

內毒素에 의한 敗血症 白鼠 모델에서 成長호르몬 療法の 治療 效果

고광희* · 신호근

전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실 및 구강생체과학연구소*

Abstract

THE EFFECT OF HUMAN GROWTH HORMONE ON SEPSIS RAT MODEL INDUCED BY ENDOTOXIN

Kwang-Hee Ko*, Hyo-Keun Shin

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Chonbuk National University

To evaluate the possible therapeutic effects of growth hormone and vitamin C on multiorgan failure, a rat model was developed for LPS-induced sepsis. Using this model, the effects of growth hormone and vitamin C on tissue damages, catalase and i-NOS activities, and MDA levels were examined in the lung and liver. The level of TNF- in plasm was also examined. Male, Sprague-Dawley rats were injected with LPS intraperitoneally then divided into 3 groups : positive controls injected with LPS only, the ones injected with growth hormone or vitamin C immediately after the LPS injections. The lung and the liver were then isolated, blood samples were collected at 24 or 48 hours after the LPS injection, then examined for histopathological and biochemical changes.

The results obtained were as follows.

1. LPS induced sinusoid vasodilation and mild destruction of lobular structure in the liver. In the lung, alveolar structure appeared to be thickened and interstitial edema was observed. The levels of MDA in the liver and the lung was increased by LPS, while the activity of catalase was decreased. The activity of i-NOS of those tissues was also increased, which was more pronounced at 24 hr. The level of TNF- in plasm was increased by LPS
2. In the lung, vitamin C suppressed lymphocyte and neutrophil infiltration, alveolar wall thickening and interstitial edema. In the liver, vitamin C protected against the destruction of the lobular structure. The activity of catalase reduced by LPS was reversed partly by vitamin C. The activity of i-NOS enhanced by LPS was also reversed by vitamin C. The level of TNF- in plasm reduced in some animals by vitamin C, which however was not significant statistically(p<0.05).
3. Growth hormone showed similar protective effects against inflammation and damages in the liver and lung tissues. Growth hormone reversed partly the LPS effects on the level of MDA, the activity of catalase and i-NOS induction in the liver and the lung. Growth hormone reduced

plasma level of TNF- α substantially, which contrasted from vitamin C. Besides this, overall protective effects of growth hormone against LPS-induced experimental sepsis were similar to those of vitamin C.

From this results, the mechanism of growth hormone on suppression of LPS-induced tissue damage might be associated with production of antioxidative enzyme and suppression of plasma TNF- level.

I . 서 론

구강악안면 수술 후의 감염성 합병증 및 치성 감염에서 시작된

두경부 감염시 국소적인 염증은 적절한 항생제 요법, 외과적 배농 및 변연 절제로 대부분 조절이 되지만 세균의 내독소, 세포분비물질 및 백혈구들의 과다한 면역반응에 의해 통상 패혈증이라고 불리는 '전신적 염증반응 증후군' (SIRS)이 초래된 경우, 전신 조직 손상으로 이어지게 된다. 이러한 손상은 필수 장기의 기능부전으로 발전하며 한 개의 필수 장기의 기능부전은 다 장기의 기능부전으로 귀착되어 사망에 이르게 되는데 특히, 간이나 폐에 심각한 손상이 발생한 경우에는 적극적인 중환자 치료를 하더라도 사망률이 50%를 상회하게 된다¹⁾.

구강악안면 및 두경부 치성감염의 원인균은 호기성-혐기성 혼

고 광 희

158-077, 서울특별시 양천구 신정7동 337번지
목동 2차 우성 APTA상가 302호 고광희치과의원

Kwang Hee-Ko

Dr. Ko's Dental Clinic

337, 7th Shinleong-Dong, Yangchon-Gu, Seoul, 158-077, Korea

Tel: (02)653-6090,1

합균주가 주종을 차지하고²³⁾ 그람 음성균도 약 20~30%를 차지하는 것으로 알려져 있는데⁴⁵⁾, 전신적 염증반응 증후군은 그람 음성균 의한 중증 세균성 감염을 대표로 결핵균, 기생충 등의 여타 감염 상황, 그리고 췌장염, 화상, 및 심한 외상 등의 비감염성 상황에서 발생하는 것으로 알려져 있다.

패혈증시 나타나는 신체 장기 기능부전의 원인으로는 저혈압 자체에 의한 관류량 감소와 장기 조직내 미세혈액 순환의 부전, 그리고 독성 물질에 의한 조직 세포 자체의 손상 등으로 알려져 있다. 장기 조직내의 미세혈액 순환을 저해하는 기전에 백혈구의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있는데, 이 과정에 여러 가지 세포분비 물질이 매개 역할을 하고 그 중 특히 TNF- α 와 산화질소가 중요한 역할을 하며, 마지막 조직 손상을 일으키는 것은 백혈구가 생성한 독성 산소기인 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 발생된 산소기는 세포막의 주 구성성분인 다중 불포화 지질을 과산화시켜 세포막을 손상시키고 투과성도 증가시켜 세포의 기능 상실을 초래하는데, 혈관내피 세포의 세포막이 지질과 산화로 손상되면 혈관내피 세포에서 생성되던 산화질소(NO : nitric oxide = EDRF : endothelium derived relaxing factor)의 생성이 저해되어 혈관확장 부전과 혈관내피 세포에의 혈소판과 백혈구의 응집이 증가하여 미세혈관의 폐색이 발생한다.

산소기에 의한 조직세포 손상시 혈중 지질 과산화물들의 농도가 증가하는데, 산소기에 의한 세포 손상의 정도를 반영하는 지표로서 사용되는 측정 가능한 지질과산화물로서는 에탄, 펜탄, 이중결합 불포화탄화수소, MDA (malondialdehyde) 등이 있고, 그 중에서 일반적으로 MDA의 측정이 가장 많이 사용된다⁸⁹⁾.

산소기에 의한 조직세포 손상을 억제하는 방법은 항산화 체내 방어기전을 강화하거나 산소기의 생성 자체를 감소시키는 것인데, 산소기의 공격에 대한 체내 방어기전으로는 SOD (superoxide dismutase), selenium-dependent glutathione peroxidase 및 환원형 글루타치온과 카탈라제가 중요한 항산화 효소로 작용하고¹⁰⁻¹³⁾ Vit-E, Vit-C, β -카로틴, 요산, 알부민, 빌리루빈, 트랜스페린, 셀룰로플라즈민 등이 항산화 물질로 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁵⁾ 체내 단백질들의 sulfhydryl group (-SH)은 항산화 능력을 가지고 있으나, sulfhydryl group이 산소기와 결합하여 그 기능의 변화가 일어나면 효소로서의 역할을 못하므로 이 자체가 산화 손상으로 간주될 수도 있다.

TNF- α 는 거식세포 및 임파구, 호중구, 그리고 혈관 내피세포에서 합성되고 호중구를 활성화시켜 superoxide와 같은 산화제와 단백질 분해효소의 분비를 촉진하며, 거식세포를 자극하여 역시 산화제, IL-1, IL-6, TNF- α 등의 세포분비물질들을 분비하게 하는데, 이 산화제 및 세포분비물질들은 침입 미생물의 살균과 같은 자기 방어적인 목적을 가진 작용을 하지만, 자기 조직을 손상시키기도 한다. 패혈증시 TNF- α 는 내독소 및 INF- γ 와 함께 유도성 산화질소 합성효소 (i-NOS : inducible nitric oxide synthase)의 생성을 촉진한다. 패혈증 환자에서 TNF- α 와 IL-6의 혈중 농도의 계속적인 증가는 패혈증의 중증도 및 치사율과 비례관계에 있다고 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

산화질소는 세포내의 산화질소 합성효소 (NOS : nitric oxide

synthase)의해 유일한 기질인 L-arginine의 guanidine group 에서 생성된다¹⁹⁾. 산화질소는 질소와 산소 원자가 하나씩 결합한 분자 구조로서 짝이 없는 전자가 하나 있어 전자를 공여하거나 공유하려는 강한 경향을 가지는데²⁰⁾, 산화질소는 산소와 결합하면 nitrite와 nitrate (NO₂와 NO₃)를 형성하며 산소기를 제거하거나, 체내 다른 기 혹은 효소 단백질의 thiol-군이냐 heme내의 금속들과 결합하여 그 효소 단백질을 불활성화하거나 활성화하여 고유의 다양한 생리학적 및 병태생리학적 작용을 하게 된다^{21,22)}. 산화질소를 합성하는 효소인 산화질소 합성효소 (NOS)에는 3가지의 동종형들이 알려져 있는데^{21,22)}, 이들은 혈관확장(ec-NOS), 신경전달(nc-NOS) 및 면역반응(i-NOS)등에 다양한 작용을 한다.

i-NOS는 백혈구 계통을 포함한 거의 모든 세포에서 병적 상태의 자극에 의해 유도 가능한 것으로 추정되며²⁰⁾, 체질성 NOS의 수천 배에 달하는 다량의 산화질소를 생성하여 미생물, 기생충, 종양 혹은 자기 세포를 파괴하는 작용을 한다. i-NOS의 생성은 주로 전사 단계에서 조절되며, 내독소인 LPS (lipopolysaccharide), TNF- α 나 IFN- γ 같은 cytokines, 그리고 기타 여러 가지 요인들이 유발 인자가 되는데, 전사인자 NF- κ B의 활성화가 필수적인 단계인 것으로 알려져 있다²³⁾. 반면에 IL-4, 8, 10, Tyrosine kinase inhibitor, NF- κ B inhibitor, 그리고 glucocorticoids 등은 i-NOS의 활성화를 억제한다.

산화질소의 작용은 산화질소가 생성된 조직이나 세포의 종류나 위치에 따라, 또 어떤 NOS에 의해서 어느 정도의 양으로 생성되느냐에 따라 달라진다. 허혈-재관류 손상시에는 산화질소가 재관류시 발생하는 산소기를 중화하고 혈관내피에의 혈소판 및 백혈구 응집을 방어하는 작용을 하며²⁴⁾, 조직손상이 일어난 부위에서는 i-NOS가 유도됨으로써 다량의 산화질소가 생성되어 혈관의 재개통을 촉진하는 작용을 한다²⁵⁾. 고혈압이나 당뇨병에서의 혈관성 변화들도 내재적인 체질성 NOS의 활성부전으로 인한 산화질소의 부족으로 설명된다²⁶⁾.

최근 패혈증이나 중증외상에서 성장호르몬을 투여하여 상처의 치유촉진이나 전신상태를 호전시키려는 시도가 시행되고 있는데²⁷⁻²⁹⁾, 이 성장 호르몬이 동화작용이나 면역증강 외에 항산화 작용을 가지고 있을 가능성을 주장하는 실험이 있었다³⁰⁾. 성장호르몬은 단백질 합성을 촉진하는 기능을 가지므로, 체내에 항산화 기능이 있는 단백질의 합성을 증가시키거나 i-NOS의 유도를 촉진하여 항산화 작용을 할 가능성을 생각해 볼 수 있다.

패혈증에서 산화질소의 생성 증가가 조직을 보호하기 위한 목적이란 주장이 유력하나³¹⁾, c-NOS와 i-NOS를 구분하여 c-NOS는 조직보호에 필수적이지만 i-NOS는 너무 과량 너무 장시간 생성되면서 자기 조직세포의 손상을 가져온다는 주장도 상당하다.

성장호르몬의 동화작용 촉진효과가 패혈증에 치료적 작용이 있음이 알려져 있으나 성장호르몬의 항산화 작용 기전에 대해서는 확실하게 밝혀지지 않았다. 이에, 본 연구에서는 E-coli LPS를 백서의 복강내 주사하여 유발한 패혈증 실험모델에서 항산화작용 물질인 비타민-C와 성장호르몬이 패혈증에 의한 폐와 간의 조직손상을 억제하는데 있어서 TNF- α 및 산화질소와 어떤 관계를 가지면서 작용을 하는지를 알아보고자 하였다. 본 실험을 통

해 이러한 상관관계를 보다 더 정확히 이해할 수 있다면 향후 패혈증 예방 및 치료에 진보를 이룰 것으로 생각된다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물

1) 실험군

실험동물로는 몸무게 260~340gm의 Sprague-dawley 백서 숫컷을 사용하였으며 백서는 4개 군으로 나누어 대조군 (가군)과 LPS 투여군 (나군), LPS 투여 후 비타민-C를 투여한 군 (다군), 그리고 LPS 투여 후 성장호르몬을 투여한 군 (라군)으로 하였다. 대조군을 제외한 세 집단 (나, 다, 라군)에 대해 시간대별 비교군인 LPS 투여 후 24시간 그리고 48시간의 2개 아군으로 나누었다. 대조군 5마리에 각 군의 시간대별 매 비교군마다 실험대상 백서의 숫자를 각 8마리씩으로 하여 총 53마리를 실험하였다 (Table 1).

Table 1. The experimental group and the number of rats in each subgroup.

	no treatment	LPS 10 mg/Kg IP	
		24 hr	48 hr
Control	5		
LPS		8	8
LPS+Vit -C		8	8
LPS+Growth Hormone		8	8

* n = number of rats

2) 실험동물에 대한 처치

실험동물군은 실험 2주전에 사육실에서 일반사료와 물을 먹이면서 주위 환경에 적응하도록 하였다. 시술을 하거나 시료를 채취하는 당일에도 사료와 물을 계속 공급하였다.

대조군 (가군)은 아무런 술식이나 처치를 하지 않고 ketamin hydrochloride 50mg/kg를 복강내 주사하여 전신마취를 유도한 후, 복강과 흉강을 정중절개하여 우심실에서 혈액을 채취한 다음 신속히 간과 폐를 절제해 내어 아래의 실험군의 시료채취 방법과 동일한 처리를 거쳐 조직을 보관하였다.

실험군 나, 다, 라군은 E. Coli로부터 추출한 LPS (lipopolysaccharide)를 생리식염수 10mL당 100mg의 비율로 희석하여 10 mg/Kg의 투여량으로 복강내 주사하여 인위적으로 패혈증을 유발시켰다.

나군은 패혈증 유발 후 아무런 처치를 하지 않고 24시간과 48시간에 각각 5마리씩 희생시켜 검체를 채취하였다.

다군은 패혈증 유발 후 주사용 비타민-C (50mg/ml)를 매 12시간마다 300mg/Kg씩 복강내 주사하였다. 패혈증 유발 후 24시간과 48시간에 각각 5마리씩 희생시켜 검체를 채취하였다.

라군은 패혈증 유발 후 성장호르몬 (recombinan human growth hormone, Lucky Inc. Korea)을 3.0 IU./kg의 양으로 근육주사 하였다. 24시간 군은 1회의 성장호르몬 투여가 있었고, 48시간 군은

동량의 성장호르몬을 1회 더 주사했다. 각 시간별로 5마리씩 희생시켜 검체를 채취하였다.

검체채취의 방법은 다음의 순서로 하였다. 마취후 복부와 흉부를 정중절개하여 흉강까지 열고 heparine으로 내벽을 도포한 주사기를 사용하여 우심실을 천자하여 혈액을 채취한다. 혈액은 일단 얼음속에 보관하였다가, 곧바로 4°C 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈장만을 분리하여 -70°C에서 동결 보관하였다.

혈액 채취 후, 신속히 폐와 간을 적출하여 생리식염수로 3차에 걸쳐 세척하여 혈액성분을 최소화하였다. 마지막으로 얼음속에 재워둔 PBS (Phosphate-Buffered Saline)액에 20초간 세척한 후 거즈로 물기를 제거한 다음, 5등분하여 즉시 액체 질소탱크에 넣어 -70°C에서 동결 보관하였다. 이 때 일부 조직을 별도로 채취하여 병리조직 검사용으로 4% formation에 보관하였다.

2. 실험 방법

1) 혈중 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 측정

혈청중 TNF- α 농도의 측정은 두 가지 항체를 이용하는 sandwich enzyme immunoassay 법¹⁶⁾인 solid-phase ELISA kit로 측정하였다. Rat TNF- α (rTNF- α)에 대한 monoclonal antibody가 coating된 polystyrene microtiter plate (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)에 100 μ l의 측정하고자 하는 검체와 농도를 알고 있는 mTNF- α 표준용액을 가하여 4에서 12시간 동안 반응시킨 후 wells를 세척하였다. 이어 horseradish peroxidase로 conjugated된 polyclonal goat anti-TNF- α antibody 100 μ l를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 세척한 후 hydrogen peroxide (6ml)와 chromagen (6ml)이 함유된 기질용액을 가하였다. 실온에서 1시간 반응시킨 후 1M H₂SO₄를 가하여 발색반응을 중지시키고 각 well의 흡광도를 ELISA reader(Titertek)로 파장 450nm에서 측정하였다. 각 plate에서 rTNF- α 표준용액의 농도와 흡광도를 이용하여 표준곡선(log linear curve)을 얻은 후, 이 표준곡선을 사용하여 검체의 TNF- α 의 농도를 구하며 모든 검체는 2배수 혹은 3배수로 검사하였다. 본 실험에서의 TNF- α 측정의 검출한계는 4 pg/ml이었다.

2) MDA(malondialdehyde)의 측정

지질과산화 정도를 측정하기 위한 MDA의 측정은 Ohkawa 등 (1979)의 방법을 사용했는데, 상기 방법으로 얻은 간 조직 1g에 1.15% KCl을 9ml의 비율로 섞어 잘게 자른 후 homogenizer로 7에서 10초씩 10번 정도 잘게 뺨아 균질화 시켰다. 균질화된 조직액 0.1ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2ml, NaOH로 pH를 3.5에 맞춘 20% acetic acid 1.5ml, 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 1.5ml를 혼합하고 증류수를 섞어 4ml로 만든 후에 95의 수조에 30분에서 1시간 가량 둔 후 실온에서 식혔다. 여기에 다시 증류수 1ml와 흡광도를 높이기 위해 n-butanol과 pyridine을 15 : 1의 비율로 섞은 혼합액 5ml를 잘 섞어 1,000rpm에서 10분간 원심 분리한 상층액 1~2ml를 분광광도계로 파장 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화의 정도는 조직 1gm당 MDA의 nmol(nmol/gm)로 표시하였다.

3) 카탈라제 활성도의 측정

카탈라제 활성도 측정은 Beers와 Sizer(1952)의 방법을 사용하였다²⁰⁾. 먼저 인산완충액(phosphate buffer, 50mmole/l, pH 7.0)을 만들기 위해 KH₂PO₄ 136.09gm과 K₂HPO₄ 174.18gm을 각각 1,000ml의 증류수에 녹여 용량을 39 : 61 비율로 혼합하였으며, 0.34 ml의 30% 과산화수소를 인산 완충액에 섞어 100ml가 되게 하여 30mmol의 과산화수소 용액을 만들어 시약을 준비하였다. 조직 1gm에 인산완충액 9ml를 섞어 homogenizer로 균질화 한 후에 10,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 10배 희석해서 240nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 수치는 units/mg of tissue로 표시하였다.

카탈라제 활성도를 구하는 공식은 다음과 같다.

Specific Activity(units/mg)

$$= \frac{O. D \text{ 값} \times 1000}{\text{mg Protein}} \div 43.6 \times \frac{\text{ml Reaction Mix}}{\text{mg Protein}}$$

4) i-NOS activity의 측정

조직 채취과정에서 -70로 얼려 보관해 둔 간 조직의 질량을 측정하였다. 균질화과정에 사용할 완충액은 1.0mM EDTA, 5mM Mercaptoethanol,

10 µg/ml의 Pepstatin-A, 10 µg/ml의 Apropitinin, 90 µg/ml의 Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.0 µM의 Tetrahydrobiopterin이 포함 되도록 50mM의 Tris 완충액 (pH 7.4)을 만들었다. 조직 질량의 10 배 정도의 완충액에 간 조직을 넣고 얼음속에 담긴 상태에서 조직을 균질화한 후, 4 에서 1시간동안 15,000g에서 원심분리하였고, 50 µl의 상층액을 취하여 -70 에서 보관하였다.

이온교환수지 원통관으로 준비된 플라스틱 원통관(Bio-RAD)에 Dowex AG 50W-X8 resin (Bio-RAD)을 증류수로 5회 적서 활성화한 후 기포가 들어가지 않도록 주의하며 resin이 1ml가 되도록 채워 넣었다.

이온교환수지 원통관을 4ml의 1N NaOH를 통과시킨 후 10ml 증류수로 resin을 세척하였다. 12.5mM 초산나트륨 (Sodium Acetate, pH 5.5) 4ml를 통과시켜 리트머스 종이로 resin의 pH가 5.5~6.5 사이가 되도록 확인하였다. 이렇게 하면, Dowex AG 50W-X8 resin이 수소이온 형태에서 나트륨이온 형태로 바뀌게 된다.

시료를 용출(elution)하기 전 반응용액은 200 µM의 β-NADPH, 8 µM의 Tetrahydrobiopterin, 20 µM의 FAD, 20 µM의 FMN, 2mM의 CaCl₂, 2mM의 MgCl₂, 60nM의 Calmodulin, 2 µM의 Arginine, 그리고 2 µCi/ml의 ³H-Arginine (Amersham)이 포함되도록 섞어 준비하였다.

원심 분리하여 -70°C에서 보관해 두었던 간 조직 상층액 50 µl에 준비한 반응용액 50 µl를 혼합하여 수조 내에서 22°C에서 15분간 항온반응을 시켰다. 그 후 준비된 이온교환수지 원통관에 혼합액을 100 µl 투입하고 1ml의 증류수로 3회 용출하였다. 총 용리된 용량중 500 µl를 취하여 scintillation Cocktail (Aqualsol-2,

Packard) 5 ml과 혼합한 다음, Liquid Scintillation Spectrometer (TRI-CARB, Packard)로 ³H의 cpm (counter per minute)값을 측정하였다. 여기서 cpm은 분당 검출되는 β-입자의 숫자를 나타낸다.

i-NOS의 활성도는 용출되어 나온 용액 내에 있는 ³H-L-Citrulline의 양을 β-counter로 측정하였다. NOS는 L-Arginine을 L-Citrulline으로 변화시키면서 산화질소(NO)를 생성시키는데, L-Arginine은 전기적으로 양이온이므로 반응용액중에 포함된 L-Arginine과 ³H-L-Arginine 중 간 조직액 내의 i-NOS에 의해 각각 L-Citrulline과 ³H-L-Citrulline으로 전환되고 남은 부분은 원통관내의 이온교환수지와 결합하여 용리되어 내려오지 않고 L-Citrulline과 ³H-L-Citrulline만 내려오므로 효소 i-NOS의 활성도를 의미하는 산화질소의 생성량과 ³H-L-Citrulline의 양은 비례한다.

5) 광학현미경 관찰

간과 폐의 조직절편을 4% paraformaldehyde에 넣어 고정된 뒤 알코올로 탈수하고 파라핀으로 포매하였다. 포매된 표본은 4~5 m의 절편으로 자르고 hematoxylin & eosin 염색법으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 자료 분석

SPSS for Windows Release 6.1 package를 이용하여 Independent Sample T-test를 사용하여 유의검정 수준은 p < 0.05로 하였다. 각 군간의 비교는 Levene's Test for Equality of Variances를 실시하여, 귀무가설을 유의수준은 p < 0.05를 기준으로 Equality와 Unequality를 구분하여 p-value를 구하였다. 검사 결과는 평균 표준오차로 표시하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. TNF-α

대조군 (가군)의 혈청내 TNF-α의 농도는 12.74±6.03pg/ml이었다.

나군에서 실험 경과 24시간 후에는 74.38±11.00pg/ml, 48시간 후에는 63.41±5.09pg/ml 이었다 (Table 2). 대조군에 비해 현저히 증가되었으며, 24시간대에서 48시간대로 가면서 감소하는 추세를 보였다 (p = 0.023).

다군에서의 혈중 TNF-α 수치는 24시간 후에 63.78±9.94 pg/ml, 그리고 48시간 후에는 56.50±9.51pg/ml이었다 (Table 2). LPS만 투여한 군에 비하여 낮은 수치를 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (p = 0.063, 0.098) (Fig. 1).

라군에서는 24시간 후에는 62.40±9.30 pg/ml, 48시간 후에는 53.67±12.56 pg/ml이었다 (Table 2). 성장호르몬이 TNF-α의 생성을 유의하게 억제하였으나, 시간이 흘러 48시간에서는 억제 효과가 줄어드는 경향을 보였다. 비타민-C를 투여한 군에 비하여 성장호르몬 투여군에서 TNF-α의 억제 효과는 차이가 없었다 (각각 p = 0.778, 0.603) (Fig. 1).

Table 2. The effect of vitamin-C and growth hormone on plasma TNF- α level in rats injected with LPS (* p<0.05)

Groups	Time	
	24 hr	48 hr
Control	12.74±6.03	
LPS	74.38±11.00	63.41±5.09
LPS + Vit-C	63.78±9.94	56.50±9.51
LPS + Growth hormone	62.40±9.30 *	53.67±12.56

Unit : pg/ml

2. MDA로 본 과산화 지질의 양

MDA 양은 대조군 (가군)에서 폐 조직은 118.28±24.29 nmol/gm 이었고, 간 조직에서는 143.46±26.68 nmol/gm이었다.

나군에서는 실험 경과 24시간 후에 폐 조직에서는 315.00±47.40 nmol/gm 이었고, 간 조직에서는 274.49±41.77 nmol/gm이었다. 48시간 후에는 폐 조직에서 214.14±11.68 nmol/gm 이었고, 간 조직에서 350.67±40.20 nmol/gm 이었다. 양쪽 장기에서 모두 LPS 주사 후 MDA 수치가 2~3배로 현격히 증가되었다. MDA의 증가는 폐에서는 48시간대에 감소하는 추세를 보였고 간에서는 48시간대에 더욱 증가하는 경향을 보였다 (Table 3).

다군에서는 실험 경과 24 시간 후에는 폐 조직에서는 172.97±7.58nmol/gm 이었고, 간 조직에서는 163.63±5.78nmol/gm이었다.

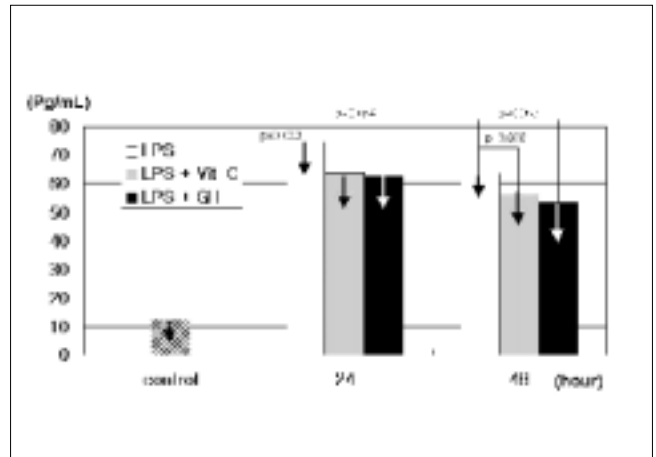


Fig. 1. The effect of vitamin-C and growth hormone on plasma TNF- α level in rats injected with LPS

48시간 후에는 폐 조직에서 162.03±10.29 nmol/gm 이었고, 간 조직에서 155.61±11.84 nmol/gm 이었다. 폐와 간 모두에서 LPS에 의한 MDA의 생성 증가가 비타민-C의 투여 후 현격히 억제되었다 (Table 3, Fig. 2, Fig. 3).

라군에서 조직내 MDA 수치가 실험 경과 24 시간 후에 폐 조직에서는 195.38±19.80nmol/gm 이었고, 간 조직에서는 212.71±23.13nmol/gm이었다. 48시간 후에는 폐 조직에서 184.29±13.63 nmol/gm 이었고, 간 조직에서 164.78±9.09nmol/gm 이었다. 성

Table 3. The effect of vitamin-C and growth hormone on lipid peroxidation in the liver and lung from rats injected with LPS. (* p<0.05)

Groups	Time	Lung		Liver	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Control		118.28±24.29		143.46±26.68	
LPS		315.00±47.40	214.14±11.68	274.49±41.77	350.67±40.20
LPS + Vit-C		172.97 * ±7.58	162.03 * ±10.29	163.63 * ±5.78	155.6 * ±11.84
LPS + Growth Hormone		195.38 * ±19.80	184.29 * ±13.63	212.71 * ±23.13	164.78 * ±9.09

Unit : nmol/gm

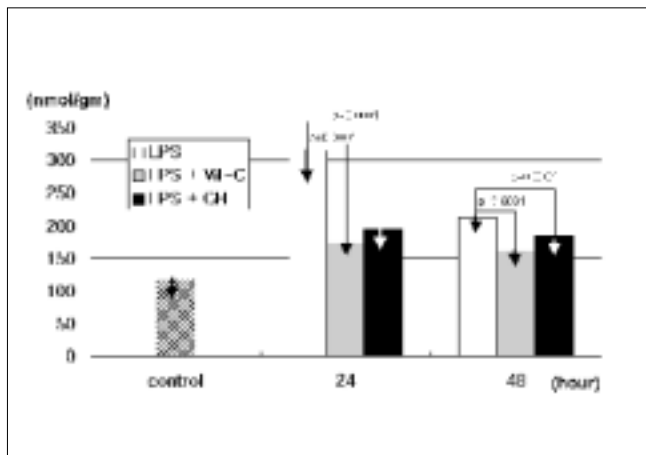


Fig. 2. The effect of vitamin-C and growth hormone on lipid peroxidation in the lung from rats injected with LPS

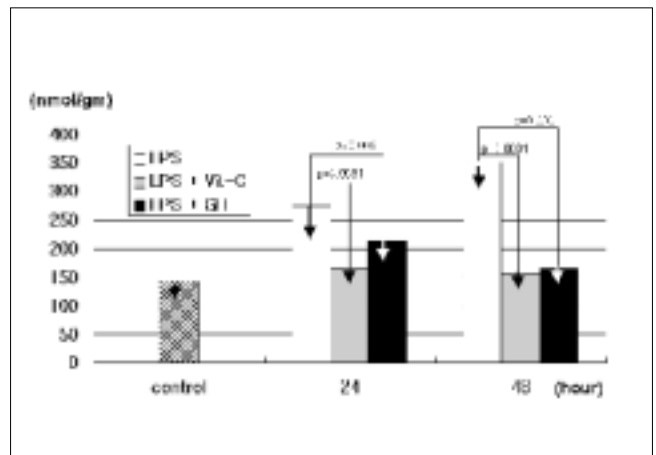


Fig. 3. The effect of vitamin-C and growth hormone on lipid peroxidation in the liver from rats injected with LPS

장호르몬은 비타민-C와 유사하게 LPS의 투여에 의한 조직내 MDA 생성증가를 유의하게 억제하였다 (시간별로 각각 $p = 0.0001, 0.0001$ (폐), $p = 0.004, 0.0001$ (간)) (Fig. 2, Fig. 3). 다균과 라군을 비교하면, 비타민-C 투여군에서 간 조직의 48시간대를 제외하고 유의하게 높은 항산화 효과를 나타냈다 (시간별로 각각 $p = 0.015, 0.003$ (폐), $p = 0.0001, 0.106$ (간)). 비타민-C는 항산화 효과가 즉각적인데 비하여 성장호르몬은 24시간에 비하여 48시간으로 갈수록 더 뚜렷한 항산화 작용을 보이는 경향이 있었다.

3. 카탈라제 활성도

대조군의 폐 조직내 카탈라제 활성도는 131.66 ± 25.26 unit/mg 이고, 간 조직내 카탈라제 활성도는 1427.148 ± 104.54 unit/mg 이었다. 간 조직내 카탈라제의 활성도가 폐 조직의 10배가 넘는 수치를 보였는데, 실질세포의 밀도가 폐 조직이 낮기 때문이라고 추정된다.

나균에서 폐 조직은 실험 시간 경과 24시간 후에 22.03 ± 3.24 unit/gm 이었으며 48시간 후에는 18.11 ± 1.85 unit/mg 이었다 (Table 4). 간 조직은 실험 시간 경과 24시간 후에 430.19 ± 104.54 unit/gm 이었으며 48시간 후에는 407.57 ± 29.91 unit/mg 이었다. 폐와 간 모두에서 LPS의 투여에 의해 카탈라제 활성도가 급격히 감소하였고 시간의 경과에 따라 더 감소하는 경향을 보였다.

다균에서 폐 조직은 실험 경과 24시간 후에는 28.88 ± 2.99 unit/gm, 그리고 48시간 후에는 27.55 ± 3.53 unit/gm 이었다 (Table 4). 간 조직은 실험 경과 24시간 후에 533.54 ± 32.56 unit/gm, 그리고 48시간 후에는 675.47 ± 47.42 unit/gm 이었다 (Table 4). 비타민-C는 LPS 투여에 의한 카탈라제의 소진을 유의하게 억제하였다 (시간별로 각각 $p = 0.001, 0.0001$ (폐), $p = 0.0001, 0.0001$ (간)) (Fig. 4, Fig. 5) 라군에서는 폐 조직은 실험 경과 24 시간 후에 $30.51 \pm$

4.87 unit/gm, 그리고 48시간 후에는 27.95 ± 3.26 unit/gm 이었다. 간 조직은 실험 경과 24시간 후에는 594.64 ± 97.38 unit/gm, 그리고 48시간 후에는 739.02 ± 99.02 unit/gm 이었다. 성장호르몬도 LPS의 투여에 의한 카탈라제의 소진을 유의하게 억제하였으며 (시간별로 각각 $p = 0.001, 0.0001$ (폐), $p = 0.0001, 0.0001$ (간)) (Fig. 4, Fig. 5), 다균에 비교하면 특히 간 조직에서 뚜렷하게 더 우수한 카탈라제 소진 억제 효과를 가진 것으로 나타났다 (시간별로 각각 $p = 0.436, 0.816$ (폐), $p = 0.0001, 0.0001$ (간)) (Fig. 4, Fig. 5)

4. i-NOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 활성도

대조군의 폐 조직에서 양이온 교환수지관 용출 후 빠져나온 ^3H -L-Citrulline의 양은 97.2 ± 18.21 cpm 이었고, 간 조직은 214.6 ± 41.23 cpm 이었다.

나균의 폐 조직에서 실험 경과 24시간에는 383.75 ± 86.98 cpm 으로 급격히 증가하였으며, 48시간 후에는 266.50 ± 91.92 pg/ml로 대조군에 비하여는 현저히 높으나 24시간에 비해 다시 약간 감소하였다 ($p = 0.0001, 0.0001$) (Table 5, Fig. 6). 간 조직은 실험 경과 24시간에는 1002.88 ± 227.70 cpm 으로, 48시간 후에는 477.88 ± 147.04 pg/ml로 대조군에 비하여는 현저히 높아졌다가 점차 낮아지는 양상을 보였다 ($p = 0.0001, 0.0001$) (Table 5, Fig. 7).

다균의 폐 조직에서 ^3H -L-Citrulline의 양은 24시간 후에는 284.13 ± 62.90 cpm 이었고 48시간 후에는 166.13 ± 40.42 cpm 으로 나균에 비하여 유의하게 낮은 수치를 보였다 ($p = 0.021, 0.019$) (Table 5, Fig. 6). 간 조직에서는 24시간 후에 519.75 ± 127.94 cpm 이었고 48시간 후에 325.25 ± 77.68 cpm 으로 역시 나균에 비하여 유의하게 낮은 수치를 보였다 ($p = 0.0001, 0.026$) (Table 5, Fig. 7).

라군의 폐 조직에서 ^3H -L-Citrulline의 양은 24시간 후에는 156.63 ± 55.38 cpm 이었고, 48시간 후에는 142.13 ± 54.16 cpm 으로 나균에

Table 4. The effect of vitamin-C and growth hormone on catalase activity in the liver and lung from rats injected with LPS (* $p < 0.05$)

Groups	Time	Lung		Liver	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Control		131.656 ± 25.26		1427.148 ± 104.54	
LPS		22.03 ± 3.24	18.11 ± 1.85	430.19 ± 51.14	407.57 ± 29.91
LPS + Vit-C		$28.88^* \pm 2.99$	$27.55^* \pm 3.53$	$533.54^* \pm 32.56$	$675.47^* \pm 47.42$
LPS + Growth Hormone		$30.51^* \pm 4.87$	$27.95^* \pm 3.26$	$594.64^* \pm 97.38$	$739.02^* \pm 99.02$

Unit : unit/mg

Table 5. The effect of vitamin-C and growth hormone on i-NOS activity in the liver and lung from rats injected with LPS (* $p < 0.05$)

Groups	Time	Lung		Liver	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Control		97.2 ± 18.21		214.6	
LPS		383.75 ± 86.98	266.50 ± 91.92	1002.88 ± 227.70	477.88 ± 147.04
LPS + Vit-C		$284.13^* \pm 62.90$	$166.125^* \pm 40.42$	$519.75^* \pm 127.94$	$325.25^* \pm 77.68$
LPS + Growth Hormone		$156.63^* \pm 55.38$	$142.13^* \pm 54.16$	$428.00^* \pm 73.45$	405.50 ± 101.43

Unit : cpm

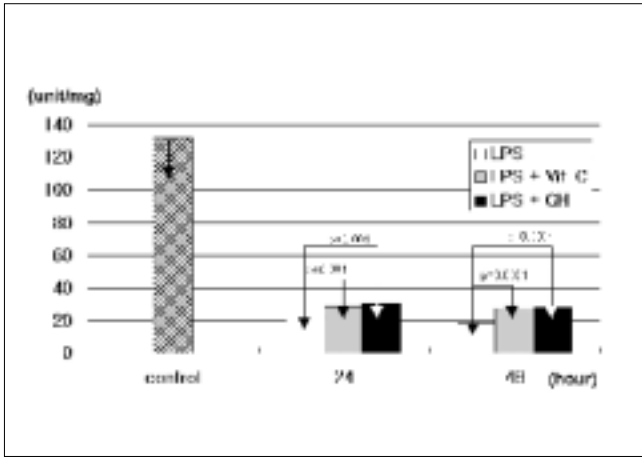


Fig. 4. The effect of vitamin-C and growth hormone on catalase activity in the lung from rats injected with LPS

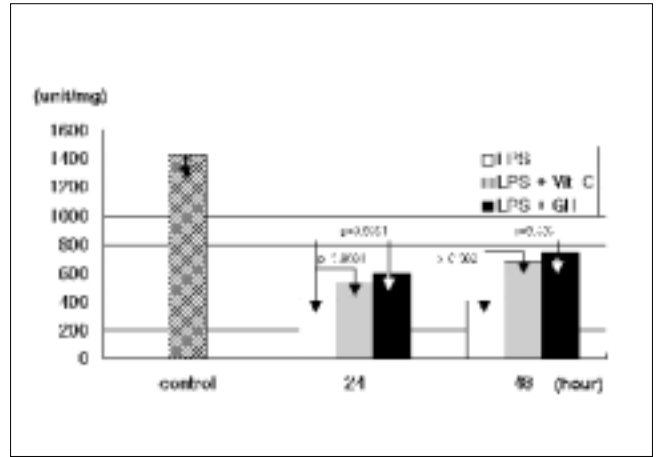


Fig. 5. The effect of vitamin-C and growth hormone on catalase activity in the liver from rats injected with LPS

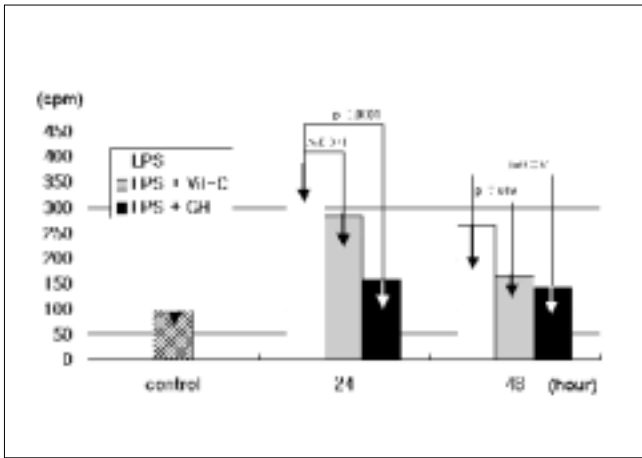


Fig. 6. The effect of vitamin-C and growth hormone on i-NOS activity in the lung from rats injected with LPS

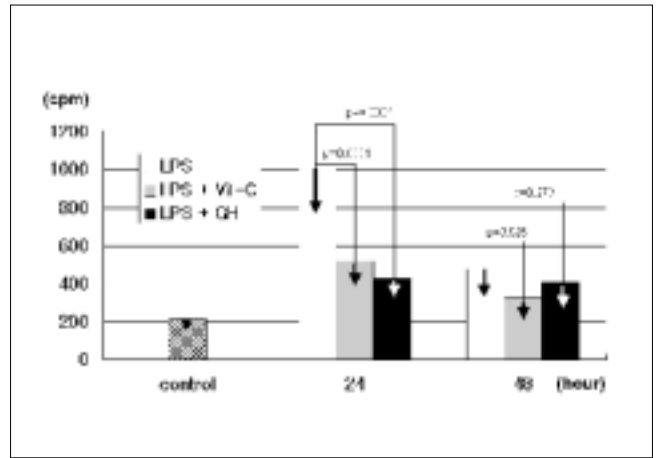


Fig. 7. The effect of vitamin-C and growth hormone on i-NOS activity in the liver from rats injected with LPS

비해서는 현격히 낮으며 ($p = 0.0001, 0.007$) 다군에 비교해도 낮은 수치를 보였다 ($p = 0.001, 0.334$) (Table 5, Fig. 6). 간 조직에서 3H-L-Citrulline의 양은 24 시간 후에는 $428.00 \pm 73.45\text{cpm}$ 이었고, 48 시간 후에는 $405.50 \pm 101.43\text{cpm}$ 으로 다군에 비하여 24시간대에서 현저히 낮았으며 ($p = 0.0001, 0.273$) 다군에 비교해도 24시간대에는 낮은 수치를 보였고 48시간대에는 높은 수치를 보였다 ($p = 0.106, 0.099$) (Table 5, Fig. 7).

5. 조직 병리학적 변화

대조군은 염증 소견이 전혀 없는 정상적인 폐포 구조와 간소엽 구조의 조직학적 소견을 보였다(Fig 8-1, 8-5).

나군의 폐 조직에서는 24시간대에 폐에서 울혈과 간질 부종 및 비후의 소견이 뚜렷하였다(Fig 8-6). 폐포벽의 비후와 더불어 폐포의 크기가 작아졌으며 임파구와 호중구와 같은 염증세포의 침윤소견을 나타냈다. 48시간대에는 이러한 염증성 소견이 계속 잔존하였으나 완화된 양상을 보였다. 간 조직은 뚜렷한 조직 소

견은 없었으나, 24시간대에 경미한 동모양혈관(sinusoid)의 확장, 간소엽 구조의 파괴 및 미세낭포성 지방변성등의 소견이 나타났다(Fig 8-2). 염증세포의 침윤 소견은 뚜렷하지 않았다. 48 시간대에는 정상에 가까운 조직소견을 보였다

다군의 폐 조직은 24시간대에서만 다군에 비하여 현저히 감소된 폐포벽의 간질 부종 및 비후의 소견을 보였고, 염증세포의 침윤은 거의 볼 수 없었다(Fig 8-7). 간에서도 24시간대에서만 동모양혈관의 확장 소견이 있었으나 지방 변성 및 간소엽 구조의 파괴 소견은 없었다(Fig 8-3).

라군도 폐와 간 모두에서 다군과 유사한 소견을 보였다 (Fig 8-4, 8-8).

IV. 총괄 및 고찰

본 실험에서는 실제적인 수술 후 합병증과 동일하게 세균이 있는 염증을 유발하는 실험모델을 사용하지 않고, 그람 음성균 폐혈증의 중심기전으로 알려진 내독소혈증을 모방하기 위하여

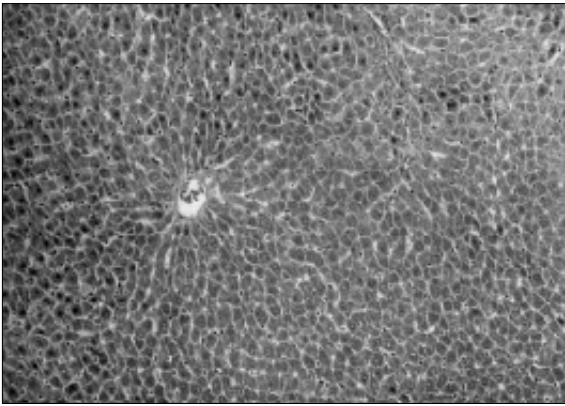


Fig. 8-1. Microscopic finding in the liver from control group of rats (H&E stain, ×100)

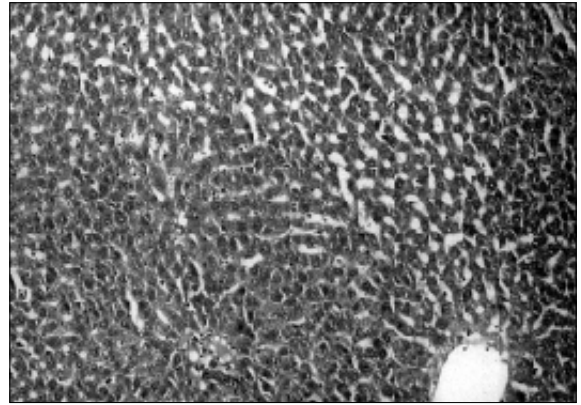


Fig. 8-2. Microscopic finding in the liver from rats injected with LPS only, at 24 hours after the injection. Sinusoid vasodilation and mild destruction of lobular structure are showed. Microcystic fatty degeneration is also observed.(H&E stain, ×100)

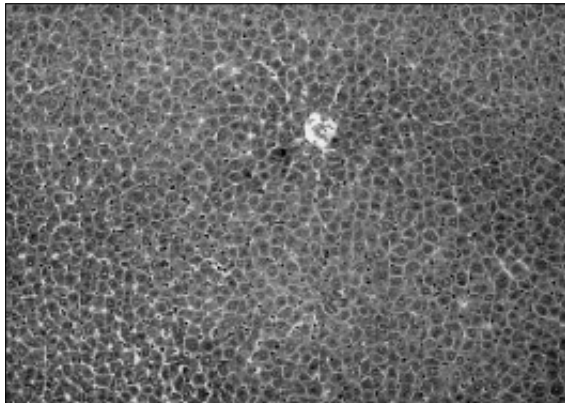


Fig. 8-3. Microscopic finding in the liver from rats injected with LPS and Vitamin-C at 24 hours after the injection.(H&E stain, ×100)

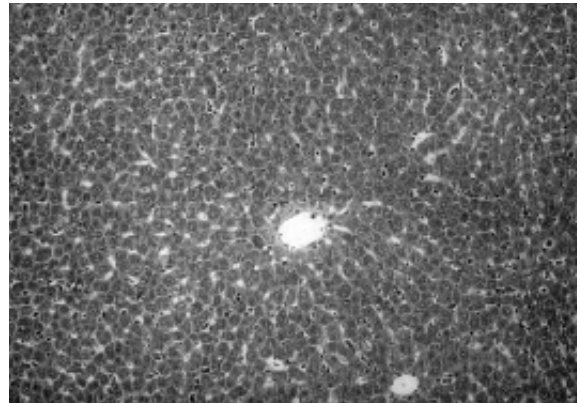


Fig. 8-4. Microscopic finding in the liver from rats injected with LPS and growth hormone at 24 hours after the injection.(H&E stain, ×100)

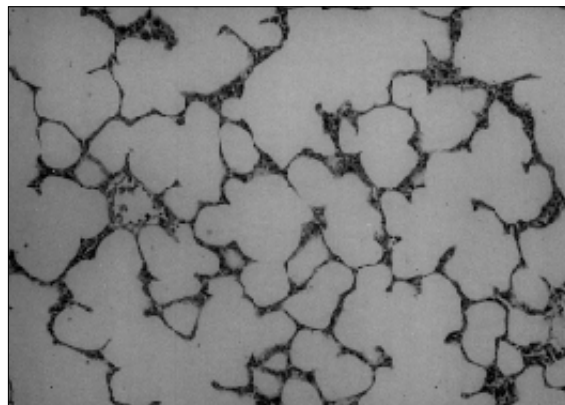


Fig. 8-5. Microscopic finding in the lung from control group of rats(H&E stain ×100)

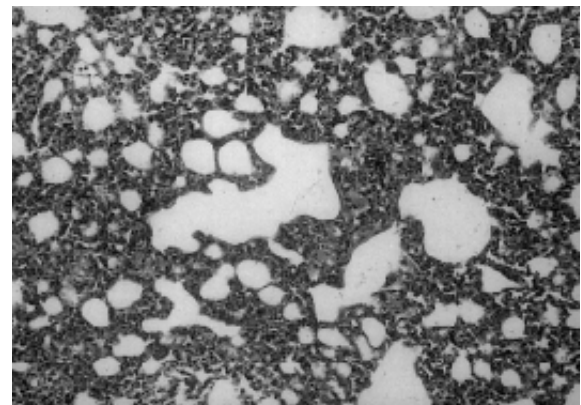


Fig. 8-6. Microscopic finding in the lung from rats injected with LPS only, at 24 hours after the injection. Thickening of alveolar structure and interstitial edema are distinct. Neutrophil and lymphocyte infiltration are also observed. (H&E stain ×100)

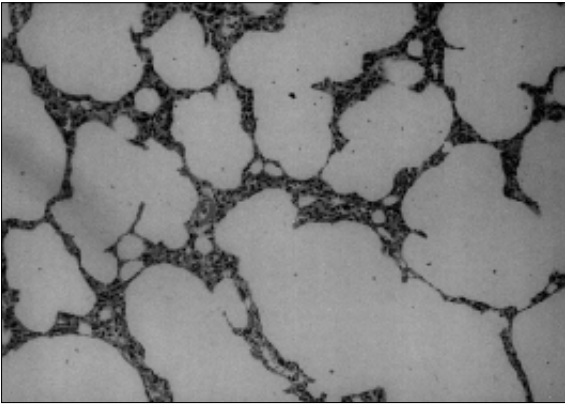


Fig. 8-7. Microscopic finding in the lung from rats injected with LPS and Vitamin-C at 24 hours after the injection.(H&E stain ×100)

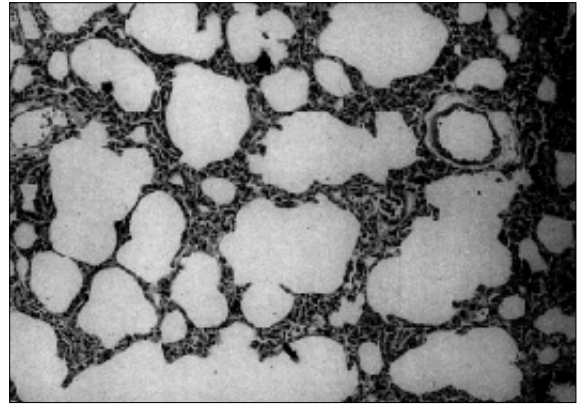


Fig. 8-8. Microscopic finding in the lung from rats injected with LPS and growth hormone at 24 hours after the injection.(H&E stain ×100)

LPS를 10mg/Kg 용량으로 복강내 주사하였다. 실험적으로 20 mg/Kg를 주사한 경우에는 사망하는 쥐가 50%에 달하여 그 절반 용량을 사용하였는데, 10mg/Kg로 1회 주사한 것으로는 실제 염증과 같은 전신적 염증반응을 지속적으로 유발하기에는 부족한 투여량이었던 것으로 추정된다.

감염시 침입한 세균을 제거하여 조직손상을 최소화하고자 체내에서 염증반응이 일어나는데 백혈구계 염증세포들이 활성화되면서, 여러 가지 단백질 분해효소들과 활성산소기를 유리하여 세균들을 제거한다. 하지만 염증이 심해지면, 신체보호 목적의 염증반응이 정도를 초과하여 촉발됨으로써 심각한 자체 조직손상을 일으키는 데까지 발전하게 된다. 이런 조직손상은 다시 염증을 일으키는 연쇄반응을 유발하는데, 이렇게 중증 감염에 의한 폐혈증 때 감염 부위가 아닌 전신 조직에 조직세포 손상이 발생하는 기전으로서, 세균의 내독소와 세포파괴 부산물들이 전신 혈중으로 유리되면서 그에 의해 자극받은 백혈구계 세포들이 TNF- α 와 Interleukin 등의 세포분비물질들을 유리하고, 이들 세포분비물질들에 의해 다시 백혈구계 염증세포들이 더욱 자극되면서 세포들에서 단백분해 효소와 세포독성 산소기를 만들어 분비하고 이들이 혈관세포 및 조직세포의 세포막 혹은 세포내 기관에 과산화 손상을 주게 되어 세포기능 이상 및 세포사를 일으키게 된다는 설명에 어느 정도 합의에 도달한 것 같다^{32,33}. 이러한 조직손상이 폐나 간, 콩팥과 같은 중요장기 (vital organ)의 기능이상이나 기능부전을 초래하게 되면 다장기 기능부전증후군 (MODS : multiple organ dysfunction syndrome)으로 발전하게 되고^{34,35}, 특히 폐 기능부전증인 급성 호흡부전증후군은 수술 후 상당히 빈발하여 술후 사망원인의 중요한 자리를 차지한다. 근간에 산화질소의 병태생리학적 역할이 알려지면서, 폐혈증시 과다한 산화질소의 생성이 혈관수축제에 반응하지 않는 폐혈증성 저혈압 및 전신 장기조직 혈액관류 부전의 중요한 원인임이 밝혀져 있다.

이 실험에서 혈중 TNF- α 를 측정하였는데, 혈중 TNF- α 의 증가는 예상했던 것보다 분명하지 않았다. 실제로 TNF- α 는 내독소 등에 의해 거식세포나 임파구가 자극되면 수분 내에 다량이 분

비되며 90~12분에 혈중 최고치를 보인다고 알려져 있으며, TNF- α 의 혈중 반감기는 14~18분 정도이다³⁶. 따라서 24시간 이전에 상당히 높은 TNF- α 분비의 최고점을 이미 지나서 감소추세에 있는 말단 부위의 TNF- α 수치를 24시간과 48시간에 측정한 것으로 추정된다. 따라서 비타민-C와 성장호르몬의 TNF- α 생성억제 작용이 24시간과 48시간에는 충분히 드러나지 않았을 가능성이 있다. 이 실험의 결과에서는 정상군에 비하여 LPS를 주사한 군에서는 혈중 TNF- α 가 5~6배정도 현격히 증가하는 양상을 보였다. 이는 다른 연구자들의 보고와 부합되지만³⁷, 증가수치가 낮은 편이고 측정시간도 너무 큰 편이다. TNF- α 의 혈중 농도는 내독소 주사 후부터 상당히 증가하여 내독소의 유입이 지속되지 않는다면 혈중농도가 빠르게 감소할 수 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 TNF- α 는 단백분해 효소 및 산소기의 생성을 자극하고, i-NOS 유도를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서 통계적 유의성은 증명되지 못했으나 비타민-C와 성장호르몬이 내독소주사 혈중 TNF- α 의 증가를 억제하는 작용을 보였다는 점에 주목할 필요가 있다. 비타민-C와 같은 항산화제가 TNF- α 의 생성 자체에도 어떤 방식인지는 모르지만 영향을 미친다는 사실이다. 성장호르몬이 TNF- α 의 생성을 억제하는 기전에 대해서도 알려진 바가 없다. 하지만 비타민-C가 다른 효과가 아닌 항산화 작용 자체로만 TNF- α 생성억제 기능을 하는 기전을 설명할 수 있다면, 성장호르몬도 동일한 기전에 의할 가능성이 있다. 폐혈증에서 TNF- α 와 IL-6등의 혈중 농도가 높을수록 사망률이 높다는 비례관계를 증명하는 연구들이 다수 있으며³⁸, 따라서 이 세포분비물질들을 감소시키는 조작을 통해 환자 생존률을 개선하고자 하는 시도가 이루어졌다³⁹.

이 실험에 의하면, LPS 복강내 주사 후 폐와 간 조직내의 MDA 양은 대조군의 2~3배로 증가하였으며 카탈라제 활성도는 급속하게 소진되었다. 이는 조직세포의 지질 과산화 반응이 증가하였음을 의미하는데 즉, 조직내 MDA양이 증가한 것은 공격인자인 세포독성 산소기의 발생이 증가하고 방어인자인 체내 항산화 기전인 카탈라제가 감소하면서 조직내 지질과산화의 생성이 촉진된 결과인 것이다. 지질과산화 반응은 여러 가지 병리상태에

서 세포손상의 한 중요한 기전으로 간주되는데, 따라서 그에 대한 치료방책으로 지질과산화 반응의 공격인자를 감소시키거나 방어인자를 증가시켜 세포손상을 방지하려는 노력들이 이루어져 왔다. 최근에 패혈증에서 성장호르몬을 투여하여 좋은 치료 효과를 보고하고 있다⁴⁰. 패혈증시 전신적인 조직 손상이 산소기 발생에 의한 지질과산화 반응에서 유래한다면³⁹, 성장호르몬의 패혈증 치료효과는 성장호르몬이 산소기에 의한 지질과산화 반응을 억제하는 항산화 효과를 갖고 있을 가능성을 시사한다. 이제까지는 성장호르몬의 패혈증 치료효과가 동화작용을 촉진하는 기능, 즉 질소의 손실을 감소시키고 단백질의 합성을 촉진하는 효과^{29,41,42}, 혹은 면역기능을 향진시키는 효과^{43,44}와 관련이 있다고 생각해 왔었으며, 현재까지도 성장호르몬이 산소기를 억제하는 항산화 효과가 있는지에 관해서는 확증적으로 밝혀진 바가 없다. 본 실험에서도 비타민-C와 성장호르몬은 MDA의 생성을 억제하고 카탈라제의 소진을 억제하는 동일한 작용을 나타냈다. 하지만, 약간 서로 다른 점은 MDA 생성억제에는 비타민-C가 더 신속하고 우수한 효능을 보였고, 카탈라제 소진억제에는 성장호르몬이 더 우수한 효능을 보였다는 것이다. 따라서 비타민-C는 직접적인 중화제로 작용하는 반면에, 성장호르몬은 세포 내로 들어가서 IGF (insulin-like growth factor)와 같은 성장인자를 매개체로 하여 m-RNA를 거치는 단백질 합성을 촉진하여 항산화 효과를 발휘하므로 투여시간과 효과발휘 시간에 간격이 필요한 것으로 설명할 수 있다. 생체 내에서 과산화반응이 증가하면 체내에서 생성된 산화질소를 비활성화하는데⁴⁰, 본 실험에서는 산화질소의 양을 직접 측정하지는 못했지만 산화질소 합성효소의 활성도가 증가하는 모양을 나타냈다. 내독소혈증시 내독소 자체와 TNF- α 등이 세포내의 i-NOS의 유도를 촉진한다는 사실은 잘 알려져 있으나, 이것이 과산화반응과 연관하다는 증거는 아직 보고되어 있지 않다. 본 실험의 i-NOS 활성도 증가도 내독소와 TNF- α 의 증가에 의해서 일어난 것으로 생각된다. 성장호르몬은 국내에서 재조합 DNA 기술로 대량 생산이 되므로써 값이 싸지면서 임상적 적용의 범위가 점차 확대되고 있으며, 알려진 효능 외의 치료적 이용을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. MDA 생성의 억제는 산소기에 의한 손상을 억제한다는 것이므로^{45,46}, 실험결과에 의하면 성장 호르몬이 비타민-C와 유사한 정도의 산소기에 의한 손상을 억제하는 기능 즉 항산화 효과를 가지고 있음은 분명하다. 이러한 성장호르몬의 항산화 효과는 투여후 바로 나타나지 않고 24시간이 되어서야 분명하게 나타나므로, 이는 성장호르몬의 항산화 효과가 산소기에 대해 직접적인 작용을 하기보다는 다른 물질의 생성이나 매개를 통해 나타내는 효과일 가능성을 시사한다. 패혈증시 산소기의 발생이 내독소 자체 외에 TNF- α 같은 세포분비물질들과 연관되어 있으므로, 성장호르몬이 이런 세포분비물질들을 매개로 항산화 작용을 할 가능성도 배제할 수 없다. TNF- α 는 산화질소의 생성에도 관련이 깊다. 즉, 아직 분명하지 않으나, 성장호르몬에 의한 전반적인 단백질 합성의 증가로 thiol-군과 같은 산소기의 중화에 사용될 수 있는 단백질의 절대량이 많아져서 그럴 수도 있고, 성장호르몬이 serine protease inhibitor m-RNA를 유도하여 protease inhibitor의 혈중농

도를 증가시켜 항산화성 작용을 할 가능성^{47,48}이 있으며 역시 i-NOS의 m-RNA의 생성이나 m-RNA로부터의 i-NOS의 합성을 촉진하여 충분한 산화질소를 생성함으로써 산화질소가 활성 산소기를 중화시킴으로써 항산화성 작용을 할 가능성도 가질 수 있다. 그러나 본 실험에서는 성장호르몬이 오히려 내독소혈증시 i-NOS의 활성도의 증가를 감소시키는 작용을 하였다.

문헌에 의하면 신생아 동물모델이 성인 동물모델보다 산소기에 의한 과산화성 손상에 더 내성이 강하며, 성인 동물모델에서 항산화 기능이 약한 것은 성체가 되면서 성장호르몬의 분비가 감소하기 때문이라고 하였고⁴⁹, 나이가 많은 실험동물에서 어린 동물에 비해 내독소혈증에 의한 치사율도 더 높는데 이는 내독소혈증시 나이 많은 동물에서 혈중 TNF- α 와 산화질소의 농도가 더 높은 것과 연관하다는 최근 보고도 있다⁵⁰. 성장호르몬이 본 실험과 같이 TNF- α 와 산화질소 합성효소의 활성화를 억제한다면 나이의 증가에 따라 내독소혈증에 대한 사망율이 증가하는 것은 성장호르몬이 나이가 들면서 감소하여 TNF- α 의 생성과 산화질소 합성효소의 활성화가 더 많이 일어나기 때문일 것으로 설명될 수 있다⁴⁹.

지금까지 패혈증과 관련된 성장호르몬의 효과에 관한 연구들은 주로 성장호르몬의 대사작용 즉 동화작용과 면역증강 작용의 측면에서 알아본 것이 대부분이었다^{44,51}. 이들은 패혈증이나 심한 화상에서 성장호르몬을 투여하면 음성 질소균형을 개선하여 단백질의 손실을 줄이고 치사율을 줄일 수 있다고 보고하였다. 패혈증으로 사망에 이르는 환자의 경우 TNF- α 와 IL-6의 수치가 계속적으로 증가하므로, 성장호르몬이 패혈증의 사망율을 감소시키는 치료효과를 나타낸다면, 이런 TNF- α 와 IL-6의 생성억제를 통해 나타내는 것일 가능성이 있다. 본 실험에서도 패혈증에 의한 TNF- α 의 증가를 성장호르몬과 비타민-C가 억제하는 경향을 확인할 수 있었으며 성장호르몬이 더욱 두드러졌다. 성장호르몬과 비타민-C가 어떤 기전으로 TNF- α 의 생성을 억제시키는지 아직 설명할 수가 없다. PGE₂가 TNF- α 의 생성을 억제하는데 중요하며, 화상시 PGE₂의 감소로 TNF- α 의 분비 억제 기능이 감소되어 TNF- α 가 증가한다는 보고가 있다³⁷. 성장호르몬 및 비타민-C와 PGE₂와의 관계에 관한 실험이 선행되고 PGE₂와 TNF- α 와의 관계에 대한 확인 실험이 이루어져야 보다 확실한 설명이 가능하겠다. TNF- α 가 직접적으로 과산화수소의 합성에 관여하지는 않는다는 보고가 있고³⁹, 세포내의 카탈라제의 활성도를 변화시키지는 않지만 다른 항산화 효과를 가지는 기전을 억제하여 산소기에 의한 손상을 증가시킨다는 연구가 있다⁵⁰. 본 실험에서는 성장호르몬이 TNF- α 의 생성을 억제하고 동시에 카탈라제의 활성도의 소진을 억제하는 양상을 보였는데, 성장호르몬의 카탈라제에 대한 작용은 TNF- α 를 매개하지 않았다고 보아야 하겠다.

산화질소가 혈관확장을 일으키는 혈관내피유래 확장인자(EDRF)와 동일한 물질이고, 패혈증성 쇼크 발생시 i-NOS가 과다하게 활성화되어 혈관벽의 민무늬 근육세포가 과다하게 이완되어 혈관 수축제나 강심제의 투여에 반응을 하지 않게 된다는 사실들이 알려지면서^{21,52}, 패혈증에서 산화질소의 생성을 억제하여 쇼크를 치료하고자 하는 연구들이 많이 진행되었다. 하지만, 실

제로 패혈증성 쇼크시 저혈압을 교정하고자 i-NOS의 활성화를 차단한 동물실험 및 임상실험에서, 대부분의 결과들은 패혈증시 i-NOS의 억제제 혈압은 상승시키지만⁵⁵⁾ 오히려 조직 관류량을 감소시키고 사망률을 증가시키는 사실을 증명하였다^{31, 56)}. 산화질소의 기능 중에 혈관 내피의 혈소판 및 백혈구의 부착과 응집을 억제하는 기능이 있는데, N-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)이나 N-monomethyl-L-arginine (NMA) 같은 산화질소 합성효소 차단제를 사용하면 혈관의 수축기능은 회복되어 혈관수축제에 반응하여 혈압이 상승하는데 반하여, 수축하여 좁아진 혈관의 혈관 내피에 혈소판과 백혈구의 부착 및 응집이 증가하여 혈관 손상과 폐색을 일으켜 장기조직내의 미세 혈액 순환이 차단되므로, 조직세포로 가는 실제적인 혈류량이 감소하여 조직 허혈은 더욱 조장되는 것이 문제가 되었다⁵⁴⁾. 혈관내피에 대한 이러한 산화질소의 역할은 허혈-재관류 손상시에도 확인되어 있다⁵⁷⁾. 내독소혈증시 체내 산화질소의 생성이 증폭되는바⁵⁸⁾, 본 연구에서도 LPS 복강내 주사 후 24시간에 정상군의 약 4~5배에 가까운 i-NOS 활성도의 증가가 발생하였으며, 비타민-C와 성장호르몬을 투여하였을 때 치료적 효과가 기대되는데도 불구하고 둘다 i-NOS의 활성화 증가를 억제하였다. TNF- α 가 i-NOS의 유도를 촉진하는 인자임을 고려하면, 비타민-C와 성장호르몬의 TNF- α 의 생성억제 효과를 매개로 i-NOS의 활성화 증가를 억제하는 것으로 설명할 수 있다. 이 설명을 정확히 증명하기 위해서는 많은 연구가 뒤따라야 하겠지만, 패혈증시 성장호르몬의 투여가 치료적 효과를 보였다는 다른 연구자들의 보고를 인용할 때 i-NOS의 활성화 억제가 치료적 효과의 일부인가 하는 점이 의문이다. 패혈증시 i-NOS 차단제를 투여한 많은 실험에서 오히려 해로운 결과를 보고하고 있으며^{31, 54)}, 패혈증에서 i-NOS가 활성화되는 것이 생체 보호기전의 일부로도 이해되고 있다^{59, 60)}. 그렇다면 본 실험에서 유익한 효과가 예상되는 비타민-C와 성장호르몬의 산화질소 합성효소 활성화 억제 작용의 의미는 무엇인가? 세포 배양 등의 방법으로 시행한 in Vitro 실험에서는 산화질소의 세포독성 효과를 주장한 연구들이 다수 있지만 in Vivo 실험에서는 산화질소가 대체로 세포 보호작용을 가진다고 보고하고 있다⁵⁸⁾. 패혈증시 i-NOS에 의해서 생성된 고농도의 산화질소가 간세포에 의한 단백질 합성 (급성 단계 단백질 포함)을 증가시키고 사망률을 감소시킨다고 하였다⁶¹⁾. 성장호르몬도 패혈증시 단백질 합성을 증가시킨다. NAME나 NMA와 같은 L-arginine analogue 형태의 i-NOS 차단제를 사용한 여타 실험의 결과들과 다른 점은 L-arginine analogue를 사용한 경우는 생성된 산화질소의 양이 정상치와 비슷하거나 그 이하였던 반면에, 비타민-C나 성장호르몬을 투여한 경우는 i-NOS의 활성도가 내독소혈증만 유발한 군보다는 낮지만 정상대조군보다는 역시 유의하게 높은 수준이라는 것이다. 간세포에 의한 단백질 합성의 정도와 혈관내피의 기능유지가 패혈증시 조직 보호와 중요한 연관을 가진다면, 패혈증에서의 성장호르몬과 비타민-C의 치료적 효과가 활성산소기에 의한 혈관내피 및 조직세포에 대한 보호작용을 가지면서 어느 정도의 혈관내피 기능은 유지할 정도의 산화질소는 생성시키는 것 때문일 가능성이 있다⁶²⁾. 반대로 산화질소가 패혈증에서 혈역학적으로

대사적으로 중요한 기능을 가지지만, 성장호르몬이나 비타민-C의 투여 효능에 있어서는 효능의 매개변수가 아니라 단순한 결과변수에 불과하지 않을 가능성을 추정할 수도 있다. 산화질소는 그 생성량과 생성장소 및 환경에 따라서 이롭거나 해로운 작용을 하는 양면성을 가진 물질로 알려진 바와 같이^{20, 59)}, 패혈증시 산화질소의 생성 자체를 차단하면 역작용이 나타나지만, 적절한 정도의 산화질소 생성을 허용한 상태에서 세포분비물질이나 기타 매개물질을 조절하여 유해한 산화질소의 생성을 줄인다면 역작용이 안 나타나는 것일 수도 있겠다. i-NOS는 주로 전사 후 조절에 의해서 합성량이 결정되는 효소이다. 성장호르몬이나 비타민-C가 i-NOS에 미치는 영향을 정확히 판단하기 위해서는, 이 물질들이 전사인자 NF- κ B에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 뒤따라야 하리라고 본다. 덧붙여, 산화질소의 세포보호적 작용과 세포파괴적 작용의 경계점이 어디인지에 대한 추가 연구도 필요성이 인정된다. 과량의 산화질소는 세포기능을 차단하는 파괴적 작용을 가진다는 사실이 알려져 있는데, 패혈증에서의 산화질소 차단 효과에 관한 연구들 중에는 아직까지 c-NOS와 i-NOS를 각각 분리-차단하여 그 효과를 알아본 실험은 아직 없으며, 산화질소의 생성량별 효과에 대한 연구도 아직 없다. 전반적 NOS 차단제인 NAME나 NMA 등외에 선택적 i-NOS 억제제가 개발되든지 i-NOS도 정량적으로 차단할 수 있는 방법이 개발되면 보다 명확한 설명이 가능할 것으로 본다.

이 실험에서 육안적 소견으로는 폐 조직손상은 뚜렷하였으나, 간 조직손상은 상대적으로 경미하였다. 이것은 해부조직학적 특성상 폐포구조가 간 소엽구조에 비하여 동일한 손상에도 더 심각한 손상소견을 보이기 때문으로도 생각되지만, 조직간의 과산화반응에 대한 내성에서도 차이가 있을 가능성이 있다⁶³⁾. 즉, 간 조직은 폐 조직에 비하여 항산화 작용의 예비능이 더 크다고 보아진다. 또한 간 세포는 재생능력이 뛰어나므로 48시간대에는 거의 정상상태로 회복된 소견을 보였다.

본 실험에서도 TNF- α , 과산화 반응 및 산화질소 상호간의 관계에 관한 의문이 해소되지 못하였다. 본 실험결과와 문헌에 의하면, 성장호르몬의 역할에 TNF- α 가 중심적인 역할을 할 가능성은 상당히 크다. 알려진 바에 의하면, 내독소에 의해서 촉발된 TNF- α 의 생성이 이후의 과산화반응과 i-NOS의 활성화를 유도하는 것으로 생각된다⁵⁸⁾. 하지만, 과산화반응이 산화질소 합성효소의 유도를 억제할 수도 있는 반면에, 생성된 산화질소가 거꾸로 과산화 반응에 영향을 미칠 수도 있다^{57, 64, 65)}. SOD (superoxide dismutase)나 비타민-C를 투여하면 산화질소에 의한 혈관내피의 기능을 보호한다는 연구가 있다^{38, 66, 67)}. TNF- α 가 i-NOS의 생성을 유도하는 것은 확인이 되었으나 TNF- α 가 산화질소의 혈관내피 기능유지 역할을 방해한다는 보고가 있으며⁶⁸⁾, 산화질소가 TNF- α 의 생성에는 다시 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 아직 실험결과가 일치되어 있지 않다. 본 실험에서 TNF- α 가 핵심적인 역할을 할 가능성이 높아 보이지만, 대표적인 항산화제인 비타민-C가 성장호르몬과 유사한 TNF- α 생성억제 효과를 보이며 동시에 산화질소 생성억제 효과도 나타내었다는 점에서, TNF- α 와 과산화 반응 및 산화질소 상호관계에 대한 보다 다양한 방향의 연구가 필

요하다고 생각한다.

V. 결 론

중증의 그람음성균 감염에 의한 패혈증시, 성장 호르몬과 비타민-C가 내독소혈증으로 인한 폐와 간 손상을 억제하는 효과가 있는지 알아보고 그의 항산화 작용, TNF- α , 산화질소와의 관계를 규명하기 위해 LPS로 패혈증을 유발시킨 백서를 사용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS의 복강내 주사는 간 조직에 동모양 혈관의 확장과 경미한 조직 미세구조의 파괴를 가져 오고 폐 조직에서는 폐포 구조의 부종과 비후를 유발하였다. TNF- α 는 초기부터 급속하게 증가하였다. 활성산소기에 의한 조직세포 손상을 의미하는 MDA의 농도도 폐와 간에서 유의하게 증가하였으며, 조직내 카탈라제의 활성도는 급속하게 소진되었다. 조직내 i-NOS의 활성도는 24 시간대에 급속히 높았다가 감소하였다.
2. 비타민-C의 투여는 폐와 간 조직손상의 병리조직학적 소견인 폐의 염증세포의 침윤 및 폐포벽부종 및 비후를 억제하고, 간의 조직 미세구조의 파괴 등을 차단하는 효과를 보였다. 비타민-C는 TNF- α 의 생성을 감소시키는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었다. 폐와 간 조직에서 초기부터 강한 항산화 작용을 나타내어 LPS 주사에 의한 MDA 생성 증가를 억제하였고, 카탈라제 활성도 소진을 억제하였다. 비타민-C는 패혈증시 나타나는 폐와 간 조직내의 i-NOS의 유도를 억제하는 효과를 나타내었다.
3. 성장호르몬은 비타민-C와 비슷하게 폐와 간의 염증 소견과 조직 미세구조의 파괴 소견을 억제하는 효과를 보였다. 성장호르몬은 TNF- α 의 증가를 억제하는 작용을 보였으나 통계적인 유의성은 24시간대에만 있었다. 성장호르몬은 폐와 간 조직에서 LPS 주사에 의한 MDA생성을 감소시켰다. 카탈라제 활성도를 증가시키는 작용은 특히 간 조직에서 뚜렷하였다. i-NOS 활성도에 대해서는 폐와 간 모두에서 비타민-C 보다 현저한 억제효과를 보였다.
4. 성장호르몬과 비타민-C의 효과를 비교해 보면, 내독소 혈증시 전신적인 조직 손상을 차단하는데 비슷한 양상을 보였다. 이상의 결과를 종합해 보면 성장 호르몬의 조직 손상 억제 기전은 Catalase 등의 여러 항산화 효소의 생성을 촉진하는 항산화 작용과 TNF- α 의 생성억제에 의한 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Fry DE, Garrison RN, Heitsch RC, et al. : Determinants of death in patients with intraabdominal abscess. *Surgery*. 88 : 517, 1980.
2. Bartlett JG, O'Keefe P : The bacteriology of perimandibular space infections. *J. Oral Surg*. 37 : 407, 1979.
3. Hought RT, Fitzgerald BE, Latta JE, Zallen RD : Ludwig's angina ; report of two cases and review of the literature from 1945 to January 1979. *J. Oral Surgery*. 38 : 849, 1980.

4. 이동근, 임창준, 민승기 : 구강화농성감염증에 관한 세균학적 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 13(1) : 285, 1987.
5. 권준호, 윤중호 : 구강악안면부위 급성 감염환자의 치료 경과에 대한 임상적 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 16 : 47, 1990.
6. Babior BM, Peters WA : The O₂-producing enzyme of human neutrophils ; further properties. *J Bio Chem*. 256 : 2321, 1981.
7. Bidlack WR, Tappel AL : Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids*. 8 : 177, 1973.
8. Balz F, Roland S, Bruce N : Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85 : 9748, 1988.
9. Denniss KJ, Shibamoto T : Gas chromatographic determination of malondialdehyde formed by lipid peroxidation. *Free rad Biol Med*. 7 : 187, 1989.
10. Demling R, LaLonde C : Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period. *J. Trauma*. 30 : 69, 1990.
11. Demling R, Seekamp A, Lalonde C, et al. : Catalase prevents prostanoid release and lung lipid peroxidation after endotoxemia in sheep. *J. Appl Physiol*. 65:1210, 1988.
12. Heffner JE, Repine JE : Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 140 : 531, 1989.
13. Turren JF, Crapo JD, Freeman BA : Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest*. 73 : 87, 1984.
14. Garry RB : The pecking order of free radicals and antioxidants ; lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. of Biochem. and Biophys*. 300(2) : 535, 1993.
15. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB : Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 161 : 488, 1991.
16. Debets JM, Kampmeijer R, Van der Linden MPMH, et al. : Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med*. 17 : 489, 1989.
17. Drost AC, Bursleson DG, Cioffi WG, et al. : Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn. *J Trauma*. 35 : 335, 1993.
18. Fugger R, Hamilton G, Steininger R, et al. : Intraoperative estimation of endotoxin, TNF alpha, and IL-6 in orthotopic liver transplantation and their relation to rejection and postoperative infection. *Transplantation*. Aug ; 52(2) : 302, 1991.
19. McNarama DB, Bedi B, Aurora H, et al. : L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res*. 193 : 291, 1993.
20. Feldman PL, Griffith O, Stuehr D : The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News*. 71 : 26, 1993.
21. Timothy R. Nitric oxide : Novel biology with clinical relevance. *Ann. of Surg*. 221(4) : 339, 1995.
22. Ulrich F, Hartmut K : Nitric oxide synthase ; expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm*. 352 : 351, 1995.
23. Qiao-wen X, Yuki K, Carl N : Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. of Biol. Chem*. 269(7, Feb. 18):4705, 1994.
24. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, et al. : Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. of Biol. Chem*. 269 : 6765, 1994
25. Hiroyuki K, Toshiaki N, Tsuyoshi K, et al. : Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg. Res*. 59 : 772, 1995.
26. Koichi N, Nobukazu W, Kenjiro M, et al. : Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci*. 88(Nov.) : 10045, 1991.
27. Gatzen C, Scheltinga MR, Kimbrough TD, et al. : Growth hormone attenuates the abnormal distribution of body water in critically ill surgical patients. *Surgery*. 112 : 181, 1992.
28. Gottardis M, Benzer A, Koller W, et al. : Improvement of septic syndrome after administration of recombinant human growth hormone?

- J Trauma. 31 : 81, 1991.
29. Manson JM, Smith RJ, Wilmore DW : Growth hormone stimulates protein synthesis during hypocaloric parenteral nutrition : role of hormonal-substrate environment. *Ann Surg.* 208 : 136, 1988.
 30. 이중의, 윤여규 : 폐혈증에서의 TNF- α 의 변화와 장기손상의 상관관계. *대한 의상학회지.* 9 : 18, 1996.
 31. Emery A, Jian S, Hassan N, et al. : Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg.* 129(Feb.): 142, 1994.
 32. Beers RF, Sizer IW : A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Bio Chem.* 195 : 133, 1952.
 33. Frank L, Summerville J, Masaro D : Protection from oxygen toxicity with endotoxin. *J Clin Invest.* 65 : 1104, 1980.
 34. Eiseman B, Beart R, Norton L : Multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet.* 144 : 323, 1977.
 35. Livingston DH : Management of the surgical patient with Multiple system organ failure. *Am J Surg.* 165(suppl) : 8s-13s 34, 1993.
 36. Fong Y, Moldwer LL, Shires GT, et al. : The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gyn & Obst.* 170 : 363, 1990.
 37. Molloy RG, Riordain MO, Holzheimer R, et al. : Mechanism of increased tumor necrosis factor production after thermal injury. *J Immunology.* 151 : 2142, 1993.
 38. Damas P, Reuter A, Gysen P, et al. : Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med.* 17 : 975, 1989.
 39. Yim JH, Terawi A, Pearce MK, et al. : Monoclonal antibody against murine IL-6 prevents lethal effects of E. coli sepsis and TNF challenge in mice. *Surg Forum.* 41 : 114, 1990.
 40. Voerman HJ, Strack RJM, Groenvelde ABJ, et al. : Effects of human growth hormone in patients with sepsis. *Ann Surg.* 216 : 648, 1992.
 41. Douglas RG, Humberstone DA, Haystead A, et al. : Metabolic effects of recombinant human growth hormone: isotopic studies in the postabsorptive state and during total parenteral nutrition. *Br J Surg.* 77 : 785, 1990.
 42. Okamura K, Okuma T, Tabira Y, et al. : Effect of administered human growth hormone on protein metabolism in septic rats. *JPEN.* 13(5) : 450, 1989.
 43. Crist DM, Kraner JC : Supplemental growth hormone increases the tumor cytotoxic activity of natural killer cells in healthy adults with normal growth hormone secretion. *Metabolism.* 39(12) : 1320, 1990.
 44. Christensen H, Mitchell RA, Smith S, et al. : Altered immunologic function and nitrogen metabolism associated with depression of plasma growth hormone. *JPEN.* 8 : 690, 1984.
 45. Takeda K, Shimada Y, Okada M, et al. : Lipid peroxidation in experimental rats. *Crit Care Med.* 14 : 719, 1983.
 46. Takeda K, Shimada Y, Amano M, et al. : Plasma lipid peroxides and -tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med.* 12 : 957, 1984.
 47. Yoon JB, Towle HC, Seelig S : Growth hormone induces two mRNA species of the serine protease inhibitor gene family in rat liver. *J Biol Chem.* 262 : 4284, 1987.
 48. Griffiths RJ, Li SW, Wood BE, et al. : A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. *Agents-Actions.* 32 : 312, 1991.
 49. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ : Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol.* 45: 699, 1978.
 50. Chorinchath BB, Kong LY, Mao L, et al. : Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice *J Immunol.* Feb 15; 156(4) : 1525, 1996.
 51. Fleming RYD, Rutan R, Jahoor FJ, et al. : Effect of recombinant human growth hormone on catabolic hormone and free fatty acid following thermal therapy. *J Trauma.* 32 : 698, 1992.
 52. Royall JA, Gwin PD, Parks DA, et al. : Responses of vascular endothelial oxidant metabolism to lipopolysaccharide and TNF- . *Arch Biochem Biophys.* 294 : 686-694, 1992.
 53. Ishii Y, Partridge CA, Del-Vecchio PJ, et al. : TNF- mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H2O2. *J Clin Invest.* 89 : 794, 1992.
 54. Frank M, Patrick J, David P, et al. : Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg.* 129(Feb.): 149, 1994.
 55. NG-methyl-L-arginine inhibits TNF-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 : 3629, 1990.
 56. J. Perren C, Charles N, William D, et al. : N ω -amino-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp. Med.* 176 : 1175, 1992.
 57. Jakob V, Hiroki S, Zhi Q : The role of nitric oxide and NO-donor agents in myocardial protection from surgical ischemic-reperfusion injury. *Int. J. of Cardio.* 50 : 273, 1995.
 58. J. Frederick, P. Hasselgren, S. Davis, et al. : Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein synthesis during endotoxemia. *Arch. Surg.* 128(Feb.) : 152, 1993.
 59. Erik A : Nitric oxide ; mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 343(May 14) : 1199, 1994.
 60. Kazunori K, Takeyoshi S, Hiroki N, et al : Role of nitric oxide durin carrageenan-sensitized endotoxin shock in mice. *Life Sciences.* 57(25) : 2309, 1995.
 61. Brian G, Timothy R, Josef S, et al. : Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit. Care Med.* 20(11): 1568, 1992.
 62. Francisco R, Martins L, Marcolo A, et al. : Vascular free radical release ; Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circul. Res.* 74: 700, 1994.
 63. Clark JM, Lambertsen CJ : Pulmonary oxygen toxicity. A review. *Pharmacol Rev.* 23 : 37, 1971.
 64. Ines B, Marcel L, Johannes B, et al. : IL-1 and nitric oxide protect against TNF- α -induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology.* 22(6): 1829, 1995.
 65. James A, Crol L, Edythe D : Interaction of ascorbic acid with the neurotoxic effects of NMDA and sodium nitroprusside. *Life Sciences.* 58(4) : 367, 1996.
 66. Andreas M, James H, Timothy E, et al. : Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circul. Res.* 69 : 1293, 1991.
 67. Henry H, Farris K, Kimberly S, et al. : Vitamin-C improves endothelium -dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 97(1): 22, 1996.
 68. Nobuo A, Martin S, Allan M : Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries. *Am. J. Physiol.* H1509, 1989.