

Lipopolysaccharide에 의한 Heme Oxygenase Induction과 Carbon Monoxide 생성이 혈관수축력에 미치는 영향

장우성 · 손의동* · 이석용[#]

성균관대학교 약학부, *중앙대학교 약학대학

(Received January 2, 2001; Revised February 1, 2001)

Effects of Lipopolysaccharide-Induced Heme Oxygenase and Carbon Monoxide Production on the Aortic Contractility

Woo-Sung Chang, Uy Dong Sohn* and Seok-Yong Lee[#]

Lab. of Pharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University

Lab. of Pharmacology, College of Pharmacy, ChungAng University

Abstract – Heme oxygenase is a rate-limiting enzyme in heme catabolism that cleaves heme to form biliverdin, iron, and carbon monoxide. Heme oxygenase-1 is expressed in many types of cells and tissues and is highly induced in response to oxidative stress. Carbon monoxide, one of the products of heme oxygenase, can stimulate soluble guanylate cyclase and dilate the vascular smooth muscle. So, the induction of heme oxygenase by lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress and the effect of the resultant carbon monoxide on aortic contractility were examined in this study. Zinc protoporphyrine IX (ZnPP), a inhibitor of heme oxygenase, elicited weak contraction of thoracic aortic ring, and this effect was more potent in aorta of LPS-treated rats than control and was blocked by methylene blue. The hyperreactivity to ZnPP in LPS-treated group was blocked by co-treatment with aminoguanidine. In the aortic ring of LPS-treated rats, ZnPP didn't change the vasoreactivity to phenylephrine or acetylcholine. ZnPP elicited hypertensive effect in conscious rats, and pretreatment with LPS did not affect this effect. Prazosin significantly diminished the hypertensive effect of ZnPP. These results indicate that LPS induced heme oxygenase in aorta, and the resultant carbon monoxide diminished the aortic reactivity to vasoconstrictor.

Keywords □ Lipopolysaccharide, heme oxygenase, carbon monoxide, aorta

Nitric oxide(NO)와 비슷한 물리화학적 특성을 가진 또하나의 gas상태의 신경전달물질 또는 생리기능 조절 물질로서 대두되고 있는 것이 carbon monoxide(CO)이다.^{1,2)} CO는 NO처럼 해마(hippocampus)에서 long-term potentiation의 retrograde messenger로서의 역할³⁻⁵⁾ 알려져면서 neurotransmitter로서 인정되고 있다. CO는 brain뿐만 아니라 말초의 여러 조직 세포에 존재하는 microsomal 효소인 heme oxygenase에 의해 heme가 대사될 때 biliverdin과 함께 생성된다.¹⁾

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-290-7718 (팩스) 031-290-7738

heme oxygenase(HO)는 HO-1과 HO-2 및 HO-3라는 세 가지 form으로 존재한다.^{1,6)} HO-2와 HO-3는 induction되지 않는 constitutive form이며^{6,7)} HO-1은 이 효소의 기질인 heme,⁸⁾ cobalt나 arsenite와 같은 금속이온,^{7,9)} 그리고 여러 가지 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해^{10,11)} 유도(induction)된다. HO-3는 아직 제대로 연구되지 않았으며, HO-1과 HO-2 두 isoform의 조직분포는 많은 차이가 있는데, HO-1은 비장과 간에 높은 분포를 나타내고 HO-2는 종추신경계와 고환에 높은 분포를 나타낸다.¹²⁻¹⁴⁾ 최근, 배양한 대동맥의 평활근 세포에서 HO-2의 존재가 확인되고 있으며^{15,16)} 또한 CoCl₂나 SnCl₂ 등에 의해

HO-1의 induction이 관찰되어^{15,16)} 대동맥 혈관에서도 CO가 생성될 수 있음을 시사하고 있다. 외인성 CO가 NO와 마찬가지로 guanylate cyclase를 활성화시키며,^{1,15)} 적출된 혈관 평활근을 이완시킴이 관찰되어¹⁷⁾ 내인성 CO가 또 하나의 혈관이완인자로서 작용할 가능성이 제기되고 있다.

한편 lipopolysaccharide(LPS)는 endotoxin으로서 생체에 정맥투여시 심한 혈압강하(또는 shock)와 여러 조직에 산화적 손상(oxydative damage)을 일으킨다.¹⁸⁻²¹⁾ 혈압강하는 혈관내피세포 등에서 induction되는 inducible NO synthase에 의해 생성되는 과량의 NO가 주원인이며 조직손상은 superoxide나 hydrogen peroxide 등과 같은 활성산소물질(reactive oxygen species)의 생성 증가가 주원인으로 알려져 있다.²²⁾ 위에서 언급한 CO생성 효소인 HO는 조직이 여러 가지 oxidative stress에 의해 자극을 받을 때 induction되어 산화적 손상으로부터 조직을 보호하는 역할을 하며,¹¹⁾ 또한 최근 과량의 NO가 간조직에서 HO-1의 induction을 일으킨다는 보고²³⁾도 있어, 혈관조직에 oxidative stress를 주며 또한 과량의 NO를 생성하게 하는 LPS¹⁸⁻²¹⁾의 투여는 혈관조직에서 HO-1의 induction을 일으킬 것으로 생각된다. 또한 induction된 HO-1에 의해 다량의 CO가 생성되며 되고 생성된 CO는 혈관을 이완시킬 것이며 이것이 LPS투여와 관련된 혈관운동성의 변화에 관여할 가능성이 있다.

따라서 본 연구에서는 LPS투여에 의한 혈관내 heme oxygenase의 induction과 그 기전을 관찰하고 혈관운동성의 변화에 있어서 CO의 역할을 규명하고자 하며 이를 통하여 내인성 CO가 또하나의 혈관이완인 자임을 확인하여 보고자 하였다.

실험방법

실험동물

실험 동물은 체중 250~300 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 숫컷을 사용하였다. 사육환경은 동물실 내의 명암 주기를 12시간으로 자동 조절시켰으며 온도는 22±3°C, 습도는 50±14%로 유지하였고 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

약물 투여

LPS(5 mg/kg)는 흰쥐를 ether로 가볍게 마취시킨 후

음경정맥을 통하여 주입하였으며 대조군은 동일 용량의 식염수를 주입하였고 약물투여 12시간후 실험에 사용하였다.

대동맥의 enzyme 분획 제조

5 마리의 흰쥐를 단두하고 적출한 대동맥을 모아 액체질소에 넣어 급속히 냉동시킨 후 3배 용량의 0.1 M KH₂PO₄ buffer(pH 7.4)에 넣고 homogenizer(glass pestle-glass tube)로 균질화한 후 13,000 g에서 15분간 원심분리하여 상동액을 취하였다. 상동액중의 단백질량을 측정하고 heme oxygenase 활성측정에 사용하였다.

Heme oxygenase 활성 측정

Laitinen과 Juvonen의 방법²⁴⁾을 응용하여 [¹⁴C]heme으로부터 생성된 [¹⁴C]bilirubin의 양을 측정하여 heme oxygenase의 활성을 산출하였다. 즉, 21.3 μM [¹⁴C]heme(62.5 Ci/mol), 2 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 0.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2 mg protein의 biliverdin reductase용액(rat liver cytosol from 105,000 g supernatant), 8-90 μg protein의 enzyme분획을 함유한 반응액 50 μl를 시험관에 넣고 광선이 차단된 상태에서 37°C에서 1시간동안 shaking water bath에서 반응시켰다. 냉각한 0.1 M KH₂PO₄ buffer(pH 7.4) 950 μl를 가하여 반응을 정지시키고 toluene 2 ml를 가하고 가볍게 흔들어 준 후 [¹⁴C]bilirubin을 함유한 toluene층을 scintillation vial에 옮기고 toluene-based scintillation cocktail(PPO 21 g, POPOP 0.9 g, toluene 1 L)을 섞어준 다음 radioactivity를 측정하였다.

혈압측정 실험

혈압에 대한 작용은 무마취하에서 측정하였다. 즉 흰쥐를 ether로 마취시키고 한쪽 대퇴동맥에 heparin을 채운 polyethylene tube를 삽입하고 이를 피하를 통하여 쥐의 발이 닿지 않도록 등쪽에서 밖으로 노출이 되게 수술을 하고 tube의 끝을 봉한 후 마취와 수술로 인한 충격에서 회복되도록 방치하였다. 수술후 24시간이 지났을 때 polyethylene tube의 끝을 pressure transducer에 연결하여 혈압을 측정하였으며 Polygraph(Grass)를 사용하여 이를 기록하였다. 약물은 피하주사로 투여하였다.

혈관운동성 실험

흰쥐를 단두하여 실혈치사시킨 후 thoracic aorta를 취하였다. 대동맥을 37°C의 영양액(119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 15 mM NaHCO₃, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 11 mM glucose, 20 μM hemin)에 담그고 지방과 결체조직을 깨끗이 제거한 후 4 mm의 길이로 잘라 37°C의 5 ml 이중 병안에 현수하고 영양액을 95% O₂-5% CO₂로 계속 bubbling하여 주었다. 혈관의 수축력을 force transducer에 연결하여 physiograph로 기록한다. 15분 간격으로 영양액을 신선한 것으로 교체하여 주었으며 혈관의 기본장력(resting tension)이 안정적으로 1.5 g을 유지할 때까지 수차례 장력을 조절하면서 혈관을 1 시간 이상 안정화시킨 후 약물들의 작용을 측정하였다. 혈관이완작용을 위한 실험을 위하여는 60 mM potassium을 함유한 Krebs용액(60 mM NaCl, 60 mM KCl, 15 mM NaHCO₃, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 11 mM glucose)으로 최고 수축력을 측정한 후 혈관을 세척하고 다시 혈관을 안정화시킨 후 phenylephrine(0.01~10 μM)을 가하여 위에서 측정한 최고 수축력의 50~70% 정도로 수축시킨 다음 약물들의 혈관이완작용을 실험하였다. metal protoporphyrin들이 광선에 민감한 특성을 가지고 있으므로 organ bath에 광선이 차단되게하여 실험하였다.

시약

Zinc protoporphyrine IX, aminoguanidine, lipopolysaccharide 등은 미국의 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 자료분석은 Student's *t*-test를 이용하였으며 *p*<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

실험결과

흉부 대동맥의 heme oxygenase 활성

대조군 흉부 대동맥의 heme oxygenase 활성은 1389±262 dpm [¹⁴C]bilirubin/mg protein이었나 LPS(5 mg/kg, i.v.)를 투여한 후 12시간 경과시 3213±459 dpm [¹⁴C]bilirubin/mg protein으로 유의하게 증

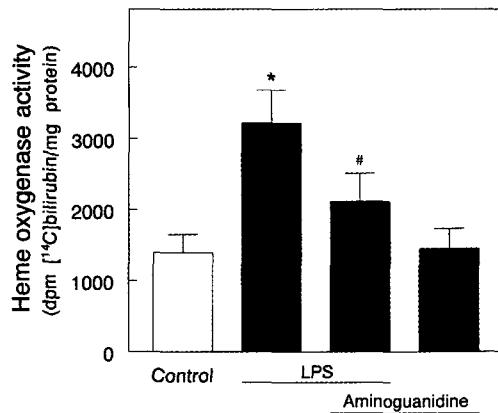


Fig. 1 - Effects of LPS treatment on the heme oxygenase activity in the rat thoracic aorta. LPS (5 g/kg, i.v.) and aminoguanidine (50 mg/kg, i.p.) were injected 12 hrs before experiments. Each value represents the mean ± S.E.M. of five experiments. **p*<0.05 compared with control #*p*<0.05 compared with LPS alone group.

가하였다. 그러나 inducible NOS 억제제인 aminoguanidine(50 mg/kg, i.p.)을 LPS와 함께 투여할 경우에는 대조군에 비해 약간 증가하는 경향은 나타내었지만 유의하지는 않아 aminoguanidine에 의하여 LPS에 의한 heme oxygenase induction이 부분적으로 억제됨을 보여 주었다(Fig. 1).

혈압에 미치는 영향

무마취한 흰쥐에 heme oxygenase 억제제인 zinc protoporphyrine IX(ZnPP, 45 μmole/kg)를 피하주사하여 내인성 CO가 혈압에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조군에서는 투여전 평균혈압이 101.8±3.2 mmHg이었으며 ZnPP투여후 유의한 혈압상승이 관찰되었으며 투여후 30분에 129.9±4.2 mmHg로 최고치를 나타내었다. LPS 투여군에서는 투여전 평균혈압이 93.2±3.2 mmHg이었으며 ZnPP투여후 유의한 혈압상승을 나타내어 30분 경과시 127.4±4.3 mmHg로 최고치를 나타내었다. LPS투여군에서 ZnPP에 의한 혈압상승이 약간 크게 나타나는 경향을 보였지만 유의성은 없었다(Fig. 2).

ZnPP에 의한 혈압상승과 교감신경계의 관련성을 알아보기 위하여 α₁ 수용체 길항제인 prazosin 1 μg/kg을 전처치하고 ZnPP의 영향을 관찰하였는데 대조군과 LPS 투여군 모두에서 ZnPP의 혈압상승작용이 prazosin전처치에 의하여 유의하게 차단되었다(Fig. 3).

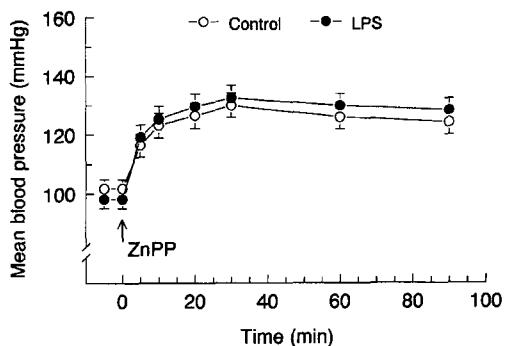


Fig. 2 – Effect of zinc protoporphyrine (ZnPP) on the arterial blood pressure. LPS (5 g/kg, i.v.) was injected 12 hrs before experiments. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments.

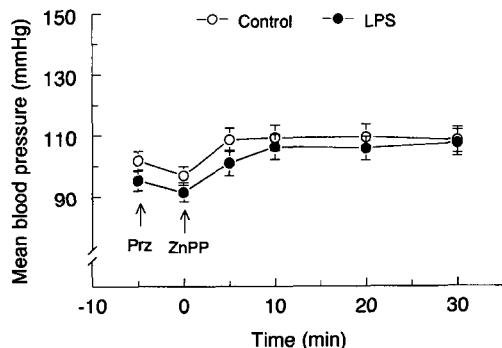


Fig. 3 – Effect of pretreatment of prozosin (Prz, 1 μ g/kg) on the pressor effects of zinc protoporphyrine (ZnPP) on the arterial blood pressure. LPS (5 g/kg, i.v.) was injected 12 hrs before experiments. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments.

흉부 대동맥 혈관수축력에 대한 영향

Hemin을 함유한 영양액내의 대동맥 절편의 수축력에 대한 ZnPP의 영향을 관찰하였는데 ZnPP 0.4 mM을 가하였을 때 대조군의 혈관에서는 10^{-7} M phenylephrine에 의한 수축의 약 9.65% 정도의 수축이 있었으며 LPS 투여군의 혈관에서는 약 19.54%의 수축을 나타내어 LPS 투여군의 혈관에서의 반응이 유의하게 높았다(Fig. 4). 그러나 inducible NOS 억제제인 aminoguanidine(50 mg/kg, i.p.)을 LPS와 함께 투여할 경우에는 LPS에 의한 혈관수축이 부분적으로 억제됨을 보여 주었다(Fig. 4).

ZnPP에 의한 혈관수축 반응은 guanylate cyclase억제제인 methylene blue (10 μ M)의 전처치에 의하여 완전히 차단되었다(Fig. 5).

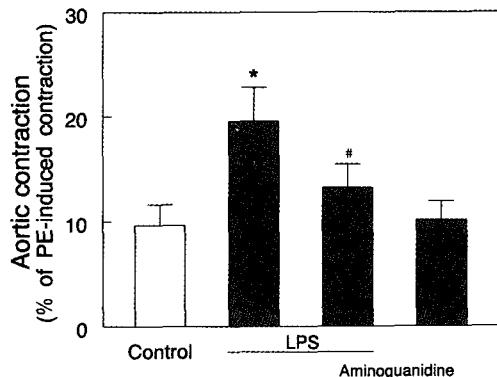


Fig. 4 – Effect of zinc protoporphyrine (ZnPP) on the aortic tone. LPS (5 g/kg, i.v.) and aminoguanidine (50 mg/kg, i.p.) were injected 12 hrs before experiments. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments. * $p<0.05$ compared with control. # $p<0.05$ compared with LPS alone group.

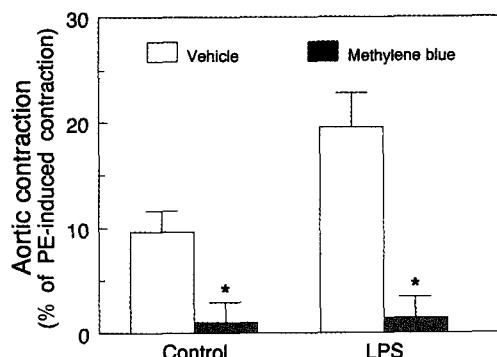


Fig. 5 – Effect of pretreatment of methylene blue on the contractile response to zinc protoporphyrine (ZnPP). LPS (5 g/kg, i.v.) was injected 12 hrs before experiments. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments. * $p<0.05$.

내인성 CO가 혈관수축성물질 또는 혈관이완물질의 작용에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 phenylephrine과 acetylcholine의 작용에 대한 ZnPP전처치의 영향을 관찰하였다. LPS를 투여한 흰쥐의 혈관에서 ZnPP의 전처치가 phenylephrine의 혈관수축작용을 약간 증가시키고(Fig. 6) acetylcholine의 혈관이완작용을 약간 감소시켰으나(Fig. 7) 유의한 변화는 아니었다.

고 찰

말초 장기에서 CO의 역할에 대한 연구는 최근에

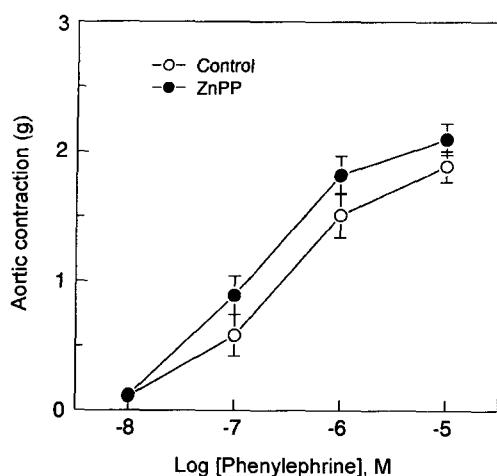


Fig. 6 - Effect of heme oxygenase inhibition on the phenylephrine-induced aortic contraction of LPS-treated rats. LPS (5 g/kg, i.v.) was injected 12 hrs before experiments. Zinc protoporphyrine (ZnPP) was treated 5 min before phenylephrine treatment. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments.

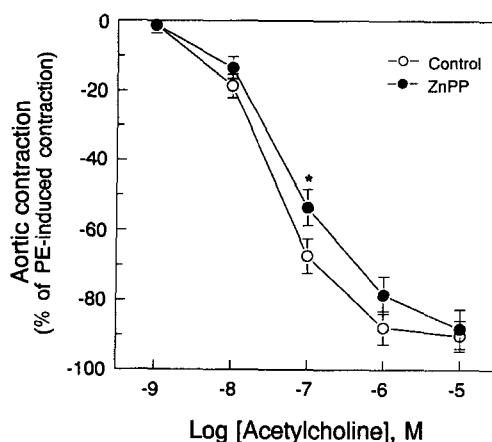


Fig. 7 - Effect of heme oxygenase inhibition on the acetylcholine-induced aortic relaxation of LPS-treated rats. LPS (5 g/kg, i.v.) was injected 12 hrs before experiments. Zinc protoporphyrine (ZnPP) was treated 5 min before phenylephrine treatment. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five experiments. *p<0.05

약간씩 보고되고 있다. 몇몇 보고들이 혈관에서 CO의 역할 가능성을 시사하고 있다. HO를 induction하는 SnCl_2 를 자연발생 고혈압 흰쥐에 투여시 혈압하강이 관찰되었고^{25,26)} (참고 : 그러나 보고자들은 신장내의 변화에서 원인을 찾으려고 하였을 뿐 혈관에서 induc-

tion된 heme oxygenase의 영향은 언급하지 않았다), 적출관류 간에서 heme oxygenase 억제제에 의해 관류 압이 증가하며 관류액에 CO를 공급시 관류압의 증가가 차단됨을 보였다.²⁷⁾ 또한 시험관내에서 배양된 혈관 평활근 세포와 적출한 대동맥에서 heme oxygenase에 의해 CO가 생성되며^{15,16)} 생성된 CO에 의해 guanylate cyclase가 활성화됨이 보고되었으며,^{15,16)} 외인성 CO에 의해 적출된 혈관이 이완됨이 관찰되었다.¹⁷⁾ 따라서 이들의 보고들을 종합하여 볼 때 혈관의 수축력 조절에 내인성 CO가 관계할 가능성이 크지만 이에 대하여 연구가 이루어지지 않았다.

본 연구에서 LPS에 의하여 혈관의 HO 활성이 크게 증가하였으며 이러한 증가는 iNOS 억제제인 aminoguanidine에 의하여 부분적으로 차단되었다. 이는 LPS에 의한 산화적 손상이 발생할 때 iNOS에 의해 생성된 과량의 NO가 산화적 손상을 증강시키는 것으로 볼 수 있으며 이러한 NO의 역할이 HO-1의 induction을 촉진시키는 것으로 생각된다.

HO 억제제인 ZnPP는 무마취 흰쥐에 투여시 현저한 혈압상승을 일으켰다. 그러나 대조군에 비하여 혈관내 HO 활성이 약 2.3배 높은 LPS 투여군에서의 혈압상승폭이 대조군과 유의한 차이가 없었다. 이 결과는 혈관세포에 존재하는 HO의 억제에 의하여 발생하는 혈압상승은 미약하며 다른 부위에서의 HO 억제에 의하여 혈압이 현저하게 상승하였다고 볼 수 있다. 즉 혈관세포에서 생성되는 CO의 혈압하강 작용은 큰 의미를 갖지 못하며 신경계 등에서 생성되는 CO에 의해서 매개되는 혈압하강이 더 중요하다고 추측할 수 있다. 따라서 교감신경계 차단제인 prazosin을 전처치하고 ZnPP의 영향을 관찰하였는데 prazosin에 의하여 ZnPP의 혈압상승이 유의하게 차단됨을 보여 주었다. 이는 CO가 교감신경계를 통한 혈압조절에 관계하고 있음을 의미한다. 한편, ZnPP가 HO를 억제하는 작용 이외에 NOS나 guanylate cyclase를 억제하는 작용이 있다는 보고가 있다.¹⁵⁾ guanylate cyclase의 억제에 의한 작용가능성은 본 연구를 통하여는 알 수 없으나, 본 연구에서 사용한 ZnPP의 용량은 NOS를 억제하지 않는 용량이므로 NOS억제를 통한 작용가능성은 희박하다.

*In vitro*에서 혈관수축에 대한 ZnPP의 영향을 관찰하였는데 ZnPP에 의하여 미약하나마 유의한 혈관수축이 일어났다. 이는 영양액내에 HO의 기질인 hemin이

함유되어 있어 HO에 의하여 생성되던 CO에 의해 혈관에 전달되던 이완기전이 억제되어 일어난 것으로 추측할 수 있다. 이러한 혈관수축반응의 증가도 iNOS 억제제의 병용투여에 의하여 유의하게 차단됨을 보여 NO가 HO의 induction에 관여하고 있음을 확인하여 주었다. ZnPP에 의한 혈관수축 작용이 methylene blue의 전처치에 의하여 guanylate cyclase가 억제되어 있는 상황에서는 나타나지 않아 CO가 guanylate cyclase를 활성화시켜 혈관을 이완시킨다^{1,15)}는 사실과 일치하는 결과를 보였다.

NO의 생성억제는 여러 혈관수축물질들의 반응성을 증가시키며²⁸⁾ acetylcholine의 반응성을 감소시킨다²⁹⁾는 보고가 있어 LPS를 투여하여 HO가 induction된 흰쥐의 대동맥에서 CO 생성이 억제되었을 때 phenylephrine이나 acetylcholine에 대한 혈관수축반응의 변화를 관찰하였다. CO생성이 억제되었을 때 phenylephrine에 대한 반응도가 약간 증가하고 acetylcholine에 대한 반응도가 약간 감소하였다. 그러나 이들 반응도의 변화가 유의하지는 않아 NO와는 다르게 CO는 phenylephrine이나 acetylcholine의 혈관에 대한 작용에 유의한 영향을 주지 못하는 것으로 보였다.

이상의 결과는 LPS에 의하여 HO가 induction되며 이는 NO에 의하여 일부 매개되고 CO는 혈관에서 약한 이완물질로서의 역할을 가지고 있음을 의미한다. 또한 혈관이외의 부위에서의 역할을 통하여 혈압을 하강시키는 작용을 가지고 있을 가능성을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Maines, M. D.: Carbon monoxide: an emerging regulator of cGMP in the brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**, 389 (1993).
- 2) Verma, A., Hirsch, D. J., Glatt, C. E., Ronett, G. V. and Snyder, S. H.: Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**, 381 (1993).
- 3) Hawkins, R. D., Zhuo, M. and Arancio, O.: Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurobiol.* **25**, 652 (1994).
- 4) Izquierdo, I. and Medina, J. H.: Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learning Memory* **63**, 19 (1995).
- 5) Marks, G. S.: Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 863 (1994).
- 6) McCoubrey, W. K. Jr., Huang, T. J. and Maines, M. D.: Isolation and characterisation of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Pharmacol.* **247**, 725 (1997).
- 7) Sun, Y. and Maines, M. D.: Heme oxygenase-2 mRNA: Developmental expression in the rat liver and response to cobalt chloride. *Arch. Biochem. Biophys.* **282**, 340 (1990).
- 8) Zager, R. A.: Heme protein-induced tubular cytoresistance: expression at the plasma membrane level. *Kidney Int.* **47**, 1336 (1995).
- 9) Kutty, R. K. and Maines, M. D.: Selective induction of heme oxygenase-1 isozyme in rat testis by human chorionic gonadotropin. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 100 (1989).
- 10) Motterlini, R., Foresti, R., Vandegriff, K., Intaglietta, M. and Winslow, R. M.: Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am. J. Physiol.* **269**, H648 (1995).
- 11) Vogt, B. A., Alam, J., Croatt, A. J., Vercellotti, G. M. and Nath, K. A.: Acquired resistance to acute oxidative stress. Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab. Invest.* **72**, 474 (1995).
- 12) Ewing, J. F. and Maines, M. D.: Distribution of constitutive (HO-2) and heat inducible heme oxygenase (HO-1) isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. *Endocrinology* **136**, 2294 (1995).
- 13) Maines, M. D.: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism and clinical applications. *FASEB J.* **2**, 2557 (1988).
- 14) Willis, D., Tomlinson, A., Frederick, R., Paul-Clark,

- M.S. and Willoughby, D. A. : Modulation of heme oxygenase activity in rat brain and spleen by inhibitors and donor of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1152 (1995).
- 15) Christodoulides, N., Durante, W., Kroll, M. H. and Schafer, A. I. : Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* **91**, 2306 (1995).
- 16) Morita, T., Perrella, M. A., Lee, M. E. and Kourembanas, S. : Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1475 (1995).
- 17) Marks, G. S., Brien, J. F., Nakatsu, K. and McLaughlin, B. E. : Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharm. Sci.* **12**, 185 (1991).
- 18) Bernard, G. R., Lucht, W. D., Niedermeyer, M. E., Snapper, J. R., Ogletree, M. L. and Brigham, K. L. : Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J. Clin. Invest.* **73**, 1772 (1984).
- 19) Ghezzi, P., Saccardo, B. and Bianchi, M. : Role of reactive oxygen intermediates in the hepatotoxicity of endotoxin. *Immunopharmacology* **12**, 241 (1986).
- 20) Okabe, H., Irita, K., Taniguchi, S., Kurosawa, K., Tagawa, K., Yoshitake, J., and Takahashi, S. : Endotoxin causes early changes in glutathione concentrations in rabbit plasma and liver. *J. Surg. Res.* **57**, 416 (1994).
- 21) Yoshikawa, T., Takano, H., Takahashi, S., Ichikawa, H. and Kondo, M. : Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure. *Circ. Shock* **42**, 53 (1994).
- 22) Rodeberg, D. A., Chaet, M. S., Bass, R. C., Arkovitz, M. S. and Garcia, V. F. : Nitric oxide: an overview. *Am. J. Surg.* **170**, 292 (1995).
- 23) Motterlini, R., Hidalgo, A., Sammut, I., Shah, K. A., Mohammed, S., Srai, K. and Green, C. J. : A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 167 (1996).
- 24) Laitinen, J. T. and Juvonen, R. O. : A sensitive microassay reveals marked regional differences in the capacity of rat brain to generate carbon monoxide. *Brain Res.* **694**, 246 (1995).
- 25) Da Silva, J. L., Tiefenthaler, M., Park, E., Escalante, B., Schwartzman, M. L., Levere, R. D. and Abraham, N. G. : Tin-mediated heme oxygenase gene activation and cytochrome P450 arachidonate hydroxylase inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Med. Sci.* **307**, 173 (1994).
- 26) Schwartzman, M. L., Abraham, N. G., Sacerdoti, D., Escalante, B. and McGiff, J. C. : Effect of acute and chronic treatment of tin on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Tohoku J. Exp. Med.* **166**, 85 (1992).
- 27) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., Goda, N., Shinoda, Y. and Ishimura, Y. : Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **205**, 1333 (1994).
- 28) Conard, K. P. and Whittemore, S. L. : N^G-monomethyl-L-arginine and nitroarginine potentiate pressor responsiveness of vasoconstrictors in conscious rats. *Am. J. Physiol.* **262**, R1137 (1992).
- 29) Kung, C. F., Moreau, P., Takase, H. and Luscher, T. F. : L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension* **26**, 744 (1995).