamil effects on superoxide production by PMA stimulated rat alveolar macrophage in  $Ca^{+2}$  media (mean  $\pm$  S.D., n=10)

Table 1. Viability of Verapamil Pretreated Rat Alveolar Macrophage

Control	Verapamil				
	0.01 mM	0.1 mM	0.3 mM	0.5 mM	1.0 mM
92.4 $\pm$ 2.4	94.1 $\pm$ 3.0	94.0 $\pm$ 2.6	91.2 $\pm$ 2.8	92.3 $\pm$ 1.8	89.9 $\pm$ 3.2%

식세포의 superoxide의 생산을 억제하였으며, 세포의 칼슘의 유무와는 관계가 없었다. 또한 HBSS+내에서 기저상태에서의 superoxide의 생산량을 뺀 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산을 약 50% 억제하는 verapamil의 농도를 0.3 mM로 결정하였다.

#### 5. 폐포대식세포의 Superoxide 생산에 대한 내독소와 Verapamil의 복합효과

내독소의 전처치에 의해 PMA 자극시 superoxide의 생산이 증가되는 현상(priming 효과)에 대한 verapamil의 영향을 알아보기 위해 시행하였다. 대조군(C-group)은  $9.45 \pm 2.77$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가 생산되었고, L군은  $11.98 \pm 2.74$  nmole/

$5 \times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가, V군은  $7.71 \pm 2.21$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가, L+V군은  $8.70 \pm 2.63$  nmole/ $5 \times 10^5$  PAM/hr의 superoxide가 생산되었다(Table 2, Fig. 6). C군에 비해 L군은 유의하게 증가하고 C군에 비해 V군은 유의하게 감소하여 앞서의 결과와 일치하였다. 그리고 L군과 L+V군을 비교시 L+V군에서 superoxide의 생산이 유의하게 감소하여 ( $p < 0.01$ ) verapamil이 내독소에 의해 증가된 superoxide의 생산을 감소시키며 V군과 L+V군을 비교시 L+V군의 superoxide의 생산이 증가된 듯하나 통계적 유의성은 없었다. 또한 내독소의 priming 효과에 대한 verapamil의 효과를 검증하기 위해 각 data에서 L/C의 비와 L+V/V의 비의 2개의 parameter를 비

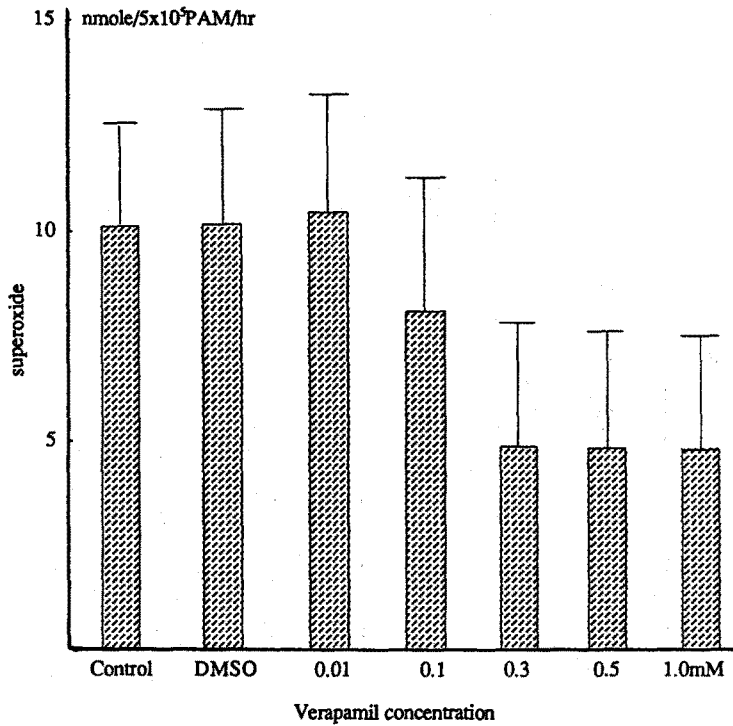


Fig. 5. Verapamil effects on superoxide production by PMA stimulated rat alveolar macrophage in Ca<sup>2+</sup> free media (mean±S.D., n=9)

Table 2. Combined Effect of Endotoxin and Verapamil on Superoxide Production by PMA Stimulated Rat Alveolar Macrophage (nmole/5x10<sup>5</sup> PAM/hr, n=10)

	Control (C) group	LPS (L) group	Verapamil (V) group	LPS + Verapamil (L + V) group
Mean	9.45	11.98	7.71	8.70
S.D.	2.77	2.74	2.21	2.63

Note : C-group vs L-group : p < 0.01, C-group vs V-group : p < 0.01, L-group vs L+V-group : p < 0.01, V-group vs L+V-group : NS.

Table 3. Comparison of Endotoxin Enhancement of Superoxide Production (Priming Effect) between Verapamil Nontreated and Verapamil Treated Group

LPS (L)/Control (C)	LPS + Verapamil (L + V)/ Verapamil (V)	
1.30 ± 0.20	1.13 ± 0.17	P < 0.05
(mean ± S.D., n = 10)		

교한 결과, L/C는 1.30±0.20, L+V/V의 비는 1.13±0.17로 verapamil 처리시 내독소에 의한 prim-

ing 효과가 30% 증가에서 13% 증가로 유의하게 감소하였다(p<0.05, Table 3). Verapamil과 내독소와의 상호작용 여부를 알기 위해 백서, 내독소 및 verapamil의 3 parameter의 3 way Anova test상 내독소와 verapamil 간의 상호작용이 존재함을 알 수 있었다.

## 고 찰

이 연구는 몇 단계의 과정을 걸쳐서 실험을 진행하였다. 첫번째 단계는 백서의 폐포대식세포를 순수하게 분



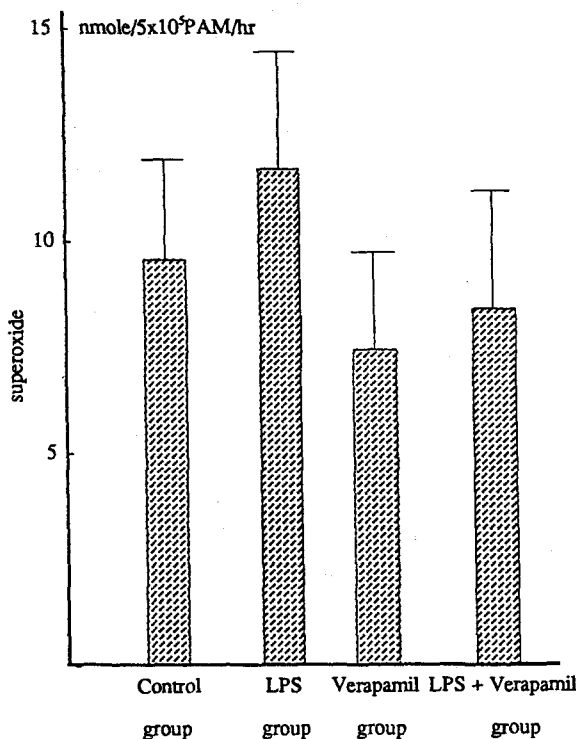


Fig. 6. Combined effect of endotoxin and verapamil on superoxide production by PMA stimulated rat alveolar macrophage (mean  $\pm$  S.D., n=10)

리 배양하여 기저상태 및 PMA 자극상태에서 생산되는 superoxide의 양을 정확히 측정하고 두번째 단계는 내독소로 대식세포를 전처리 하여 priming 효과를 관찰하고 세번째 단계는 verapamil을 이용하여 superoxide 생산에 대한 억제효과를 관찰하며 마지막 단계에서 내독소와 verapamil의 복합효과를 관찰하여 내독소의 priming 효과에 대한 verapamil의 영향을 관찰하였다.

본 연구에서는  $5 \times 10^5$ 개의 폐포대식세포에서 기저상태에서는  $2.93 \text{ nmole}/5 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ 였고  $500 \text{ ng/ml}$ 의 PMA로 자극시  $9.24 \text{ nmole}/5 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ 로 Ward등<sup>20)</sup>의 실험에서의 기저상태에서의  $5 \sim 7 \text{ nmole}/4 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ , PMA 자극후 약  $30 \text{ nmole}/4 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ 보다 전반적으로 적은 양의 superoxide의 생산이 측정되었으나 자극되는 정도는 큰 차이가 없었다. 또한 Ward의 연구결과에서 호중구는 기저상태에서 superoxide의 생산량이 극히 적었으나 대식세포는 기저상태에서도 유의한 정도의 superoxide가 생산된다는 것이 본 실험에서도 확인되었다. 특히 PMA 자극에 의한

superoxide의 생산은 세포의 칼슘이 없는 상태에서도 차이가 없이 생산되어 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산에 칼슘이 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 그러나 FMLP, concanavalin A 및 면역복합체와 같이 세포막의 특이수용체와 결합하여 respiratory burst를 일으키는 물질은 세포의 칼슘의 농도에 따라 superoxide의 생산이 변화하는 것으로 알려져 있다.

대식세포는 외부 여러 종류의 자극이나 개체의 면역상태에 따라 산소유리기를 생산하는 능력이 달라진다. Johnston등<sup>21)</sup>은 쥐의 복강내 BCG 혹은 내독소를 주사 후 얻은 복강대식세포를 opsonized zymosan 이나 PMA로 자극시 superoxide 생산량이 급격히 증가하는 효과(priming effect)를 증명하고 활성화된 대식세포가 미생물 살균효과 및 종양세포 살생효과를 가진다는 것을 밝혔다. 또한 Pabst등<sup>11)</sup>은 체외에서 내독소 및 세균의 세포막 성분인 muramyl dipeptide로 대식세포를 처리후 PMA로 자극시 superoxide 생산량이 정상대식세포보다 최대 7배 정도까지 증가한다는 것을 보이고 이 증가 현상 즉 priming 효과는 내독소와 대식세포와의 접촉시간이 30분부터 약 72시간까지 유지되는 것을 밝혔다. 또한 내독소의 농도는  $10^{-4} \text{ ug/ml}$ 부터  $10 \text{ ug/ml}$ 까지에서 superoxide의 생산량이 증가하였고  $1 \text{ ug/ml}$ 시 최대 priming 효과를 보였고,  $10 \text{ ug/ml}$  이상에서는 대식세포의 생존력이 감소하였다. 또한 LPS에 노출후 PMA로 자극하지 않을 경우 superoxide의 생성은 증가하지 않았다.

본 연구에서는 내독소와 대식세포와의 접촉시간을 1시간으로 하였다. 이는 장시간의 배양에 따른 여러가지 다른 요소의 영향을 배제하고 Pabst의 실험에서 1시간의 접촉에서도 2배이상의 충분한 priming 효과를 보이기 때문이다. 이번 연구에서도 LPS에만 노출후 PMA로 자극하지 않은 경우는 superoxide의 생성의 변화는 없었고 PMA로 자극시 최대 priming 효과를 보이는 내독소의 농도는  $10^{-1} \text{ ug/ml}$ 였고,  $1 \text{ ug/ml}$ 에서는 priming 효과가 감소하였다. 최대 priming 효과는  $8.67 \text{ nmole}/5 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ 의 superoxide의 생산에서  $12.37 \text{ nmole}/5 \times 10^5 \text{ PAM/hr}$ 로 43%의 증가를 보여 Pabst의 실험에서의 2배이상의 증가보다는 적었다. 이 차이에는 여러가지 요소가 있으나 사용된 내독소의 차이(본 연구는 E. coli 055-B5, Pabst는 E. coli K235)와 실험동물 및 대식세포의 차이(본 연구는 Sprague

Dawley rat의 폐포대식세포, Pabst의 연구에서는 Swiss-Webster mice의 복강대식세포) 및 본 실험에 사용된 백서는 pathogen free 상태가 아니므로 폐포대식세포가 이미 세균내독소에 노출된 기회가 있어 어느 정도 탈감작되어 priming 효과가 저하되어 있다고 생각된다.

대식세포 및 호중구등의 염증세포에서 발생하는 산소유리기는 유해세균을 죽이는 유익한 점 뿐 아니라 성인 성호흡장애증후군등의 급성폐손상 및 여러 만성폐질환의 원인이 되므로 이에 의한 폐손상을 줄이기 위한 여러 종류의 antioxidant 기전이 연구되고 있다. 이러한 antioxidant 기전은 크게 4종류로 나눌수 있는데 첫째 산소유리기의 생성을 억제하는 방법, 둘째 oxidant를 비교적 독성이 약한 물질로 변화, 혹은 제거시키는 방법, 셋째 산소유리기를 중요 세포구조와 격리시키는 방법 및 넷째 산소기에 의해 손상 받은 분자손상을 치료하는 방법등이다<sup>22,23</sup>). 이중 산소유리기의 생성을 억제하기 위한 약물 투여가 많이 연구되고 있다. 여기에는 hydroxyl radical 생성에 필요한 철 성분을 chelation시키는 desferoxamine<sup>24</sup>), xanthine oxidase에 의한 superoxide 생산을 억제하는 allopurinol과 oxypurinol<sup>25</sup>) 및 칼슘길항제인 verapamil 등이 있다.

서론에서 설명한 대로 superoxide의 생산에 칼슘이 중요한 역할을 하며 그 외에 칼슘은 protease의 분비, phospholipase A<sub>2</sub> 및 lipoxygenase의 활성화 및 mast cell의 탈과립화에 중요 역할을 한다.

Calcium entry blocker를 이용하여 세포기능에 칼슘의 이동이 미치는 영향을 연구하는 실험들이 많이 이루어져 있다. 즉 verapamil은 대식세포 및 호중구에서 zymosan<sup>26</sup>), FMLP<sup>27</sup>) concanavaline A<sup>28</sup>)의 자극에 의한 superoxide의 생산을 억제한다는 사실은 이미 알려져 있다. 그러나 세포막의 수용체를 자극하지 않고 직접 protein kinase C를 자극하여 칼슘에 대한 친화력을 높이는 물질인 PMA에 의한 superoxide 생산에 미치는 칼슘 및 verapamil의 영향은 확실히 밝혀져있지는 않다. Dorio등<sup>29</sup>)의 실험에서는 칼슘이 관여하는 자극물질인 concanavaline A와 protein kinase C를 자극하는 PMA를 동시에 자극시 두자극의 효과를 각각 합친 것보다 많은 superoxide의 생산이 일어났다(supra-additive enhancement). 또한 PMA에 의한 superoxide의 생산이 calcium ionophore인 A23187에 의해 부분적으로

억제되어 칼슘이 superoxide의 생산조절에 이중적인 역할을 할 것으로 주장하였다. 그러나 호중구에서 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산이 verapamil에 의해 억제된다는 보고<sup>17,30</sup>) 및 특히 Irita<sup>30</sup>)의 연구에서는 세포의 칼슘이 없는 상태에서도 verapamil의 억제효과는 증명되어 PMA에 의한 superoxide 생산에 세포의 칼슘은 영향을 미치지 못하나 세포내 칼슘이 영향을 미친다는 것을 알수 있다.

본 연구에서 대식세포에서의 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산도 verapamil에 의해 억제되었으며 이는 0.3 mM 이상의 고농도에서 관찰되었다. 또한 verapamil의 용매인 DMSO는 superoxide의 생산에 영향을 주지 못하였으며 고농도의 verapamil의 비특이적으로 세포의 생존력을 감소시키지 않을 까하여 verapamil 처리 1시간후 trypan blue exclusion test로 생존력을 측정하였으나 차이가 없음이 확인되어 비특이적 세포독성의 가능성은 배제되었다.

본 연구에서는 세포의 칼슘이 없는 배양액내에서도 verapamil의 억제효과는 증명되었다. 이는 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산이 세포의 칼슘의 농도와 상관없이 이루어진 앞서의 결과에서 예기될 수 있었다. 즉 verapamil의 억제효과는 대표적인 기전인 칼슘의 세포내 유입을 차단하는 기전이 아닌 다른 기전에 의한 것임을 알수 있다. 실제로 verapamil은 세포막을 통한 칼슘의 출입을 차단할 뿐 아니라 세포내 저장된 칼슘의 동원을 억제하고 또한 칼슘과 세포내의 target protein과의 결합을 억제하는 것으로 알려져 있다. Irita 등<sup>30</sup>)도 PMA에 의해 세포막에 저장된 칼슘이 동원되고 또한 verapamil이 이 현상을 억제하는 것을 증명하여 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산에 대한 verapamil의 억제효과가 세포의 칼슘의 유입차단효과가 아닌 세포내 저장칼슘의 동원억제에 의한 것으로 설명하고 또한 verapamil이 NADPH oxidase activity를 억제하는 것도 한 기전이 되리라고 설명하였다. 그러나 본 실험과 Irita 및 Parker 등의 실험에서 superoxide의 생산을 억제하는 verapamil의 농도가 10<sup>-4</sup>M에서 10<sup>-3</sup>M로 인체의 치료농도인 10<sup>-7</sup>M 내지 10<sup>-6</sup>M 보다 높았다.

본 실험의 마지막 단계에서 내독소에 노출시 자극물질에 의한 산소유리기의 생산이 증가되는 priming 효과에 대한 칼슘길항제의 영향을 보았다. Sakaguchi 등<sup>31</sup>)은 내독소로 처리한 mice의 간세포에서 대조군보다 세포질

및 mitochondria 내의 칼슘의 양이 증가하는 것을 밝혔다. 또 Sakaguchi 등<sup>32)</sup>은 mice의 간에서 내독소에 의한 lipid peroxide와 superoxide 생산에 칼슘이 미치는 영향을 연구하였다. 이 연구에서 칼슘이 없는 음식을 먹인 군과 정상 음식을 먹인 군을 비교하여 정상군에서는 내독소에 노출시 lipid peroxide의 생성이 훨씬 증가하였고 칼슘이 없는 음식을 먹인 군에서는 내독소에 노출시 lipid peroxide의 증가는 없었으며 또한 내독소로 처리시 verapamil을 동시에 처리한 mice에서는 내독소로만 처리한 mice 보다 lipid peroxide 형성이 훨씬 적었다. 그러나 이러한 변화가 verapamil이 내독소에 의한 superoxide의 생성을 억제하여 생긴 결과인지는 확인되지 않았다. 그 외에 Finkel 등<sup>18)</sup>은 여러 생물학적 물질(내독소, gamma interferon 등)들에 의해 superoxide의 생산이 증가되는 priming 효과에 대한 칼슘의 영향을 연구하기 위해 calcium ionophore로 처리후 FMLP 및 PMA로 자극시 superoxide 생산량이 증가하는 것을 밝히고, 세포외의 칼슘을 EGTA로 chelation 시킨 후 calcium ionophore로 priming 후 PMA로 자극시에는 superoxide의 생산증가가 일어나지 않아 calcium ionophore의 priming 효과에 세포의 칼슘이 중요역할을 하리라는 것을 밝혔다. 그러나 내독소에 의한 대식세포의 priming 에도 칼슘이 중요 역할을 할지는 알 수 없다. LPS에 의한 priming에 대한 연구는 Pabst 등<sup>33)</sup>이 결핵균의 추출물인 sulfatide가 LPS에 의한 priming을 억제한다는 결과가 알려져 있을 뿐이다.

본 연구에서는 내독소에 의한 priming 효과를 칼슘길항제인 verapamil로 억제할 수 있는가를 보기 위하여 verapamil은 약 50%의 억제효과를 보이는 0.3mM의 농도를 사용하였다. 그 이유는 0.3mM 이상의 농도에서는 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산이 거의 완전히 억제되어 priming 효과에 대한 verapamil의 영향을 분석하기 어렵기 때문이다. 결과를 보면 내독소로 처리 후 PMA로 자극 한 군(L군)의 superoxide의 생산은 verapamil로 충분히 억제되었다(L+V군). 그러나 verapamil로 처리된 두 군(V군, L+V군)을 비교시 내독소로 처리한 군에서 유의하게 superoxide 생산이 증가하지 못 하였다. 또한 verapamil의 유무에 따른 내독소의 priming 효과를 비교하기 위해(L/C)의 비와(L+V/V)의 비를 비교한 결과 30%의 증가와 13%의 증가로 verapamil이 있는 경우 priming 효과가 유의하게 감

소되었다. 또한 3 way Anova test 상 LPS와 verapamil의 상호작용이 있음이 확인되었다. 즉 verapamil은 내독소 자극시 대식세포에서의 superoxide의 생산을 억제하며, 이는 내독소에 의한 폐손상을 줄이는 verapamil 효과의 한 기전이 될수 있으며 이는 내독소에 의한 priming 효과 자체를 억제하고 또 이후 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산을 억제하는 데 기인한 것으로 생각된다. 이 결과로 보아 내독소에 의한 대식세포의 priming에 칼슘이 영향을 미치리라 생각된다.

앞으로 내독소에 의한 폐손상시의 verapamil 효과에 대한 생체실험과 대식세포 및 호중구의 세포막의 특이수용체와 결합하여 calcium dependent pathway를 따라 superoxide의 생산을 자극하는 물질로 알려진 FMLP 및 면역복합체를 자극물질로 사용하여 내독소에 의한 priming 효과가 verapamil에 의해 억제되는가를 재차 확인하는 실험이 필요하다고 생각된다.

## 요 약

**연구배경** : 대식세포 및 호중구에서 생산되는 superoxide는 외부에서 침입한 병원균을 죽이는 유익한 면이 있는 반면 자체 폐조직에 손상을 주어 폐손상을 일으키기도 한다.

임상에서 중요한 내독소에 의한 성인성호흡장애중후 군등의 폐손상시 superoxide 등의 산소유리기가 중요 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 superoxide의 생산에는 칼슘이 중요한 조절기능을 담당한다.

내독소에 의한 급성폐손상의 경우 실험적으로 verapamil을 투여시 폐부종등의 증상이 완화되는 것이 알려져 있어 칼슘길항제인 verapamil의 산소유리기의 생산에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

그러나 지금까지 폐포대식세포에서 superoxide의 생산에 대한 내독소와 verapamil의 영향을 같이 관찰한 실험은 없었다.

**방법** : 본 실험에서는 백서의 폐포대식세포에서 protein kinase C를 직접 자극하는 phorbol myristate acetate 자극에 의한 superoxide의 생산을 측정하고 내독소 및 verapamil이 superoxide의 생산에 미치는 영향을 관찰하고 내독소와 verapamil을 동시에 투여하여 내독소에 의해 대식세포가 활성화되어 superoxide의 생산이 증가하는 priming 효과에 verapamil이 어떠한 영

향을 미치는 것을 관찰하였다.

**결과** : 폐포대식세포를 PMA로 자극시 기저상태에 비해 3.15배의 superoxide가 생산되었으며 이는 세포의 칼슘의 유무와 전혀 무관하였다.

그리고 내독소(E. coli 055-B5)로 1시간 전처치후 PMA로 자극시 superoxide의 생산은 0.1 ug/ml 에서 최대로 43% 증가하였다. 또한 verapamil은 대식세포에서 PMA 자극에 의한 superoxide의 생산을 억제하였으며 세포의 칼슘이 없는 상태에서도 억제효과는 나타나 verapamil의 억제효과가 칼슘의 세포내 이동을 차단하는 기전에 의한 것이 아님을 관찰하였다.

내독소에 의한 대식세포에서의 superoxide의 생산의 증가는 verapamil이 없는 경우 30%의 증가에서 verapamil을 같이 투여한 경우 13%의 증가로 유의하게 감소하였다. 이는 내독소에 의한 대식세포의 priming에 칼슘이 영향을 미친다는 간접증거가 된다고 사료된다.

**결론** : 이상의 결과로 verapamil은 PMA 자극에 의한 대식세포의 superoxide의 생산을 억제하며 폐포대식세포에 대한 내독소의 priming 효과도 억제하여 이는 내독소에 의한 폐손상시 verapamil의 효과의 한 기전이 되리라 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Hercowitz HB: In defense of lung: Paradoxical role of the pulmonary alveolar macrophage. *Ann Allergy* 55:634, 1985
- 2) Sibille Y, Merrill WW, Cooper JAD Jr, et al: Effects of series of chlormethyl ketone protease inhibitors on superoxide release and the glutathione system in human polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 130:110, 1984
- 3) Babior BM: Oxygen dependent microbial killing by phagocytes (First of two parts) *N Engl J Med* 298: 659, 1978
- 4) Babior BM: Oxygen dependent microbial killing by phagocytes (Second of two parts) *N Engl J Med* 298: 721, 1978
- 5) Shasby DM, Vanbenthuyzen KM, Tate RM: Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: Role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 125:443, 1982
- 6) Cassatella MA, Berton G, Agostini C, et al: Generation of superoxide anion by alveolar macrophage in sarcoidosis; Evidence for the activation of the oxygen metabolism in patients with high-intensity alveolitis. *Immunology* 66:451, 1989
- 7) Greening AP, Wood NE, Gordon M, et al: Stimulated release of hydrogen peroxide from alveolar macrophages of sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 137:A39, 1988
- 8) Hoidal JR, Fox RB, Repine JE: Defective oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages in chronic granulomatous disease. *Am Rev Respir Dis* 120:613, 1979
- 9) Nakashima H, Ando M, Sugimoto M et al: Receptor mediated  $\bar{O}_2$  release by alveolar macrophages and peripheral blood monocytes from smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 136:310, 1987
- 10) Jacobs RF, Kiel DP, Balk RA: Alveolar macrophage function in canine model of endotoxin-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 134:745, 1986
- 11) Pabst MJ, Johnston RB Jr: Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med* 151:101, 1980
- 12) Berridge MJ: The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am* 253:142, 1985
- 13) Lee HC, Lum BKB: Protective action of calcium entry blockers in endotoxin shock. *Circ Shock* 18: 193, 1986
- 14) Malcolm D, Zargoga C, Chernow ZB et al: Calcium involvement in endotoxin shock: Verapamil improves hemodynamics and survival in rats (Abstract). *Circ Shock* 18:346, 1986
- 15) Bosson S, Kuenzig M, Schwartz SI: Verapamil improves cardiac function and increases survival in canine E. coli endotoxin shock. *Circ Shock* 16:307, 1985
- 16) Allison RC, Marble KT, Hernandez EM: Attenuation of permeability lung injury after phorbol myristate acetate by verapamil and OKY-046. *Am Rev Respir Dis* 134:93, 1986
- 17) Parker RE, Hardin JR, Brigham KL: Verapamil attenuates lung vascular responses to endotoxin in sheep. *J Appl Physiol* 65:2138, 1988
- 18) Finkel TH, Pabst MJ, Sukuki H et al: Priming of neutrophils and macrophages for enhanced release of superoxide anion by calcium ionophore

- ionomycin. Implications for regulation of the respiratory burst. *J Biol Chem* **262**:12589, 1987
- 19) Johnston RB Jr: The production of superoxide by cultured macrophages. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. p 373, CRC press, Boca Raton, 1984
  - 20) Ward PA, Dyque RE, Sulavik MC et al: In vitro and in vivo stimulation of rat neutrophils and alveolar macrophages by immune complexes. Production of  $\bar{O}_2$  and  $H_2O_2$ . *Am J Pathol* **110**:297, 1983
  - 21) Johnston RB Jr, Godzik CA, Cohn ZA: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* **148**:115, 1978
  - 22) Heffner JE, Repine JE: Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* **140**:531, 1989
  - 23) Sies H: Antioxidant activity in cells and organs. *Am Rev Respir Dis* **136**:487, 1987
  - 24) Gannon DE, Varaini J, Phan SH: Action of desferroxamine mesylate in protecting endothelial cells from neutrophil mediated cytotoxicity. *Am Rev Respir Dis* **135**:A11, 1987
  - 25) Spector T: Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalysed production of superoxide radical. *Biochem Pharmacol* **37**:349, 1988
  - 26) Sweeney TD, Castranova V, Bowman S: Factors affect superoxide release from rat alveolar macrophage. *Exp Lung Res* **2**:85, 1981
  - 27) Simchowitz L, Spilberg I: Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factors. Evidence for the role of calcium. *J Lab Clin Med* **93**:583, 1978
  - 28) Forman HJ, Nelson J: Effect of extracellular calcium on superoxide release by rat alveolar macrophages. *J Appl Physiol* **53**:1249, 1983
  - 29) Dorio RJ, Nelson J, Forman HJ: A dual role calcium in regulation of superoxide generation by stimulated rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Acta* **928**:137, 1987
  - 30) Irita K, Fujita I, Takeshige K, et al: Calcium channel antagonist induced inhibition of superoxide production in human neutrophils. Mechanisms independent of antagonizing calcium influx. *Biochem Pharmac* **35**:3465, 1986
  - 31) Sakaguchi S, Abe H, Sakaguchi O: Calcium behavior in endotoxin-poisoned mice: especially calcium accumulation in mitochondria. *Microbiol Immunol* **28**:517, 1984
  - 32) Sakaguchi S, Ibata H, Yokota K: Effect of calcium on lipid peroxide formation in endotoxemic mice. *Microbiol Immunol* **33**:99, 1989
  - 33) Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB: Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**:634, 1988