

□ 원 저 □

폐상피세포 장벽에 대한 H₂O₂의 영향

동아대학교 의과대학 생리학교실¹, 일반외과학교실², 내과학교실³

서 덕 준¹ · 조 세 현² · 강 창 운³

— Abstract —

Effect of H₂O₂ on Alveolar Epithelial Barrier Properties

Duk-Joon Suh, M.D.,¹ Se-Heon Cho, M.D.² and Chang-Woon Kang, M.D.³

Department of Physiology¹, General Surgery², Internal Medicine³, College of Medicine,
Dong-A University, Pusan, Korea

Background: Among the injurious agents to which the lung airspaces are constantly exposed are reactive species of oxygen. It has been widely believed that reactive oxygen species may be implicated in the etiology of lung injuries. In order to elucidated how this oxidant causes lung cell injury, we investigated the effects of exogenous H₂O₂ on alveolar epithelial barrier characteristics.

Methods: Rat type II alveolar epithelial cells were plated onto tissue culture-treated polycarbonate membrane filters. The resulting confluent monolayers on days 3 and 4 were mounted in a modified Ussing chamber and bathed on both sides with HEPES-buffered Ringer solution. The changes in short-circuit current (Isc) and monolayer resistance (R) in response to the exogenous hydroperoxide were measured. To determine the degree of cellular catalase participation in protection against H₂O₂ injury to the barrier, experiments were repeated in the presence of 20 mM aminotriazole (ATAZ, an inhibitor of catalase) in the same bathing fluid as the hydroperoxide.

Results: These monolayers have a high transepithelial resistance (>2000 ohm-cm²) and actively transport Na⁺ from apical fluid. H₂O₂ (0-100 mM) was then delivered to either apical or basolateral fluid. Resulting indicated that H₂O₂ decreased Isc and R gradually in dose-dependent manner. The effective concentration of apical H₂O₂ at which Isc (or R) was decreased by 50% at one hour (ED₅₀) was about 4 mM. However, basolateral H₂O₂ exposure led to ED₅₀ for Isc (and R) of about 0.04 mM. Inhibition of cellular catalase yielded ED₅₀ for Isc (and R) of about 0.4 mM when H₂O₂ was given apically, while ED₅₀ for basolateral exposure to H₂O₂ did not change in the presence of ATAZ. The rate of H₂O₂ consumption in apical and basolateral bathing fluids was the same, while cellular catalase activity rose gradually with time in culture.

Conclusion: Our data suggest that basolateral H₂O₂ may affect directly membrane component (e. g., Na⁺, K⁺-ATPase) located on the basolateral cell surface. Apical H₂O₂, on the other hand, may be largely degraded by catalase as it passes through the cells before reaching these membrane components. We conclude that alveolar epithelial barrier integrity as measured by Isc and R are compromised by H₂O₂ being relatively sensitive to basolateral (and insensitive to apical) H₂O₂.

Key Words: Alveolar epithelium, Pulmonary edema, H₂O₂, Permeability

본 연구의 일부는 1992년도 동아의대 학술연구조성비로 이루어 졌음.

서 론

폐 장기는 끊임없는 호흡운동과 그 넓은 표면적으로 인하여 대기의 유해한 물질에 언제든지 노출될 수 있다. 이들 화학적으로 유해한 물질들은 폐부종 등의 증상을 일으켜 폐의 일차적인 기능인 기체교환의 장애를 초래할 수 있다.

폐장벽은 폐포 상피세포층, 간질액강 그리고 혈관 내피세포층으로 구성되어 있고, 폐포막을 통한 친수성 물질의 이동을 방해하는 데 있어 약 90% 이상은 장벽의 폐포 상피세포가 담당하고 있으며, 이 상피세포 주변 조직인 간질과 혈관 부위로 부터 용질이나 수분이 빠져나가지 못하게 하고 있다. 이것에 대해서는 이미 많은 기능적 연구¹⁻⁴⁾와 형태학적 연구⁵⁻⁸⁾가 이루어져 왔다. 그러므로 폐상피세포의 이런 높은 저항성이 폐포의 공기층을 건조하게 유지시키며 기체교환이 원활히 이루어지게 하였다. 더구나 이 폐상피세포 장벽은 능동적인 용질의 이동기전을 가지고 있다는 사실(예, apical fluid로 부터의 능동적인 Na^+ 의 이동⁹⁻¹¹⁾)도 알려졌다. Apical fluid로 부터 용질(2차적인 수분)의 제거는 건강한 정상 상태에서 뿐만 아니라 폐손상의 회복 측면에서도 상당히 중요하게 관여할 것이다. 이들 폐상피세포 장벽의 물질 이동 기전의 변화는 air-blood barrier를 손상시키는 직접적인 요소나(예, 흡연) 다른 병적인 요소^{12,13)}에 의해서도 야기될 수 있으며 폐포의 공기층에 수분이 축적되므로서 심각한 호흡 곤란증상을 야기하게 된다.

또한 폐는 정상 폐상피세포에서도 항상 생성되고 있는 활성산소(oxygen radical)에 의한 유해작용에도 노출되어 있다. 이들 유해 산소들은 폐기종과 같은 폐질환의 원인 기전으로 생각되고 있으며, 이들은 환경의 변화(예, 흡연¹⁴⁾)에 의한 세포의 염증반응의 과정으로 생성되거나 폐포의 airspace에 존재하는 많은 세포(예, polymorphonuclear cells)의 효소작용에 의해서도 생성될 수 있으며¹⁵⁾ 결국은 폐조직을 손상시키게 된다.

인체 폐상피세포가 어떤 물질에 대해서 그 투과도가 증가되어 폐부종을 일으키게 되면, 폐부종액내 단백질 함량을 측정하여 분석하거나¹⁶⁾ 폐동맥 wedge 압력과 혈장 교질삼투압을 참고하여 x-ray 사진으로 폐부종을 간접적으로 진단해 볼 수 있지만 이들은 질병이 진행된 후가 되어야만 검사상 나타나게 된다. 최근 동물에서 폐

상피세포와 폐모세혈관 내피세포에서 물질의 투과도 증가를 조기에 알아 볼 수 있는 방법이 알려졌고¹³⁾, 흡연자를 대상으로 인체에서도 진단 방법이 개발되기에 이르렀다¹⁷⁾. 하지만 유해한 화학물질이나 활성산소가 폐상피세포에 작용하여 그 투과도를 증가시키는 기전에 관하여는 아직까지 완전히 밝혀지지 않았다.

1980년 초기부터 *in vitro*에서 폐상피세포를 통한 물질이동 특성 연구의 한 model로서 포유류의 폐상피세포 일차 배양 단일막(primary cultured monolayer)이 개발되고 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이 방법을 이용하여 만든 폐상피세포 단일막에서 전기생리학적인 관점에서 물질의 이동지표인 short-circuit current (I_{sc})와 조직저항(R)에 대한 활성산소의 하나인 H_2O_2 (hydrogen peroxide)가 어떤 영향을 미치는지를 연구함으로써 세포생리학적 기전을 구명하고자 한다.

실험 방법

1. 쥐 폐상피세포의 일차 단일막 배양

최근 Cheek 등에 의해⁹⁾ 세포배양 처리를 한 여과막(tissue culture-treated Nucleopore filter)을 이용하여 폐상피세포의 단일막 배양이 이루어졌는데, 그 과정은 다음과 같다.

1) 용액

용액 I의 조성은 다음과 같다(mM). NaCl 136, KCl 5.3, Na_2HPO_4 7.2, NaH_2PO_4 , N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES) 10, glucose 10. pH는 실온에서 7.4로 맞추었다. 용액 II의 조성은 용액 I과 같았으나, CaCl_2 와 MgSO_4 가 각각 1.9와 1.3 mM 첨가되었다. 이 두 용액은 0.22 μm 의 여과막(Costar, Cambridge, MA)을 통하여 무균상태로 하였고 4°C에 보관하였다. 세포배양하기 바로 직전에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 gentamicin을 용액 I과 용액 II에 첨가하였다. 용액 III은 300 mg의 bovine serum albumin이 포함된 25 ml 무균 용액 II에 1.32 ml의 Fluorocarbon (FC-75, 3M, St. Paul, MN)을 첨가한 후 sonicate 하였다. 용액 IV는 60 ml의 용액 II에 120 U의 porcine pancreatic elastase (Worthington, Freehold, NJ)를 첨가하고 0.22 μm 의 여과막으로 여과하여 무균상태로 만들었다.

비중이 각각 1.04와 1.09인 metrizamide 용액은 용

액 II로서 만들었으며, 비중이 가벼운 metrizamide 용액은 두 용액 사이에 경계를 잘 나타내기 위하여 phenol red 로서 약간 붉은 빛을 띠게 하였다. 불연속의 metrizamide gradient를 만들기 위해서 먼저 무거운 용액(비중 1.09)을 50 ml의 plastic 으로 된 원심분리관에 10 ml 채우고 그 위에 소독된 pipette 으로서 분당 2 ml의 가벼운 용액(비중 1.04)을 천천히 첨가하였고 사용하기까지 4°C에 보관하였다.

용액 V는 20 ml의 용액 II에 DNAase (Sigma, St. Louis, MO) 2 mg을 첨가한 후 0.22 μ m의 여과막으로 여과하여 무균상태로 만들었다. Earlie's MEM (minimum essential medium)을 Irvine Scientific 회사로부터 구입하여(Irvine, CA) 10% new born bovine serum (NBS, GIBCO, Grand Islands, NY), 0.1 μ M dexamethasone 2 mM, L-glutamine 100 U/ml, penicillin 100 ng/ml, streptomycin 10 mM, HEPES (pH 7.4)를 첨가하여 MEMS 용액으로 하였다.

2) 폐장 분리 수술

125~175 g 인 Sprague-Dawley 흰 쥐를 sodium pentobarbital 25 mg을 복강내 주입하여 마취하였다. 마취 후 무릎을 재고 소동물 수술대 위에 고정한 후 정중부를 절개하여 흉강과 복강을 노출시켰다. 기관지절개술을 시행한 후 앞부분이 뚫린 18 G 바늘을 통하여 소동물 호흡기(Harvard respirator)에 연결하여 7 ml의 용적으로 분당 40회되게 호흡을 유지시켰다. 300 U의 heparin sodium을 우심실에 주사하여 혈액응고를 방지하였다. 흉선을 제거하고 상대정맥과 간 아래부위의 대동맥을 잘라 출혈시켰다. 심장의 첨부를 잘라낸 후 polyethylene 튜브(PE90)로서 폐동맥을 cannulation 하였으며, 용액 I을 20 cm H₂O의 높이에서 관류시켜 폐의 혈액을 제거하였다. 혈액이 제거되어 폐가 희게 변하면 호흡기를 제거하고 폐만 떼어낸 후 기관지를 절개한 부위에 꽂힌 바늘을 이용하여 용액 I, 10 ml을 10회 세척하였다. 세척된 폐를 용액 I이 담겨있는 비이커에 옮긴 후 다음 단계인 폐상피세포의 분리는 무균 후드(laminar flow hood)에서 시행하였다.

3) 상피세포 분리

분리된 폐를 용액 III으로서 총폐용적(약 10 ml)만큼 채워넣은 후 용액 II가 담겨있는 비이커에 옮긴 후 37°C shaking water bath 에서 20분간 천천히 흔들리게 하였다. 그동안 용액 IV를 water bath 내에서 37°C 되게

하였다. 잘 저어진 폐를 꺼꾸로 두어 중력에 의해 폐내의 용액이 잘 흘러나오게 하고 10 ml의 용액 I로서 동일한 방법으로 중력에 의해 폐장기를 세척하였다. 이런 filling/drainng을 10회 실시함으로써 용액 III에 의한 fluorocarbon-laden macrophage를 가능한한 제거하였다.

잘 세척된 폐를 10 ml의 용액 IV로서 채운 후 shaking water bath 에서 다시 20분간 incubate 하였다. 이 과정의 elastase 처리 후 폐를 세조각으로 잘라 기도와 주기관지들을 제거하고 elastase 효소활성을 억제하기 위하여 4 ml의 NBS (newborn bovine serum)이 포함된 plastic plask로 옮겼다.

크게 잘라진 폐조직을 McIlwaintissue-chopper(Brinkmann, Westbury, NY)을 이용하여 더욱 잘게 절단하였다(1 mm³). 이렇게 잘라진 조직을 2 ml의 NBS와 5 ml의 용액 V가 들어있는 plastic flask에 옮겼으며, 더욱 분리된 세포로 만들기 위하여 10 ml의 plastic pipette를 사용하여 3회에 걸쳐 고무 섞이게 하였고 37°C shaking water bath에 2분간 강하게 진탕시켰다.

잘게 나누어진 폐세포를 한겹의 gauze, 두겹의 gauze 그리고 160 μ m와 35 μ m 구멍을 가진 nylon mesh (Tetko, Elmsford, NY)를 통하여 여과하였다. 여과과정을 거친 세포를 hemocytometer를 이용하여 숫자를 헤아린 후 metrizamide gradients 위에 조심스럽게 놓았다. 이 과정에서 crude cell mixture는 쥐 한 마리당 35~50 \times 10⁶ cells 이었으며 trypan blue exclusion 방법으로 살펴본 viability는 90% 이상을 유지하였다. Tannic acid 염색을 이용한¹⁸⁾ 제 2형 폐상피세포는 약 45%를 차지하였다.

Discontiuuous metrizamide gradient centrifuge 방법을 이용한 세포의 분리는 Sorvall swinging-bucket rotor를 사용하였으며(100 \times g, 20 min, at 4°C), 서행의 속도로 원심분리가 시작되게 하기 위해 zonal centrifugation controller를 사용하였다. 원심분리가 끝난 후 metrizamide gradient 경계부에 있는 세포를 10 ml의 pipette을 사용하여 꺼집어 낸 후 용액 I, 10 ml를 첨가하여 희석시켰다. 이렇게 부분 분리된 세포는 다시 table-top centrifuge (Dynac, Clay Adams, Parsipanny, NJ)에서 swinging-bucket rotor를 이용하여 실온하에서 100 \times g, 10분간 원심분리하여 cell pellet을 얻었으며, 용액 I, 50 ml를 첨가하여 다시 resu-

suspension 시켰다. 이 중 맨 마지막 과정을 1회 더 시행하여 8 ml의 MEMS에 resuspension 시켰고, hemocytometer로서 세포의 숫자를 헤아린 후 최종 세포의 농도가 2×10^6 cells/ml 되게 만들었다. 이 과정이 끝난 후의 세포 viability는 95% 이상이였으며, 제 2형 폐상피세포의 농도는 65~70%였으며, 취 한마리당 약 15×10^6 개의 세포를 얻을 수 있었다.

4) 폐상피세포의 일차 단일 배양막 제작

세포 부유액(2×10^6 cells/ml) 0.25 ml를 culture-treated Nucleopore filter cups (6 mm outer diameter, 0.4 μ m pore size, Transwell, Costar, Cambridge, MA)의 내측에 두고, 외측에는 1 ml의 MEMS로 채웠다. Plating한 날을 제 0일로 계산하였으며, 세포를 CO₂ incubator (Model 3185, Forma Scientific, Marietta, OH)에서 37°C (5% CO₂ in air)로 유지하였다. 제 2일째가 되는 날에 confluent cell monolayer의 내외측의 용액을 모두 제거한 후 신선한 MEMS 용액으로 갈아줌으로서 배양 filter에 붙지 않은 세포(주로 백혈구)를 제거하였다. 이후 이 배양 단일막은 2일 또는 3일 간격으로 신선한 MEMS 용액으로 갈아주었다. 이들 배양된 단일막의 순도는 90% 이상이 제 2형의 폐상피세포이었다.

2. 물질이동 연구

일반적으로 상피세포에서의 물질이동의 연구의 한 방법으로는 생체 전기적 특성인 전압차(PD, potential difference), 세포막을 통한 능동적 이온이동의 대수적 합이라고 알려져 있는 I_{sc} (SCC, short-circuit current), 그리고 조직의 전기저항(R, resistance)을 측정하여 상피세포의 물질이동을 간접적으로 연구할 수 있다.

따라서 본 연구에서도 제 3일부터 제 6일까지의 일차 배양 단일막을 수정 고안된 Ussing chamber에¹⁰⁾ 설치하여 생체 전기적 특성인 전압차, I_{sc} 및 조직의 전기저항을 측정하여 폐상피세포막을 통한 물질이동을 간접적으로 측정하였다.

폐상피세포의 공기측(apical side)과 혈액측(basolateral side)에 각각 7 ml의 MEMS 용액(preincubated with 5% CO₂ in air, 37°C)을 첨가하고 습기가 있는 5% CO₂ 기기를 계속 노출시켜 pH를 7.4로 유지시켰다. 폐상피세포막을 경계로한 막전압은 한쌍의 calomel half cells로서 측정하였으며, PE 90 tubing을 agar

bridge로 하여(3% in 3M KCl) 그 한쪽 끝이 단일막 표면에서 2 mm 되는 곳에 위치하게 하였다. 전류(short-circuit current 포함)는 다른 agar bridges와 한쌍의 Ag/AgCl electrodes를 이용하여 단일막 내외에 가하였다. 전류가 흐르는 agar bridges의 한쪽 끝은 단일막에서 멀리 떨어진 부위(약 2.5 cm)에 위치하게 하였다.

저절로 발생하는 transmonolayer potential difference (PD)를 상쇄하기 위하여 단일막을 automatic voltage clamp device를 이용하여(DVC 1000, World Precision Instruments, Sarasota, FL) short-circuit 하였다(즉 막을 경계로하여 자발적으로 발생하는 전압과 크기는 같으나 방향이 반대인 외부 전압을 가함). 이런 조건에서 전류의 흐름인 short-circuit current (I_{sc})를 실험 기간 동안에 측정하였으며, 5분 간격으로 5초 동안 PD를 알기위해 잠시 I_{sc}의 측정을 중단하였다. 막을 경계로한 조직의 저항(R)은 Ohm의 법칙에 따라 ($R = PD/I_{sc}$) 계산하였다.

3. Catalase 활성도의 측정

폐상피세포에서의 catalase 활성도는 수정된 polarographic 방법으로¹⁰⁾ 측정하였는데 간단히 요약하면 다음과 같다. 100% 질소가스로 15분간 preincubation 되어 있는 50 mM phosphate 완충용액(Na₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 7.0, 25°C) 1 ml가 들어있는 plastic test tube에 20 μ l의 3% H₂O₂를 첨가하여 Clark-type oxygen microelectrode (Microelectrodes, Londonderry, NH)를 이용하여 H₂O₂의 자발적인 decomposition 율을 측정하였다. H₂O₂의 self-decomposition 율이 안정상태를 이루는 3분 후에(0.01 μ moles of O₂/ml/min) 일정량의 catalase (Sigma, St. Louis, MO)를 반응 tube에 넣어 catalase에 의해 만들어지는 산소발생율을 측정하였다. 이 산소발생율은(μ l O₂/ml versus time) self-decomposition으로 보정하였고 calibration curve (μ moles O₂/min versus enzyme concentration)를 만들어 계산하였다.

폐상피세포와 관련된 catalase 활성도의 측정에 있어서는, 먼저 단일막을 냉각된 50 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 세번 세척하고 1% Triton X-100(최적용적 0.5 ml)으로 처리하였다. 이렇게 solubilized된 폐상피세포(sample 용적 0.05~0.1 ml)를 상기 기술한 방법대로 측정하였으며, 효소 활성도는

단일막의 단백질 농도에 따라 나타내었다. 단백질농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로하고 수정된 Lowry 방법(DC protein kit, BioRad, Richmond, CA)으로 측정하였다.

4. H₂O₂의 농도 측정

용액내의 H₂O₂의 농도 변화를 측정하기 위하여 Zaitso와 Ohkura의 방법을²⁰⁾ 사용하였다. Horseradish peroxidase (HRP)와 H₂O₂가 반응할 때 형광물질의 기질로서 3-(p-hydroxyphenyl)-propionic acid (HPPA)를 사용하였다. 7.5 mM HPPA 0.2 ml, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml, 2.0 U/ml HRP 0.1 ml의 혼합액이 들어 있는 1회용 cuvette에 0.1부터 10 nmol의 H₂O₂ 0.1 ml의 측정용액을 첨가하여 2분간 실온에서 방치하였다. Perkin-Elmer LS-5 spectrofluorometer (New Haven, CT)를 이용하여 형광도를 측정하였는데 emission 파장은 404 nm (slit width, 10 nm)이었으며 excitation 파장은 320 nm (slit width 2 nm)로 하였다.

5. 활성산소에 의한 폐상피장벽의 손상

세포배양을 통해 만들어지는 monolayer를 이용하여 물질이동을 전기생리화학적 방법으로 측정할 수 있으며 이들 물질이동에 영향을 미치는 활성산소 중 하나인 H₂O₂ (hydrogen peroxide)를 배양막의 공기가 노출되는 쪽인 apical side와 혈액쪽인 basolateral side에 각각 투여함으로써 이 물질이 폐상피세포층의 어느 세포막 부위에 손상을 주는지를 연구할 수 있을 것이다. 또한 활성산소를 제거하는 효소인 catalase의 억제제인 aminotriazole (ATAZ, 20 mM)의 효과도 함께 살펴 봄으로서 그 조절기전을 연구할 수 있다.

6. Na⁺, K⁺-ATPase 활성도의 측정

세포배양을 통해 만들어지는 폐상피세포의 monolayer에서 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도를 측정하기 위하여 basolateral side에 ouabain (1 mM) 존재시 용액에서 세포내로 uptake 되는 ⁸⁶Rb 양을 측정하였다. 배양 4일째 된 monolayer를 HEPES 완충용액(mM; 120 NaCl, 5 RbCl, 1 MgSO₄, 0.15 Na₂HPO₄, 0.2 NaH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 5 glucose, 20 HEPES, 0.1 bovine serum albumin, pH 7.4)으로 3번 세척한 후

37°C에서 2시간동안 incubation 하였다. 이 incubation 용액에 1 mM의 ouabain이 들어있거나 들어있지 않은 대조용액을 첨가하여 다시 30분간 incubation 하였다. 이런 상태에서 monolayer의 apical 또는 basolateral 측에 0.1 mM의 H₂O₂를 가하여 60분간 incubation한 후 ⁸⁶RbCl(최종 농도 5 μCi/ml)를 basolateral 용액에 가하고 5분간 incubation 하였다. 이와같은 실험이 끝난 monolayer는 차게 해둔 PBS 용액으로 3번 세척하고 0.5% Triton X-100 (0.5 ml/monolayer)를 가하여 실온에 30분간 방치하여 폐상피세포를 녹였다. 이 녹은 용액에서의 ⁸⁶Rb 활성도는 scintillation spectrometer (MINAXI, Packard, Downer Grove, IL)에서 측정하였으며, ouabain-sensitive ⁸⁶Rb uptake를 Na⁺, K⁺-ATPase 활성도로 하였고 nmol ⁸⁶Rb/mg protein/min의 단위로 표시하였다.

7. 통계적 처리

그림 1부터 4까지에 제시된 실험에서 얻은 자료인 ATAZ가 존재할 때와 존재하지 않을 때의 결과 차이는 unpaired t-test로 분석하였으며, 그림 5부터 8까지에 제시된 실험자료인 0.1~0.2 mM H₂O₂와 1~1 mM H₂O₂ 존재시 apical side 에서와 basolateral side에서의 차이는 one-way analyses of variance에 의하여 분석하였으며, p<0.05 이상인 것을 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

1. 폐상피세포 단일막의 전기적인 특성

제3 및 4일째의 폐상피세포 배양 단일막은 안정시 short-circuit current (I_{sc})가 4.8±0.2 μA/cm² 발생하였고, 세포막을 경계로한 조직저항(R)은 2.04±0.05 Kohm-cm²을 나타내었으며, 막내외의 전압차(PD)는 10.2±0.5 mV였으며, 이들 값은 Kim *et al*의 보고와^{10,11)} 거의 일치하였다.

2. Short-Circuit Current (I_{sc})에 대한 H₂O₂의 영향

1) Apical Side에 대한 H₂O₂의 영향

Fig. 1은 H₂O₂를 폐상피세포 단일막의 apical side에 가하게 될 때 나타나는 I_{sc}의 변화를 시간적 경과에 대해

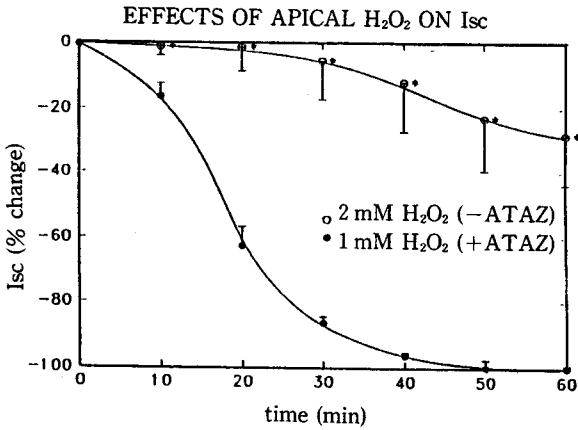


Fig. 1. Time course of active ion transport (Isc) when H₂O₂ is added apically. Ordinate represents the relative change in active ion transport compared to the baseline value. As can be seen, apical 2 mM H₂O₂ (in the absence of ATAZ, denoted by unfilled circles) causes a gradual decrease in Isc over time. Note that inclusion of ATAZ with apical 1 mM H₂O₂ exposure (depicted with filled circles) causes a greater decrease in active ion transport compared to that observed in the absence of ATAZ at 2 mM H₂O₂.
* = significantly different from +ATAZ at corresponding time point.

나타낸 것이다. Catalase 억제제인 ATAZ가 존재하지 않을 시 H₂O₂ 2mM은 폐상피세포 단일막을 통한 능동적 이온의 이동을(Isc) 점차 감소시켰다(60분에 30%). ATAZ가 존재할 때 1mM의 H₂O₂를 apical medium에 첨가한 경우, ATAZ가 존재하지 않은 H₂O₂ 2mM에서 관찰된 것과 비교하면 Isc의 감소는 더욱 현저하였다. ATAZ 자체가 폐상피세포 단일막에 미치는 영향을 보기 위해서 H₂O₂가 존재하지 않는 조건에서 ATAZ만 든 경우는 Isc와 R값 모두 변화를 보이지 않았다.

2) Basolateral Side에 대한 H₂O₂의 영향

Fig. 2은 H₂O₂ 0.1mM을 폐상피세포 단일막의 basolateral side에 가하게 될 때 나타나는 Isc의 변화를 시간적 경과에 대해 나타낸 것이다. Catalase 억제제인 ATAZ가 존재하지 않을 때와 ATAZ가 존재할 때 Isc 감소 양상은 거의 같이 나타나므로 이 경우 catalase에 대한 효과는 미치지 않았다.

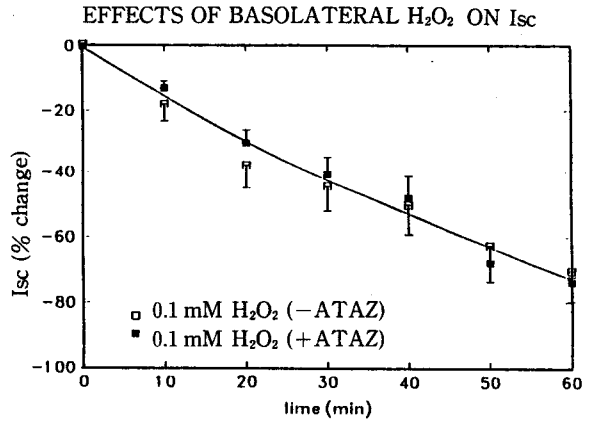


Fig. 2. Time courses of active ion transport (Isc) when H₂O₂ is given basolaterally. Data are denoted by unfilled squares in the absence of ATAZ and filled squares in the presence of ATAZ in the bathing medium. ATAZ has no effect on Isc in response to basolateral 0.1 mM H₂O₂.

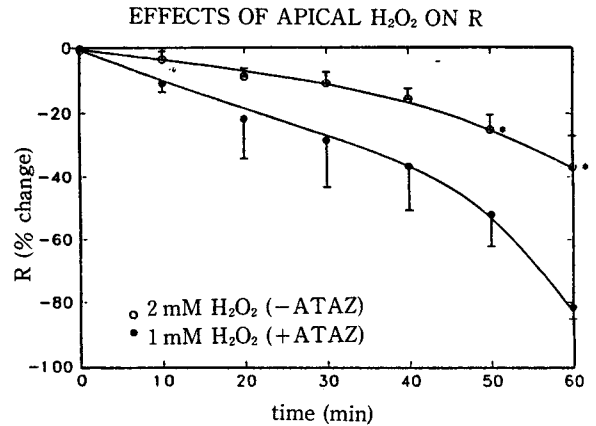


Fig. 3. Time courses of transepithelial resistance (R) when H₂O₂ is added apically. Ordinate represents the relative change in R compared to the baseline value. The experimental conditions are the same as those in Fig. 1. Unfilled circles represent the data obtained in the absence of ATAZ, while filled circles depict those in the presence of ATAZ in the apical bathing medium. As can be seen, apical 1 mM H₂O₂ in the presence of ATAZ causes a greater decrease in R than apical 2 mM H₂O₂ in the absence of ATAZ.
* = significantly different from +ATAZ at corresponding time point.

3. Tissue Resistance (R)에 대한 H₂O₂의 영향

1) Apical Side에 대한 H₂O₂의 영향

Fig. 3은 H₂O₂를 폐상피세포 단일막의 apical side에 가하게 될 때 나타나는 R의 변화를 시간적 경과에 대해 나타낸 것이다. ATAZ가 존재하지 않을 시 H₂O₂ 2 mM은 폐상피세포 단일막의 조직저항을 점차 감소시켰다(60분에 40%). 반면에 ATAZ가 존재할 때 1 mM의 H₂O₂를 apical medium에 첨가한 경우 R의 감소는 더욱 현저하여 60분에 약 85%가 감소하였다. 이 R의 감소는 50분과 60분에서 ATAZ에 대한 효과가 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.

2) Basolateral Side에 대한 H₂O₂의 영향

Fig. 4에서 보는 바와 같이 H₂O₂ 0.1 mM을 폐상피세포 단일막의 basolateral side에 가하게 될 때 나타나는 R의 변화를 시간적 경과에 대해 보면, ATAZ가 존재하지 않을 때와 ATAZ가 존재할 때 모두 R은 현저히 변화하여 60분에 약 80내지 90% 감소시켜 catalase에 대한 효과는 미치지 않았다.

EFFECTS OF BASOLATERAL H₂O₂ ON R

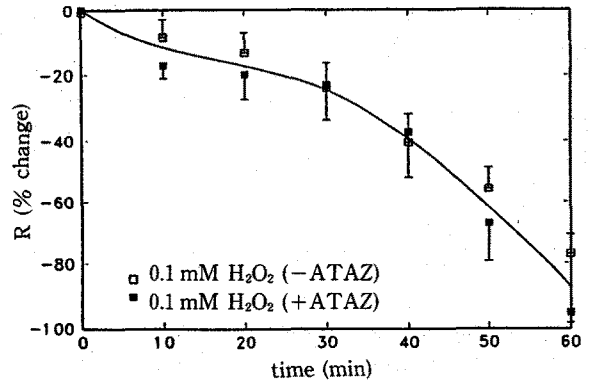


Fig. 4. Time courses of transepithelial resistance (R) when 0.1 mM H₂O₂ is given basolaterally. The experimental conditions are the same as in Fig. 2. Unfilled squares denote the data observed in the absence of ATAZ, while filled squares represent those in the presence of ATAZ. ATAZ has no effect on R in response to basolateral 0.1 mM H₂O₂.

EFFECTS OF APICAL EXPOSURE TO H₂O₂ ON I_{sc}

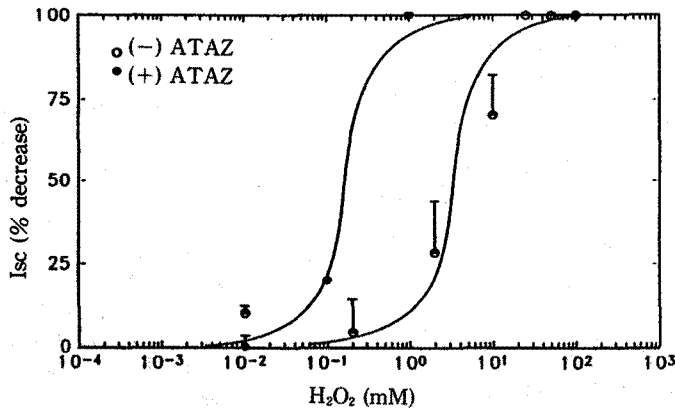


Fig. 5. Dose-response curve for active ion transport (I_{sc}) versus apical [H₂O₂]. Unfilled circles represent the decreases in I_{sc} observed at 60 min in the absence of ATAZ, while filled circles denote those estimated in the presence of ATAZ. The effective concentration of H₂O₂, at which a half-maximal decrease (ED₅₀) in active ion transport is attained at 60 min, is about 4 mM. When ATAZ is present in the apical bathing medium, the ED₅₀ for active ion transport is lowered by about 10 times to about 0.4 mM. See text for discussion of statistical differences between apical and basolateral exposures (Fig. 5 and 7).

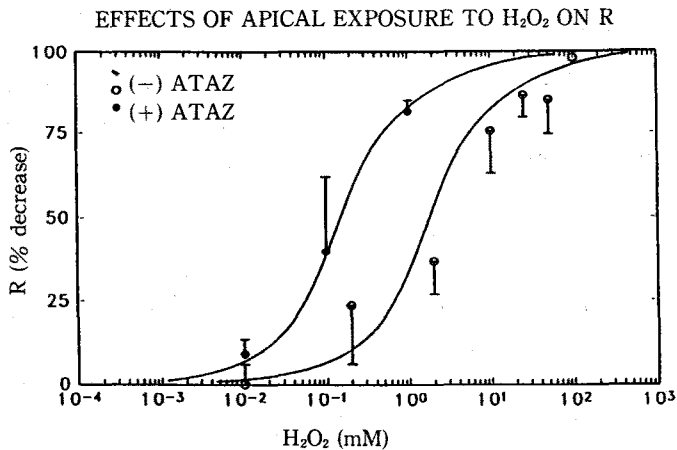


Fig. 6. Dose-response curve for monolayer resistance (R) versus apical [H₂O₂]. Open circles denote the decreases in R at 60 min in the absence of ATAZ, while filled circles represent those in the presence of ATAZ. An ED₅₀ for R of about 2.5 mM can be noted for those data obtained in the absence of ATAZ. When ATAZ is present in the apical bathing medium, the ED₅₀ for R is lowered by about 10 times to about 0.25 mM. See text for discussion of statistical differences between apical and basolateral exposures (Fig. 6 and Fig. 8).

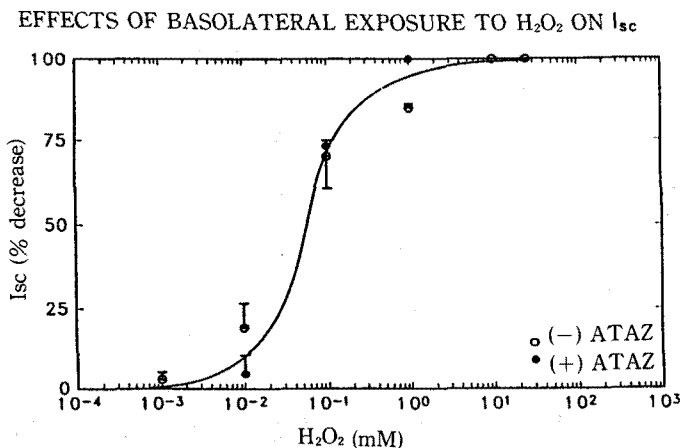


Fig. 7. Dose-response curve for active ion transport (I_{sc}) versus basolateral [H₂O₂]. Unfilled circles denote the decreases seen at 60 min in the absence of ATAZ, while filled circles depict those in the presence of ATAZ. The ED₅₀ for I_{sc} in the absence of ATAZ is about 0.04 mM. When ATAZ is present in the basolateral fluid, the ED₅₀ does not change and the dose-response curve is superimposed on that in the absence of ATAZ. See text for discussion of statistical differences between apical and basolateral exposures (Fig. 5 and 7).

4. H₂O₂ 농도에 따른 Isc 및 R의 변화

1) Apical side에 대한 H₂O₂의 영향

H₂O₂의 농도에 따른 Isc와 R의 변화를 dose-response curve로 나타내기 위하여 Fig. 5 부터 Fig. 8 까지는 H₂O₂ 첨가후 60분에서 나타나는 변화치를 취하였다. 전체적으로 보아 Isc와 R값 모두 농도에 따라 감소하는 양상을 보였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 H₂O₂를 apical side에 작용시킬 경우, Isc를 50% 감소시키는 농도(ED₅₀)는 4 mM 이었다. 세포내 catalase 활성을 억제시킨 상태에서(ATAZ 존재시) Isc에 대한 ED₅₀은 훨씬 낮아 0.4 mM 값을 보였다. 한편 R 값에 있어서는(Fig. 6), R을 50% 감소시키는 농도(ED₅₀)는 3 mM이었으며, ATAZ 존재시 ED₅₀은 훨씬 낮아 0.3 mM 값을 보였다.

2) Basolateral Side에 대한 H₂O₂의 영향

H₂O₂를 basolateral sidedp 작용시킬 경우(Fig. 7), Isc에 대한 ED₅₀는 0.04 mM로서 ATAZ 존재시 Isc에 대한 ED₅₀ 값과 차이를 보이지 아니하였고, R 값에 있어서도(Fig. 8), ED₅₀는 0.06 mM로서 Isc와 마찬가지로 ATAZ의 효과는 나타나지 않았다.

3) Isc 변화에 대한 Apical과 Basolateral Side의 비교

60분에 측정된 Isc의 감소(Fig. 5, 7)를 통계적으로 비교해 보면, ATAZ가 존재하지 않을 때 1~2 mM의 H₂O₂를 apical side에 가하게 되면 basolateral side에 가하는 것보다 약간 덜 감소하는 경향을 보였다. 그러나 ATAZ가 존재할 때는 이 범위의 농도에서 apical side 및 basolateral side 모두 거의 100%까지 Isc가 감소하여 차이를 나타내지 않았다. 그러나 0.1~0.2 mM의 H₂O₂ 농도에서는 ATAZ의 존재 유무에 관계없이 apical side에서의 Isc의 감소가 basolateral side에서의 감소보다 적었다.

4) R 변화에 대한 Apical과 Basolateral Side의 비교

60분에 측정된 R의 감소(Fig. 6, 8)를 통계적으로 비교해 보면, ATAZ가 존재하지 않을 때 1~2 mM의 H₂O₂를 apical side에 가하게 되면 basolateral side에 가하는 것보다 약간 덜 감소하는 경향을 보였으나, ATAZ가 존재할 때는 이 범위의 농도에서 apical side 및 basolateral side 모두 거의 100%까지 Isc가 감소하여 차이를 나타내지 않았다. 그러나 0.1~0.2 mM의 H₂O₂

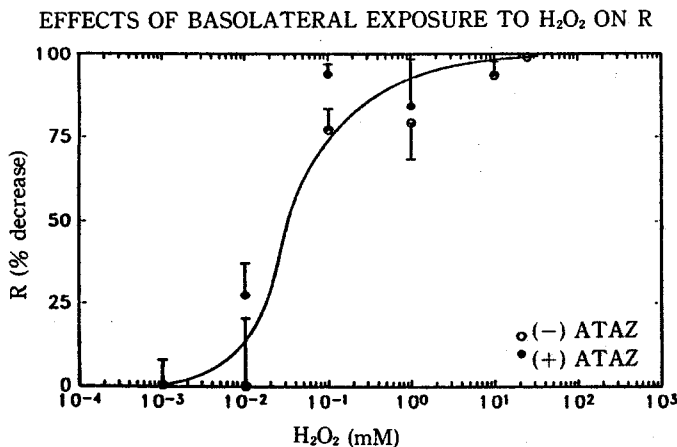


Fig. 8. Dose-response curve for monolayer resistance (R) versus basolateral [H₂O₂]. Unfilled circles represent the decreases in R estimated at 60 min, while filled circles denote those in the presence of ATAZ. The ED₅₀ for R in the absence of ATAZ is about 0.06 mM. When ATAZ is present in the basolateral fluid, the ED₅₀ does not change and the dose-response curve is superimposed on that in the absence of ATAZ. See text for discussion of statistical differences between apical and basolateral exposures (Fig. 6 and 8).

농도에서는 ATAZ의 존재유무에 관계없이 apical side에서의 Isc의 감소가 basolateral side에서의 감소보다 훨씬 적었다.

Fig. 5부터 Fig. 8까지의 결과를 통계적으로 분석하여 종합해 보면 폐상피세포 배양단일막이 외부의 H_2O_2 에 노출될 때 basolateral side가 apical side에 비하여 더욱 감수성이 좋다고 할 수 있다.

5. Catalase 활성도의 변화

신선하게 분리된 제 2형의 폐상피세포의 catalase 활성도는 73 U/mg protein이었으며, 용액내에서의 catalase 활성도는 없었다. 제 2일에서의 catalase 활성도는 103 U/mg protein이었으며 제 4일에서는 137 U/mg protein이었다(Fig. 9).

6. H_2O_2 의 농도 측정

H_2O_2 가 apical side의 용액 또는 basolateral side에 존재할 때 그 변화는 모두 같은 비율로 감소하였으며, $10 \mu M$ 의 H_2O_2 가 blank filter 하에서의 self-decomposition으로 보정된 감소율은 시간당 12%였다. 이 감소는 H_2O_2 가 빠르게 폐상피세포로 확산해 들어간 후 세포내에 존재하는 catalase에 의해 일차적으로 degradation된 것이다.

7. Na^+, K^+ -ATPase 활성도의 변화

폐상피세포 단일막내로의 총 ^{86}Rb 유입율은 57.9 pmol/min/mg protein이었으며 ouabain 존재시에는 37.8로 감소되어 그 차이는(ouabain-sensitive ^{86}Rb uptake, Na^+, K^+ -ATPase 활성도) 20.1이었다. 0.1 mM의 H_2O_2 가 apical side에 존재할 때의 차이는 13.4로서 apical side에 있는 H_2O_2 는 H_2O_2 가 없을 때에 비하여 Na^+, K^+ -ATPase 활성도를 34% 감소시킨 것을 의미한다. 한편 같은 농도의 H_2O_2 가 basolateral side에 존재할 때는 차이가 0.8로서 Na^+, K^+ -ATPase 활성도를 96% 감소시켰다. 즉 이 결과는 폐상피세포 배양단일막이 외부의 H_2O_2 에 노출될 때 basolateral side가 apical side에 비하여 Na^+, K^+ -ATPase 활성도를 더욱 불활성화시킨다고 할 수 있다.

고 찰

본 연구는 쥐의 폐상피세포 일차 배양 단일막에서 H_2O_2 가 apical side 또는 basolateral side에 존재할 때 상피세포가 가지는 장벽의 전기적 특성(Isc와 R)을 관찰하였다. H_2O_2 는 농도의존성으로 시간에 따라 능동적 이온 이동과 조직저항을 감소시켰다. H_2O_2 가 apical side

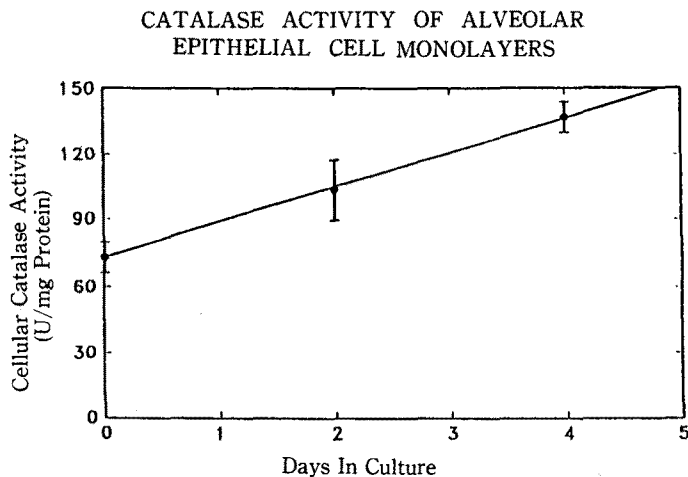


Fig. 9. Catalase activity of alveolar epithelial cell monolayers as function of day in culture. Catalase activity was estimated by polarographic measurement of O_2 liberation from H_2O_2 liberation from H_2O_2 substrate versus time.

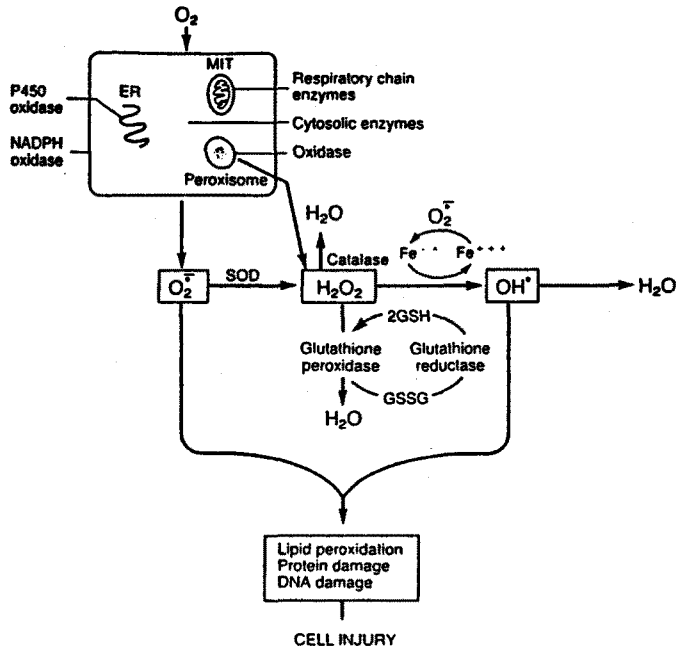


Fig. 10. Formation of reactive oxygen species and anti-oxidant mechanisms in biologic systems.

에 있을 때 Isc와 R에 대한 ED_{50} 은 약 4 mM로서 H_2O_2 가 basolateral side에 있을 때와 비교하여 약 100배 낮았다. Catalase 억제제인 aminotriazole (ATAZ)은 H_2O_2 가 apical side에 작용할 때 그 감수성을 약 10배 증가시켰다. 한편 H_2O_2 가 basolateral side에 작용할 때는 ATAZ의 효과는 나타나지 않았다. 이들 결과는 다음 사실은 나타내 준다고 할 수 있다. 첫째 H_2O_2 는 농도의존성으로 Isc와 R 감소시켰다. 둘째 basolateral side에 H_2O_2 가 있을 때 Isc와 R의 변화는 훨씬 현저하였다. 마지막으로 catalase 억제제인 aminotriazole은 H_2O_2 의 apical side에서의 효과를 더 크게 나타내었다.

이렇게 관찰된 결과를 설명할 수 있는 한 가설로는, 폐상피세포의 basolateral side에 있는 H_2O_2 가 상피세포의 basolateral 측에 존재하는 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성도를 감소시키고 이는 상피세포의 tight junction의 장애를 초래하고 결국은 능동적 이온의 이동(Isc)과 조직저항(R)의 감소를 나타내게 된다는 것이다. 이 가설은 단일막의 basolateral side에 H_2O_2 가 존재할 때 나타나는 Isc와 R의 변화가 현저하며 catalase 억제제의 효과도 나타나지 않았다는 사실을 일부분 설명해 줄 수 있다. 뿐만 아니라 ouabain-sensitive ^{86}Rb uptake도

basolateral side에 H_2O_2 가 존재할 때 더욱 감소한다는 근거도 될 수 있다.

폐상피세포 양측 용액에서 동일한 율로 H_2O_2 가 소모되는 것으로 보아 catalase의 분포와 작용에 있어서 막 양측의 차이는 없는 것으로 생각할 수 있다. 이는 apical side에 존재하는 H_2O_2 가 basolateral side의 H_2O_2 에 의하여 직접 손상을 받는 세포막 부분에도 도달하기 전에 이미 세포내 catalase에 의하여 제거된다고 생각할 수 있다. 그러므로 단일막에 존재하여 apical side가 H_2O_2 에 노출될 때 단일막을 보호하는 기능을 가진 세포내 catalase가 있다고 생각된다.

본 실험에서 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도를 나타내는 ouabain-sensitive ^{86}Rb uptake는 0.1 mM의 H_2O_2 가 basolateral side와 apical side에 존재할 때 각각 34%와 96%로 감소하였는데, 이는 같은 농도의 H_2O_2 가 Isc를 각각 30%와 96%로 감소시킨 정도가 거의 같아 폐상피세포 단일막에서 측정된 Isc의 변화는 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도의 변화를 반영한다고 할 수 있다. Clerici 등은²¹⁾ plastic에서 자라게한 쥐 제2형 폐상피세포에서 2.5 mM의 H_2O_2 는 ouabain (0.5 mM)-sensitive ^{86}Rb uptake를 30% 감소시킨다고 보고한 바 있

어 본 연구의 결과와 동일하였다.

본 연구에서 측정된 H_2O_2 의 소모율은 세포 양측 모두에서 동일하여 외부에서 세포의 어느 측에 H_2O_2 를 작용시키는 것과는 상관없이 폐상피세포에 존재하는 catalase에 의하여 대부분 제거될 수 있다는 것을 의미하며, 이는 쉽게 확산되어 들어온 H_2O_2 가 어느 쪽에 존재하던 세포내 catalase는 똑같이 처리할 수 있다는 것을 의미한다. Simon등은²²⁾ plastic 에서 자란 제 2일과 제 7일의 폐상피세포 단일막(표면적 0.3 cm^2)에 $50\ \mu\text{M}$ 의 H_2O_2 를(0.2 ml) 작용시키면 각각 54%와 40%로 H_2O_2 농도가 감소한다고 보고하여 이 H_2O_2 의 시간당 제거율은 본 실험의 결과와 동일하였다(즉, 0.33 cm^2 의 표면적, $10\ \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ in 5 ml chamber).

분리된 쥐 폐상피세포의 배양 제 0일, 제 2일과 제 4일에 측정된 catalase 활성도는 각각 73, 103 137 U/mg protein 이었는데, 일반적으로 catalase 활성도는 신선한 경우 0.6 U/mg protein ²³⁾ 부터 110 U/mg protein ²⁴⁾까지 큰 변화폭을 보고하고 있다. 그러나 배양된 폐상피세포의 catalase 활성도는 제 4일까지 94%까지 감소한다고 일반적으로 보고되고 있으나²²⁻²⁸⁾, 본 실험에서는 도리어 증가하는 경향을 보였다. 이 차이에 대한 이유는 명확하지 않으나 다른 보고자들은 모두 plastic 하에서 배양하였으나 본 실험 조건은 porous filter 조건하에서 배양하였다. 이 catalase 활성도의 측정과 병행하여, Simon등²²⁾과 Kinnula등은²⁶⁾ 전자 현미경과 조직화학적 방법을 동원하여 *in situ*와 *in vitro* 에서 catalase는 주로 일차적으로 제 2형 폐상피세포의 peroxisome에 존재한다고 하였다.

H_2O_2 가 세포기능에 장애를 초래하게 되는데 있어 상피세포의 종류에 따라 다른 양상을 보이고 있다. 예를 들면 culture-treated polycarbonate filter 에서 배양된 제 7일의 Caco-2 세포의 단일막에 10 mM 의 H_2O_2 를 apical과 basolateral side에 작용시킨 결과(Suh, D.J. and Kim, K.J., 미발표 결과), 60분에서도 Isc와 R 모두 유의한 변화를 나타내지 않았다. 또한 Matalon *et al*²⁹⁾은 분리된 개구리의 복부 피부 상피세포에서 효소의 작용에 의하여 생성되는 활성산소(H_2O_2 도 포함)를 작용시켜 본 결과, apical side에 이들이 존재할 경우 60분에 Isc는 50% 감소되었으나 R은 65%까지 증가시켰고 basolateral side에 작용시킬 때는 아무런 효과가 없다고 보고하여, apical side에 활성산소가 그쪽에 존재하

는 Na^+ channel의 장애를 가져와 개구리 피부 상피세포에서의 능동적 이온의 이동을 감소시키며 조직저항을 증가시킨다고 하였다.

일반적으로 lower respiratory tract와 그 air space는 산화제와(oxidant)와 free radical에 의한 손상에 대한 방어 기전이 있다고 알려져 있다³¹⁾(Fig. 10). 예를 들면, 포유류의 lower respiratory tract를 lining 하고 있는 용액은 catalase, ceruloplasmin, transferrin, glutathione^{14,31-35)}과 같은 endogenous antioxidant를 가지고 있다. 이들 연구자들의 결과와 본 실험의 결과는(apical side의 H_2O_2 가 폐장벽에 손상을 잘 가하지 못하는 결과), 정상 조건하에서 포유류의 lower respiratory tract(특히 폐상피세포)는 oxidant injury에 대하여 저항성을 보이고 있다는 사실을 강력히 시사한다. 한편 폐상피세포 장벽의 basolateral side에 H_2O_2 가 존재할 때는 직접 transport-related protein(예, Na^+ , K^+ -ATPase)에 작용하거나 또는 tight junctional protein 분자의 변화를 초래하여 폐상피세포 장벽의 일반적인 특성에 장애를 가져올 수도 있을 것이다.

요 약

연구배경 : 정상 폐상피세포에서는 항상 생성되고 있는 활성산소(oxygen radical)에 의한 유해작용에 노출되어 있고, 이들 유해 산소들은 폐기종과 같은 폐질환의 원인 기전으로 생각되고 있다. 본 연구에서는 이 방법을 이용하여 만든 폐상피세포 단일막에서 전기생리학적 관점에서 물질의 이동지표인 short-circuit current (Isc)와 조직저항(R)에 대한 활성산소의 하나인 H_2O_2 (hydrogen peroxide)가 어떤 영향을 미치는지를 연구함으로써 세포생리학적 기전을 구명하고자 한다.

방법 : Tissue culture-treated polycarbonant membrane filter 에서 배양시킨 쥐 제 2형 폐상피세포 배양 단일막에서 H_2O_2 의 능동적 이온 이동(Isc)과 수동적 용질이동에 대한 조직저항(R)에 미치는 효과를 관찰하였다. 배양 제 3일과 제 4일째 단일막을 수정된 Ussing chamber에 설치하고 막 양측에 HEPES-buffered Ringer 용액으로 incubation 하였다. 외부에서 $0\sim 100\text{ mM}$ 농도의 H_2O_2 를 apical 또는 basolateral side에 작용시켜 Isc와 R의 변화를 관찰하였다. 폐상피세포 장벽이 외부의 H_2O_2 에 대하여 방어작용을 가지는 세포내

catalase 활성도를 측정하고, catalase 억제제인 aminotriazol (ATAZ) 20 mM의 효과도 함께 관찰하였다.

결과 : 이 단일막은 형태학적으로 보아서 *in vivo* 에서의 포유류 제 1 형 폐상피세포 장벽의 특성을 나타내고 세포들 사이는 tight junction을 이루며 (조직저항 R: 2, 000 ohm-cm² 이상) sodium ion의 능동적 이동 (Isc: 5 μ A/cm²)을 보였다. H₂O₂는 dose-dependent 양식으로 Isc와 R 모두 감소시켰다. Apical side에 작용하는 H₂O₂에 있어서는 60분에 50% 억제하는 농도인 ED₅₀는 Isc와 R은 약 4 mM이었으나 basolateral side의 경우는 약 0.04 mM로서 그 작용 강도는 apical에 비하여 약 100배 정도 더 컸다. ATAZ 존재시 apical side의 ED₅₀는 0.4 mM로 감소하였으나 basolateral side의 경우 변화가 없었다. H₂O₂의 제거율은 apical 또는 basolateral side 어느 쪽에 존재하든 같았으며, 세포내 catalase 활성도는 세포배양 기간이 길어짐에 따라 증가함을 보였다.

결론 : 이상의 실험결과는 basolateral side에 작용하는 H₂O₂는 세포내 막구성성분 중 basolateral 측에 존재하는 곳에 (예, Na⁺, K⁺-APTase) 직접 장애를 미칠 것으로 생각된다. 한편 apical side에 작용하는 H₂O₂는 막성분에 도달하기 전에 세포내에 존재하는 catalase에 의하여 대부분 그 작용을 잃게 된다. 결론적으로 Isc와 R로 측정된 폐상피세포 장벽의 특성은 H₂O₂에 의하여 손상을 받고 apical side 보다는 basolateral side 측정이 더 손상을 잘 받게 된다.

REFERENCES

- 1) Taylor AE, Gaar KA: Estimation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membrane. *Am J Physiol* 218:1133, 1970
- 2) Normand ICS, Olver RE, Reynolds EOR, Strang LB: Permeability of lung capillaries and alveoli to non-electrolytes in the fetal lamb. *J Physiol (Lond)* 219: 303, 1971
- 3) Theodore J, Robin ED, Gaudio R, Acevedo J: Transalveolar transport of large polar solutes (sucrose, inulin and dextran). *Am J Physiol* 229:989, 1975
- 4) Wangesteen OD, Wittmers LE Jr, Jonson JJ: Permeability to the blood-gas barrier and its components. *Am J Physiol* 216:719, 1969
- 5) Nickerson PA, Matalon S, Farhi LE: An ultrastructural study of alveolar permeability to cytochrome C in the rabbit lung. *Am J Pathol* 102:1, 1981
- 6) Pietra GG, Szidon JP, Leventhal MM, Fishman AP: Hemoglobin as a tracer in hemodynamic pulmonary edema. *Science* 166:1643, 1968
- 7) Schneeberger-Keely EE, Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of alveolarcapillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer. *J Cell Biol* 37:781, 1968
- 8) Schneeberger EE, Karnovsky MJ: The influence of intravascular fluid volume on the permeability of newborn and adult mouse lungs to ultrastructural protein tracers. *J Cell Biol* 49:319, 1971
- 9) Cheek JM, Kim KJ, Crandall ED: Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: Bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol* 256:C688, 1989
- 10) Kim KJ, Cheek JM, Crandall ED: Contribution of active Na⁺ and Cl⁻ fluxes to net ion transport by alveolar epithelium. *Resp Physiol* 85:245, 1991
- 11) Kim KJ, Suh DJ, Lubman RL, Danto SI, Borok Z, Crandall ED: Studies on the mechanisms of active ion fluxes across alveolar epithelial cell monolayers. *J Tiss Cult Meth* 14:87, 1992
- 12) Fishman AP, Renkin EM (eds): *Pulmonary Edema*. Bethesda, American Physiological Society, 1979
- 13) Staub NC: Pulmonary edema. *Physiol Rev* 54:678, 1974
- 14) Pryor WA, Dooley MM, Church DR: The mechanisms of the human alpha-1-proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. *Adv Free Radical Biol Med* 2:161, 1986
- 15) Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107:396, 1982
- 16) Fein A, Grossman RF, Jones JG, Overland E, Pitts L, Murray JF, Staub NC: Value of edema fluid protein measurement in patients with pulmonary edema. *Am J Med* 67:32, 1979
- 17) Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley, JCW, Veall N: Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet (JAN)* 12:66, 1980
- 18) Mason RJ, Williams MC, Widdicomb JH, Sands MJ, Misfeldt DS, Berry CC Jr: Transeptithelial transport by pulmonary alveola type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6033, 1982
- 19) del Rio LA, Ortega MG, Lopez AL, Gorge JL: A

- more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**: 409, 1977
- 20) Zaitso K, Ohkura Y: New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: Rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and peroxidase. *Anal Biochem* **109**:109, 1980
 - 21) Clerici C, Friedlander G, Amiel C: Impairment of sodium-coupled uptakes by hydrogen peroxide in alveolar type II cells: Protective effect of d-alpha-tocopherol. *Am J Physiol* **262**:L542, 1992
 - 22) Simon RH, Edwards JA, Reza MM, Kunkel RG: Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H₂O₂: Dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol* **260**:L318, 1991
 - 23) Panus PC, Burgess B, Freeman BA: Characterization of cultured alveolar epithelial cell xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochim Biophys Acta* **109**: 303, 1991
 - 24) Cheek JM, Li C, Morin D, Buckpitt AR, Plopper CG: Antioxidant enzyme activities of alveolar epithelial cells culture in serum-free medium (abstract). *Am Rev Respir Dis* **145**:A574, 1992
 - 25) Kinnula VL, Everitt JI, Whorton AR, Crapo JD: Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am J Physiol* **261**:L84, 1991
 - 26) Kinnula VL, Chang L, Everitt JI, Crapo JD: Oxidants and antioxidant in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* **262**:L69, 1992
 - 27) Panus PC, Matalon S, Freeman BA: Response of type II pneumocyte antioxidant enzymes to normoxic and hyperoxic culture. *In vitro Cell Develop Biol* **25**:821, 1989
 - 28) Simon RH, Dehart PD, Nadeau DM: Resistance of rat pulmonary alveolar epithelial cells to neutrophil-and oxidant-induced injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**:221, 1989
 - 29) Matalon S, Beckman JS, Duffey ME, Freeman BA: Oxidant inhibition of epithelial active sodium transport. *Free Radical Biol Med* **6**:557, 1989
 - 30) Heffner, JE, Repine JE: Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* **140**:531, 1989
 - 31) Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG: Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* **163**:152, 1987
 - 32) Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG: Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* **86**:962, 1990
 - 33) Jenkinson SG, Black RD, Lawrence RA: Glutathione concentrations in rat lung bronchoalveolar lavage fluid: effects of hyperoxia. *J Lab Clin Med* **112**:345, 1988
 - 34) Pacht ER, Davis WB: Role of transferrin and ceruloplasmin in antioxidant activity of lung epithelial lining fluid. *J Appl Physiol* **64**:2092, 1988
 - 35) Roveri A, Bruni R, Baritussio A, Cassin M, Benevento M, Maiorino M, Ursini F: Antioxidant defences of rabbit alveolar lining fluid. *Respiration* **55** (Suppl 1):68, 1989