

백서의 패혈증 증후군 모델에서 고용량 비타민-C 투여의 효과에 관한 실험적 연구

서울대학교병원 응급의학과 · 삼성의료원 응급의학과* · 서울대학교 외과학교실**

이중의 · 정연권* · 정성은**

=Abstract=

THE EXPERIMENTAL STUDY FOR THE EFFECT OF HIGH DOSAGE VITAMIN-C THERAPY IN RAT MODEL OF SEPSIS SYNDROME INDUCED BY PANPERITONITIS

Joong Eui Rhee, M.D., Yeon Kwon Jeong, M.D., Sung Eun Jung, M.D.**

*Department of Emergency Medicine, Seoul National University Hospital, Department of Emergency Medicine,
Sam-Sung Medical Center*, and Department of Surgery, Seoul National University Hospital***

1. Background : In sepsis syndrome, peroxidation reaction of polyunsaturated cell-membrane lipids by reactive oxygen free radicals is known as the main mechanism of cell injury. Recent explosive rush of studies on the biologic functions of NO has made it clear that NO is essential to the vessel function and microcirculation and increased production of NO in sepsis has important pathophysiologic actions.

2. Purpose : This study is designed to evaluate the therapeutic effects of vitamin-C, a famous antioxidant, on the liver tissue protection in severe intraperitoneal infection.

3. Methods : Female rats of Sprague-Dawley as experiment animal were divided into a control group(group-A) and two experimental groups of a peritonitis group (group-B) and a peritonitis-and-vitamin-C group(group-C). Peritonitis had been induced by cecal ligation and perforation under ketamine anesthesia. Vitamin-C (600 mg/kg) was injected intramuscularly. As a index of peroxidation reaction, malondialdehyde (MDA) level and catalase activity of the liver tissue were examined. And NOS activity in liver tissue was measured. In blood, the concentration of TNF- α was measured with ELISA method.

4. Results : On microscopic examination, liver tissue of group-B showed lymphocyte and neutrophil infiltration, fatty degeneration of hepatocyte, and destruction of liver lobular structure. In group-C, there were lesser lymphocyte and neutrophil infiltration and lesser structural injury in the liver tissue in comparison with in group-B. MDA levels of liver tissue were remarkably increased in group-B.

Catalase activity of group-B was used up in very early phase of peritonitis. In comparison with group-B, group-C had significantly lower MDA levels and significantly higher catalase activity. Plasma TNF- α levels of group-B were markedly increased compared with group-A. Group-C showed markedly suppressed plasma TNF- α levels, compared to group-B. NOS activity in liver tissue of group-B was significantly increased. Vitamin-C suppressed increment of NOS activity.

5. Conclusion : Cell injury by reactive oxygen free radicals was thought to play a key role in sepsis. High dosage of vitamin-C had therapeutic cell-protective effect against lipid peroxidation, suppressive action on the TNF- α production, and inhibitory effect on NOS activation. The therapeutic effect of vitamin-C in sepsis was supposed to be mediated mainly by their antioxidant function. But the exact interaction between peroxidation reaction and NO or TNF- α could not elucidated clearly. Further well-designed experiment is necessary.

Key Words : Sepsis syndrome, Peroxidation reaction, Vitamin-C, TNF- α , Nitric oxide

I. 서론

그람 음성균을 대표로 하는 심한 세균성 감염과 결핵균, 기생충 감염, 그리고 췌장염, 화상 및 심한 외상 등의 비감염성 상황에서 패혈증 증후군이 발생하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 패혈증 증후군이란 세균의 감염으로 인한 세균의 내독소 및 조직반응 물질에 의해 세포분비물질 및 백혈구의 작용들을 매개로 발현되는 전신적 염증반응(SIRS : systemic inflammatory response syndrome)을 말한다. 그 임상상으로는 속으로 대표되는 혈압 상승제에 반응하지 않는 저혈압(refractory septic shock)과 ARDS(adult respiratory distress syndrome), 급성 신부전 및 간 손상과 같은 중요장기의 기능 부전이 가장 중요한 문제가 된다. 패혈증 증후군의 직접적 사망원인의 대부분을 차지하는 패혈증성 속과 중요장기 부전증의 기전으로 조직내의 미세혈액순환의 부전이 중요한 위치를 차지한다. 근간에 여러 연구에 의하면, 혈관의 긴장도 유지 및 미세혈액순환의 유지에 혈관내피-유래 이완인자(EDRF -endothelial derived relaxation factor), 즉 nitric oxide (이하 NO)가 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다.²¹⁾

패혈증 증후군시 심장, 폐 및 간 등의 중요장기 손상의 병태생리학적 기전에 대해서는 어느 정도 밝혀져 있다. 초기 catecholamine이나 cortisol 등과 같은 신경분비물질, 즉 호르몬을 중요시하였으나, 근간에는 내독소(endotoxin)의 자극에 의한 염

증 매개물질인 cytokines, interleukins 및 prostaglandines 등의 역할을 더 중요시한다. 이 과정에는 세포독성 산화반응이 직접적인 조직세포 손상에 중요하게 관여하는 것으로 밝혀져 있다.

산소기란 과산화물(O₂), 과산화수소(H₂O₂), 수산화기(OH)등을 총칭하는 것으로 호기성 환경에서 사는 생물들에서는 정상적으로 세포내 대사과정에서 미량이 생성될 수 있으나, 다량의 산소기의 발생은 패혈증 외에 허혈-재관류(ischemia-reperfusion)³¹⁾, 고농도의 산소 공급, 화상, 흡연, 파라과트 중독증을 대표로 하는 약물 중독증들, 석면증, 암, 그리고 노화과정의 퇴행성 변화등에서 일어난다^{16,54)}. 발생된 산소기는 단백질, 아미노산, 지질, DNA, 결합조직 등에 작용하여 혈관의 투과성 증가, 세포막의 지질과산화, 국소적 혹은 전신적 염증의 조장, 간질성 기질의 손상, 식세포의 식작용 저해, 세포내 DNA의 변형 등을 일으킨다⁴⁴⁾. 특히 세포막에 대한 산소기의 작용은 세포막의 주구성성분인 불포화 지질을 과산화시켜 세포막 손상과 투과성 증가를 일으켜 세포의 기능 상실을 초래한다⁵⁾. 산소기에 의한 지질과산화 현상의 결과물인 혈중 지질과산화물들의 농도를 측정하면 조직 세포손상의 정도를 알 수 있다.

지표로서 사용되는 측정가능한 지질과산화물로서는 에탄(ethane), 펜탄(pentane), 이중결합 불포화탄화수소(conjugated diene), MDA (malondialdehyde) 등이 있는데, 그 중에서 MDA의 측정이 가장 많이 사용한다.

생체내에는 과산화반응에 대항하는 항산화 물질로서 α -tocopherol, ascorbate, β -카로틴, 요산, 알부민, 빌리루빈, 트랜스페린, 셀룰로플라즈민 등이 있다^{3,44}). 그리고 체내 단백질들의 sulfhydryl group(-SH), 세포 외에 존재하는 superoxide dismutase(SOD)와 selenium-dependent glutathione peroxidase 및 환원형 글루타치온, 그리고 카탈라제(catalase)도 항산화 방어체제로서 빼놓을 수 없는 요소이다⁵⁵). 산소기에 의한 조직손상을 감소시키기 위해서는 항산화성 방어기능을 증진시키거나, 산소기의 생성 자체를 감소시켜야 한다^{1,3}). 임상적으로 특히 외과분야에서는 금식중 비타민 부족증을 방지하고 창상의 치유를 촉진하고자 비타민-C가 거의 관행적으로 사용되고 있다. 항산화 작용을 목적으로 비타민-C를 임상적으로 투여하는 치료는 거의 안하지만, 비타민-C의 항산화 작용에 대한 연구는 이미 확립된 상태이다^{3,9,21}). 활성화된 다형핵 백혈구를 이용한 연구에 의하면 비타민-C가 빌리루빈, 요산, 단백질의 -SH group 및 α -tocopherol 보다 월등히 신속하게 항산화 반응에 참가하며 비타민-C가 소진된 직후부터 모든 지질 과산화물들이 발생하여 축적되기 시작한다고 한다³). 또 화상에서 비타민-C가 지질 과산화를 억제하여 화상후 혈관의 투과성 증가를 감소시켜 화상에 부종 완화에 치료적 기능을 하는데, 중증 화상의 경우 소량투여는 임상적으로 효과가 없고 다량(14 mg/kg·hr)의 비타민-C를 투여해야 치료적 효과를 나타낸다고 하였다³⁷).

패혈증 증후군의 중요한 매개물로 알려진 TNF- α 는 중증 외상이나 감염증에서 거식세포 및 임파구, 호중구, 그리고 혈관 내피세포에서 합성되는 세포 분비물질이다. 이것의 작용에는 자기 방어적인 목적을 하는 부분도 있지만, 스스로의 조직을 손상시키는 기전이 되기도 한다. 또한 TNF- α 는 조직내의 단백질 이화작용과 간에서 acute phase protein의 합성을 촉진하고 탄수화물 및 지방대사에도 관여하여 다량 생성되는 경우에는 근육소실과 체중감소, 빈혈 등을 일으킨다. TNF- α 는 혈관 내피세포의 투과성을 증가시켜 부종을 조장하고, 항응고작용이 있으며, 국소 염증반응도 증가시켜 창상치유를 촉진한다. 패혈증시 TNF- α 는 내독소, INF- α 및 NO의 생성을 촉진한다. 패혈증외에 외상, 속, 허혈-재관류 손상 등에서 증가된다.

패혈증 환자에서 TNF- α 의 혈중 농도의 지속적인 증가는 패혈증의 중증도 및 치사율과 연관이 있다고 알려져 있다⁸).

1985년 Stuehr와 Marletta가 포유동물의 체내에서 NO가 생성된다는 것을 증명한 후로^{2,56}), 특히 최근 5년에 걸쳐 NO의 생리적 역할들과 병태-생리학적 작용들에 대한 폭발적인 연구들이 쏟아져 나오고 있다. 고혈압, 동맥경화증, 당뇨병⁵⁸), 속, 허혈-재관류 손상, 장관 운동장애들, 장기이식 거부반응, 패혈증, 관절염…… 등의 이류 헤아릴 수 없는 질환과 조직에 이 물질이 관여하고 존재하는 것으로 알려져 있으며, 또 새로운 사실들이 계속 밝혀지고 있다^{2,53}). NO는 세포내의 nitric oxide synthase (이하 NOS)라는 효소에 의해 아미노산 L-arginine의 guanidino group에서 생성된다. NO를 합성하는 효소인 NOS에는 3가지의 동종형들이 알려져 있다^{53,56}). 크게 체질성(constitutional) NOS(c-NOS)와 유도성(inducible) NOS(i-NOS = NOS-II)로 나누고 체질성 c-NOS는 다시 신경세포-체질성(neuronal constitutional NOS: nc-NOS = NOS-I)과 혈관내피-체질성(endothelial constitutional NOS: ec-NOS = NOS-III)으로 나눈다. NOS-I, II, III는 각각 염색체 12, 17, 7번에 존재하는 3개의 서로 다른 유전자에 의해서 만들어지는 서로 별개의 단백질이다. 즉, 이 3가지 동종형 효소들의 아미노산 배열은 59% 이하만 공통이다. NOS-I은 일명 nc-NOS라고 하며 중추신경계와 말초 non-adrenergic non-cholinergic 자율신경계에서 신경전달 물질의 기능을 한다.

소화기 장관의 myenteric 신경총의 신경세포와 위 유문, 위-식도 및 Oddi씨 괄약근의 신경에 존재하여 이들의 이완작용을 한다. 음경의 발기작용도 NOS-I에 의한 NO의 매개로 이루어진다. NOS-III는 일명 ec-NOS라고 하며 혈관내피의 기능을 매개하는데, 자체는 혈관내피의 백혈구 및 혈소판의 응집 방어와 혈관 확장의 기능을 가지고 있어서 혈관 긴장도 유지 및 혈행 유지에 핵심적인 기능을 한다. NOS-I과 III는 Ca^{++} 의 농도에 의존적인 효소인데, 주로 생리적 기능을 담당한다. NOS-II는 일명 i-NOS라고 하며, Ca^{++} 농도에 영향을 받지 않으며 병적 상태에 의해 자극되어 생성되어 다량의 NO를 생성하여 미생물, 기생충, 종양 혹은 자기 세포를 파괴하는 작용을 한다.

Table 1. The experimental group and the number of rats in each group. (Total 45 rats including 6 dead rats)

실험군	n= 실험대상 백서의 마리수				
	시간	A: 6시간	B: 12시간	C: 24시간	D: 48시간
Peritonitis (B군)		n=5	n=5	n=5	n=0 (5마리 사망)
Peritonitis + vit-C (C군)		n=5	n=5	n=5	n=4 (1마리 사망)

NOS-II의 생성은 주로 전사(transcription) 단계에서 조절되며, 내독소인 lipopolysaccharide(LPS), TNF- α 나 interferon- γ 같은 cytokines, 그리고 기타 여러 가지 요인들이 자극 인자가 되는데⁵⁹⁾, 전사인자 NF- κ B의 활성화가 필수적인 단계인 것으로 알려져 있다⁴²⁾. NOS-II는 거식세포, 임파구를 포함한 거의 모든 백혈구 계통의 세포들과 Kupffer 세포, 혈관내피 세포, 간 세포, 폐포세포, 췌장 섬 세포, 관절 연골세포 등에서 발현됨이 밝혀져 있으며, 그 외 거의 모든 세포에서 유도 가능한 것으로 추정되며 이에 대한 연구가 진행되고 있다⁷⁾. NO의 작용은 생성되는 조직이나 세포가 무엇이나에 따라, 또 어떤 NOS에 의해서 어느 정도의 양으로 생성되느냐에 따라 달라진다. 허혈-재관류 손상에서는 NO가 재관류시 발생하는 과산화물을 중화하고 혈관내피의 혈소판 및 백혈구 응집을 방어하는 작용을 하며²⁴⁾, 조직손상이 일어난 부위에서는 NOS-II가 유도됨으로써 다량의 NO가 생성되어 혈관의 재생과 복구를 촉진하는 작용을 한다³⁶⁾. 고혈압이나 당뇨병에서의 혈관성 변화들도 내재적인 NO 생성 부전으로 설명된다³⁴⁾.

본 연구에서는 백서를 실험모델로 항산화제인 비타민-C가 범발성 복막염으로 인한 패혈증에 의한 간의 조직손상을 억제하는데 있어서 TNF- α 및 nitric oxide와 어떤 연관 관계를 가지면서 작용을 하는지를 알아보려고 하였다. 이를 위하여 조직손상을 병리조직학적으로 확인하고, 이러한 억제 효과가 비타민-C의 항산화 작용에 의한 것인지를 비교 분석하기 위하여 지질과산화물인 MDA와 카탈라제 활성도를 측정하였다. 그리고 간 조직내의 NOS의 활성도와 혈액내의 TNF- α 의 수치를 측정하여 이들 매개물질들의 항산화작용 및 직접적

인 조직손상에 어떻게 관계하는지를 알아보려고 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물

1) 실험군 : 실험동물로는 체중 260~340gm의 Sprague-Dawley 백서 암컷을 사용하였다. 백서들을 3개 군으로 나누었는데, 대조군 (A군)과 실험군 들인 복막염 유발군 (B군), 그리고 복막염 유발후 비타민-C를 투여한 군 (C군)으로 나누었다. 대조군을 제외한 두 집단(B, C군)에 대해 시간대별 비교군인 맹장 천공후 6시간, 12시간, 24시간, 그리고 48시간의 4소군으로 다시 나누었다. 각 소군별로 각 5마리씩으로 하여 총 45마리를 실험하였다 (Table 1). B군의 48시간대의 백서들은 2회에 걸쳐 재실험을 시도하였는데도 모두 사망하여 검체를 채취하지 못하였다. C군의 48시간대의 백서들도 1마리 사망하였다.

2) 실험동물에 대한 처치 : 실험동물군은 실험 2주전에 사육실에서 일반사료와 물을 먹이면서 주위 환경에 적응하도록 하였다. 사료와 물의 공급은 실험중 계속하였다. 대조군 (A군)은 아무런 수술이나 처치를 하지 않았다. 실험군 B, C군은 다음의 방법으로 인위적으로 복막염을 조장하였다.

Ketamine hydrochloride 50mg/kg를 근주하여 마취한 후, 복벽을 10% Potadine액으로 소독한 다음, 작은 절개창을 복벽에 내고 맹장을 복강밖으로 끄집어내어 음식물의 통과를 방해하지 않도록 대략 직경 1 cm의 크기로 분변물질을 가능하면 최대한 포함하도록 실로 결찰하였다. 이 묶인 맹장 부위를 주사용 바늘로 관통하여 총 20개의 구멍을

Table 2. The effect of vitamin-C on peritonitis-induced lipid peroxidation in liver. (Control group MDA = 227.84 ± 16.68 nmol/gm) 단위 : nmol/gm

실험군	시간	A: 6시간	B: 12시간	C: 24시간	D: 48시간
Peritonitis(B군)		258.04 ± 52.31	290.87 ± 42.67	462.29 ± 123.42	모두 사망
Peritonitis + vit-C(C군)		256.08 ± 38.72	241.09 ± 52.83	146.04 ± 29.29	420.83 ± 62.61
p-value		0.947	0.140	0.001	

Table 3. The effect of vitamin-C on catalase activity in liver. (Control group Catalase activity = 23.63 ± 4.06 unit/mg) 단위 : unit/mg

실험군	시간	A: 6시간	B: 12시간	C: 24시간	D: 48시간
Peritonitis (B군)		6.76 ± 0.43	6.71 ± 0.50	4.95 ± 0.63	모두 사망
Peritonitis + vit-C (C군)		7.84 ± 0.29	7.11 ± 0.48	5.27 ± 0.36	4.61 ± 0.52
p-value		0.002	0.228	0.35	

Table 4. The effect of vitamin-C on TNF- α production in rat with panperitonitis. (Control group TNF- α = 16.50 ± 7.40 pg/ml) 단위 : pg/ml

실험군	시간	A: 6시간	B: 12시간	C: 24시간	D: 48시간
Peritonitis (B군)		140.95 ± 74.10	190.78 ± 108.09	99.86 ± 33.64	모두 사망
Peritonitis + vit-C(C군)		157.13 ± 40.33	67.59 ± 31.33	23.74 ± 10.52	39.4 ± 21.58
p-value		0.679	0.042	0.001	

Table 5. The effect of vitamin-C on hepatocytic i-NOS activity induced by peritonitis in rat. (Control group β -count = 537.8 ± 118.56 cpm) 단위 : cpm

실험군	시간	A: 6시간	B: 12시간	C: 24시간	D: 48시간
Peritonitis (B군)		1474.8 ± 225.55	5077.2 ± 2402.09	2903.4 ± 602.13	모두 사망
Peritonitis + vit-C (C군)		1616.2 ± 790.06	4108.6 ± 349.97	1516.4 ± 712.13	757.00 ± 179.01
p-value		0.710	0.421	0.01	

만든 후, 복강내로 장을 복원시키고 복벽을 봉합하였다. C군은 상기 복막염-유발 술식후 주사용 비타민-C (50mg/ml)를 600mg/kg으로 근육주사하였다. 48시간군은 첫 주사후 24시간에 1회 더 주사하였다. B군과 C군은 각 시간별로 5마리씩 희생시켜 시료를 채취하였다. 시료채취의 방법은 다음의 순서로 하였다. 마취 후, 복부와 흉부를 정중절개하여 우심실에서 혈액을 채취한 다음, 신속히 간을 적출하여 생리식염수로 3차에 걸쳐 세척하여 혈액성분을 최소화하였다. 끝으로 0℃의 PBS (Phosphate-Buffered Saline)액에 20초간 세척한 후 가아제로 물기를 제거한 후, 5등분하여 즉시 액체 질소탱크에 넣어 동결 보관하였다. 일부 조직은 병리조직검사를 위하여 4% formalin에 보관하였다.

2. 실험 방법

1) MDA (malondialdehyde)의 측정 : 지질과산화물 측정하기 위한 MDA의 측정은 TBA (thiobarbuturic acid)를 사용하는 Ohkawa등의 방법을 사용하였다^{13,49,50}. 지질과산화의 정도는 조직 1 gm당 MDA의 nMol(nMol/gm)로 표시하였다.

2) 카탈라제 활성도의 측정 : 카탈라제 활성도 측정은 Beers와 Sizer의 방법을 사용하였다⁴. 카탈라제 활성도의 수치는 units/mg of tissue로 표시하였다.

3) 혈중 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 측정 : 혈청중 TNF- α 농도의 측정은 두가지 항체를 이용하는 sandwich enzyme immunoassay 법¹⁰으로 solid-phase ELISA kit로 측정하였다. 본 실험에서의 TNF- α 측정의 검출한계는 4 pg/ml 이었다.

4) i-NOS activity의 측정 : 조직 채취과정에서 -70℃로 얼려 보관해 둔 간조직의 질량을 측정한다. 1.0 mM EDTA, 5 mM Mercaptoethanol, 10 μ g/ml의 Pepstatin-A, 10 μ g/ml의 Aprotinin, 90 μ g/ml의 Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2.0 μ M의 Tetrahydrobiopterin이 포함되도록 미리 만들어진 50 mM의 Tris 완충액 (pH 7.4)을 조직 질량의 10 배 사용하여, 완충액에 간조직을 넣고 0℃에서 조직을 균질화한다. 그 후, 4℃에서 1시간동안 15,000 g에서 원심분리하여 50 μ l의 상층액을 취하여 -70℃에서 보관한다. 이온교환수지 원통관을 준비해

야 하는데, Dowex AG 50W-X8 resin (Bio-RAD)을 증류수로 5회 적서 활성화하여 준비된 플라스틱 원통관 (Bio-RAD)에 1ml이 되도록 채워 넣는다.

준비된 이온교환수지 원통관을 4ml의 1 N NaOH를 통과시킨다음, 10ml 증류수로 resin을 세척한다. 12.5 mM 초산나트륨(Sodium Acetate, pH 5.5) 4 ml을 통과시켜 리트머스 종이로 resin의 pH가 5.5~6.5사이인지 확인한다. 이렇게 하면, Dowex AG 50W-X8 resin이 수소이온 형태에서 나트륨이온 형태로 바뀌게 된다.

시료를 용리(elution)하기 전에 200 μ M의 β -NADPH, 8 μ M의 Tetrahydrobiopterin, 20 μ M의 FAD, 20 μ M의 FMN, 2 mM의 CaCl₂, 2 mM의 MgCl₂, 60 nM의 Calmodulin, 2 μ M의 Arginine, 그리고 2 μ Ci/ml의 ³H-Arginine (Amersham)이 포함되도록 섞은 NOS 반응용액을 준비한다.

원심분리하여 -70℃에서 보관해 두었던 간조직 상층액 50 μ l에 준비한 반응용액 50 μ l를 혼합하여 수조내에서 22℃에서 15분간 항온반응을 시킨다. 그 후 준비된 이온교환수지 원통관에 혼합액을 100 μ l 투입하고 1ml의 증류수로 3회 용리 (elution)한다. 총 용리된 용량중 500 μ l를 취하여 Scintillation Cocktail (Aquasol-2, Packard) 5 ml과 혼합한 다음, Liquid Scintillation Spectrometer (TRI-CARB, Packard)로 ³H의 cpm(counter per minute) 값을 측정한다. 여기서 cpm은 분당 검출되는 β -입자의 숫자를 나타낸다.

5) 광학현미경 관찰 : 간의 조직절편을 4% paraformaldehyde에 넣어 고정된 뒤 알코올로 탈수하고 파라핀으로 포매(embedding)하였다. 포매된 표본은 활주 마이크로톰(sliding microtome)으로 4~5 μ m의 절편으로 자르고 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin 염색법으로 염색한 후 광학현미경으로 조직학적 변화를 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 \pm 표준오차로 표시하였다.

III. 연구결과

1. MDA의 측정 : 간조직내의 MDA 양은 대조군(A군)에서 227.84 ± 16.68 nmol/gm이었다.

복막염을 유발한 군(B군)에서는 실험경과 6시간 후에는 258.04 ± 52.31 nmol/gm이었고, 12시간 후에는 290.87 ± 42.67 nmol/gm, 24시간 후에는 462.29 ± 123.42 nmol/gm이었고 48시간 후에는 모두 사망하여 측정할 수 없었다. 다시금 5마리를 시술하였으나 역시 48시간을 생존시킬 수 없었다. 맹장천공을 일으키고 12시간후부터 유의하게 간조직내의 MDA가 증가되었는데 24시간대에서는 현저히 증가하였다(Table 2).

복막염을 유발하고 비타민-C를 투여한 군(C군)에서는 6시간후에는 256.03 ± 38.72 nmol/gm, 12시간후에는 241.09 ± 52.83 nmol/gm, 24시간후에는 146.04 ± 29.29 nmol/gm, 그리고 48시간후에는 420.83 ± 62.61 nmol/gm이었다(Table 3). 6시간

과 12시간 사이에서 MDA 양이 감소하였으나 통계적으로 무의미하였고 ($p=0.625$), 12시간과 24시간 사이에서 급격히 MDA양이 유의하게 감소하는 양상을 보였고 ($p=0.008$), 24시간과 48시간 사이에서는 다시 급격하게 증가하는 모양을 나타내었다 ($p=0.001$). 통계적으로 B군에 비해 24시간에서만 유의한 차이를 보였으며 48 시간대는 비교할 수 없었다(각각 $p = 0.947, 0.140, 0.001, ?$) (Fig. 1).

2. 카탈라제 활성도의 측정 : A군의 간조직내 카탈라제 활성도는 23.63 ± 4.06 unit/mg이었다.

B군에서 실험시간 경과 6시간후에는 6.76 ± 0.43 unit/gm, 12 간후에는 6.71 ± 0.50 unit/gm, 24시간후에는 4.95 ± 0.63 unit/gm이었으며 48 간후에는 모두 사망하여 측정할 수 없었다. 복막염 초기부터 카탈라제 활성도가 현저하게 감소하는 소견을 보였고 시간이 흐르면서 더욱 심화되는 양상인데 특히 12시간과 24시간사이에서 유의한 차이를 보

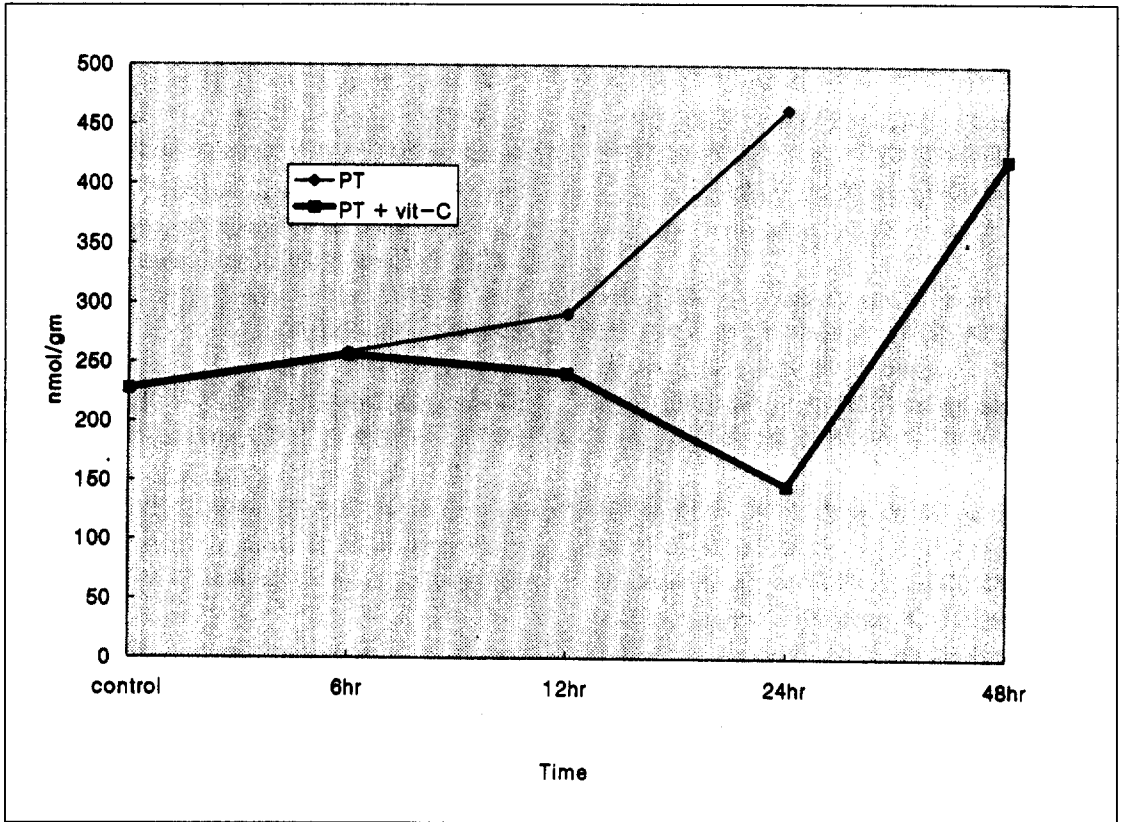


Fig. 1. Effect of vitamin-C on peritonitis-induced lipid peroxidation in liver. ($p = 0.947, 0.140, 0.001$, respectively)

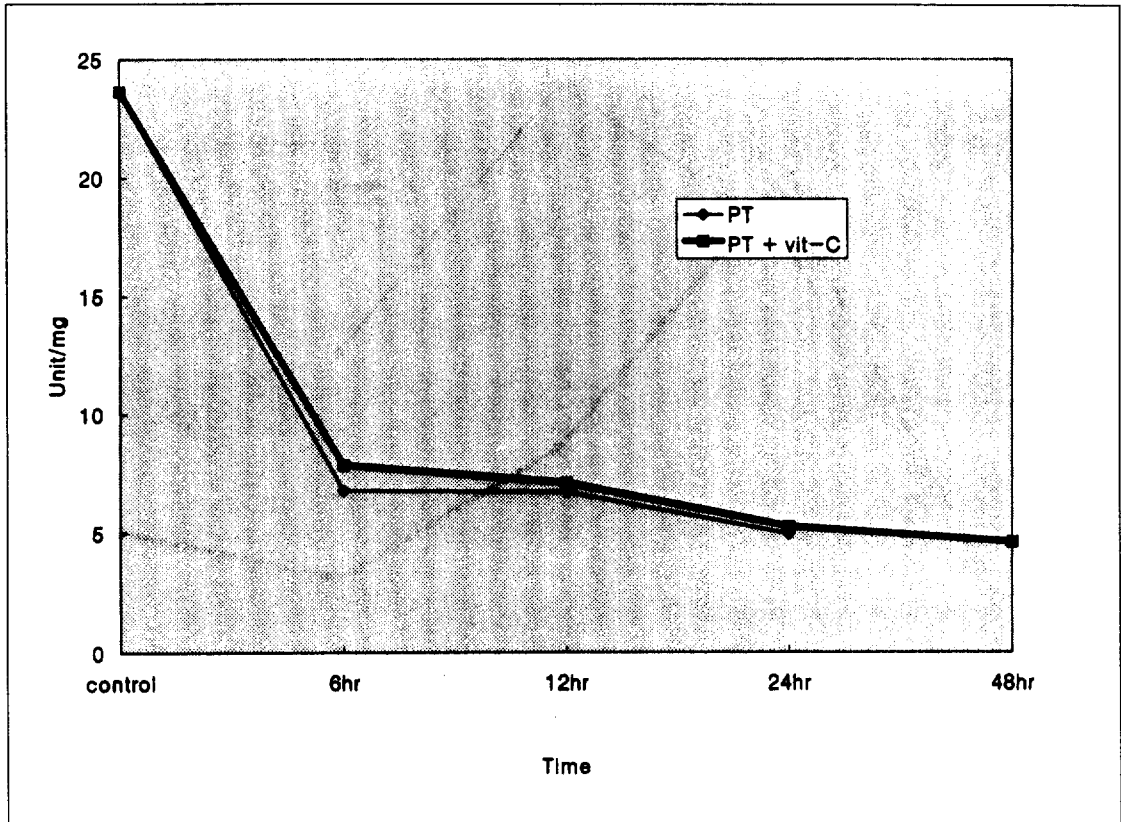


Fig. 2. Effect of vitamin-C on catalase activity in liver of rat with pancreatitis. ($p = 0.002, 0.228, 0.345$, respectively)

였다 ($p=0.001$) (Table 3).

C군에서 실험시간 경과 6시간후에는 7.84 ± 0.29 unit/gm, 12시간후에는 7.11 ± 0.48 unit/gm, 24시간후에는 5.27 ± 0.36 unit/gm, 그리고 48시간후에는 4.61 ± 0.52 unit/gm이었다 (Table 5). 각 시간대별로 유의하게 감소하는 추세를 계속 나타내었다. B군에 비해, C군은 모든 시간대에서 증가된 카탈라제 활성도를 보였으나, 통계학적 유의성은 6시간대에서만 있었다 (각각 $p = 0.002, 0.228, 0.345, ?$) (Fig. 2).

3. TNF- α 의 측정 : A군의 혈청내 TNF- α 의 농도는 16.5 ± 7.40 pg/ml이었다.

B군에서, 실험경과 6시간후에는 140.95 ± 74.10 pg/ml이었고, 12시간후에는 190.78 ± 108.09 pg/ml, 24시간후에는 99.86 ± 33.64 pg/ml, 48시간후에는

모두 사망하여 측정하지 못하였다. A군에 비해 현저히 증가한 수치를 나타냈으며, 12시간대에서 가장 높은 수치를 보이고 24시간대에서는 다시 감소하는 추세를 보였으나 각 시간대별로 유의한 차이는 없었다 (Table 4).

C군에서는 6시간후에 157.13 ± 40.33 pg/ml, 12시간후에는 67.59 ± 31.33 pg/ml, 24시간후에는 23.74 ± 10.52 pg/ml, 그리고 48시간후에는 39.4 ± 21.58 pg/ml이었다 (Table 4). 6시간대에서 가장 높고 이후로 감소하는 추세를 나타내었는데, B군에 비하여 현저히 낮은 수치를 보였으며 6시간대를 제외하고는 통계적으로도 유의하였다 (각각 $p = 0.679, 0.042, 0.001, ?$) (Fig.3).

4. i-NOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 활성도의 측정 : i-NOS의 활성도는 용리되어 나온 용액

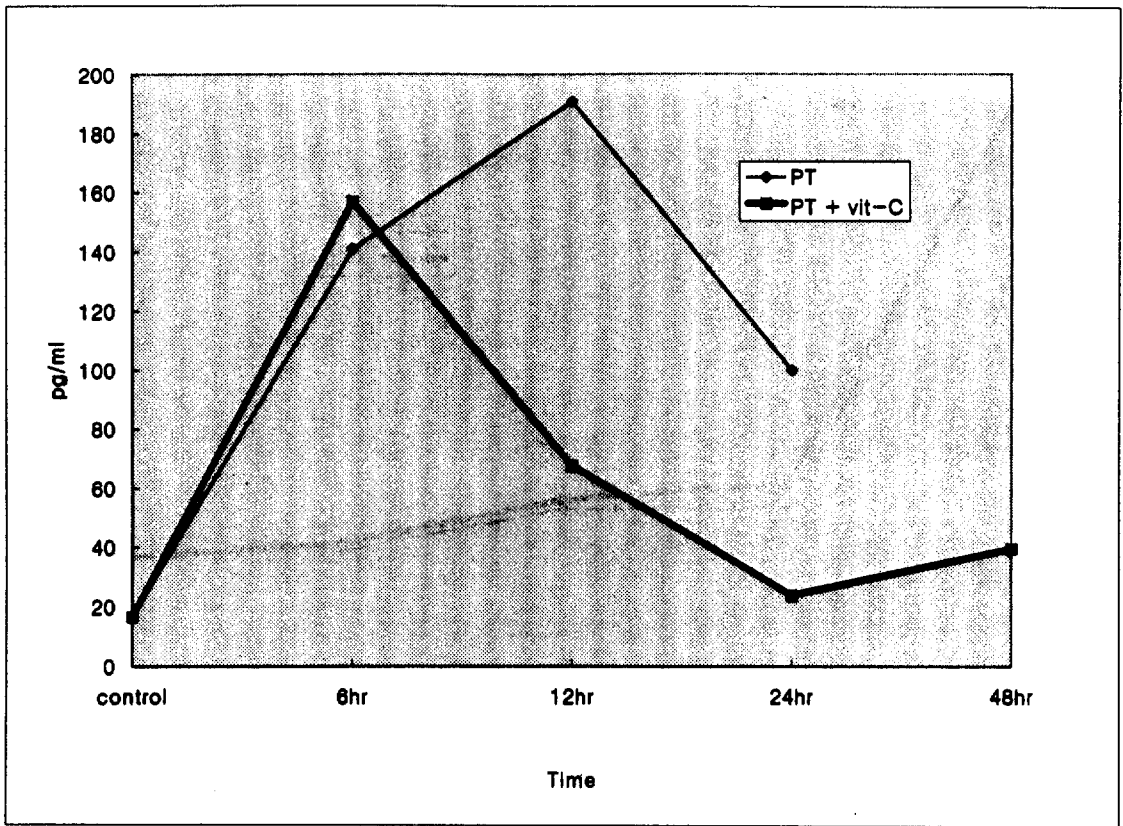


Fig. 3. Effect of vitamin-C on TNF- α production in liver of rat with panperitonitis. ($p = 0.710, 0.421, 0.01$, respectively)

내에 있는 $^3\text{H-L-Citrulline}$ 의 양을 β -counter로 측정하였다. NOS는 L-Arginine을 L-Citrulline으로 변화시키면서 Nitric Oxide를 생성시키는데, L-Arginine은 전기적으로 양이온이므로 반응액중에 포함된 L-Arginine과 $^3\text{H-L-Arginine}$ 중간조직액내의 i-NOS에 의해 각각 L-Citrulline과 $^3\text{H-L-Citrulline}$ 으로 전환되고 남은 부분은 원통관내의 이온교환수지와 결합하여 용리되어 내려오지 않고 L-Citrulline과 $^3\text{H-L-Citrulline}$ 만 내려오므로 효소 i-NOS의 활성도와 $^3\text{H-L-Citrulline}$ 의 양은 비례한다. A군의 간조직내 용리후 빠져나온 $^3\text{H-L-Citrulline}$ 의 양은 537.8 ± 118.56 cpm이었다.

B군에서 실험경과 6시간후에는 1474.8 ± 225.55 cpm으로 A군에 비하여 증가하였고 ($p = 0.0001$), 12시간후에는 5077.2 ± 2402.09 cpm으로 더욱 급격

히 증가하였으며 ($p = 0.028$), 24시간후에는 2903.4 ± 602.13 pg/ml로 다시 감소하였으며 ($p = 0.113$), 그리고 48시간후에는 실험동물이 모두 사망하여 측정하지 못하였다 (Table 5).

C군에서는 6시간후에 1616.2 ± 790.06 cpm으로 A군에 비해 유의하게 증가하였으며 ($p=0.017$), 12시간후에는 4108.6 ± 349.97 cpm으로 B군에 비해서는 낮은 수치를 보였으며 ($p=0.421$), 24시간후에는 1516.4 ± 712.126 cpm으로 12시간대보다 유의하게 감소하였으며 ($p=0.0001$), 그리고 48시간후에는 757.0 ± 179.01 cpm으로 A군과도 유의한 차이가 적을 정도 ($p=0.062$)로 낮아졌다 ($p = 0.777$) (Table 9). 12시간대에서 가장 높았는데 B군에 비해 12시간과 24시간대에서 감소한 양상을 보였으나 통계적 유의성은 24시간대에서만 있었다

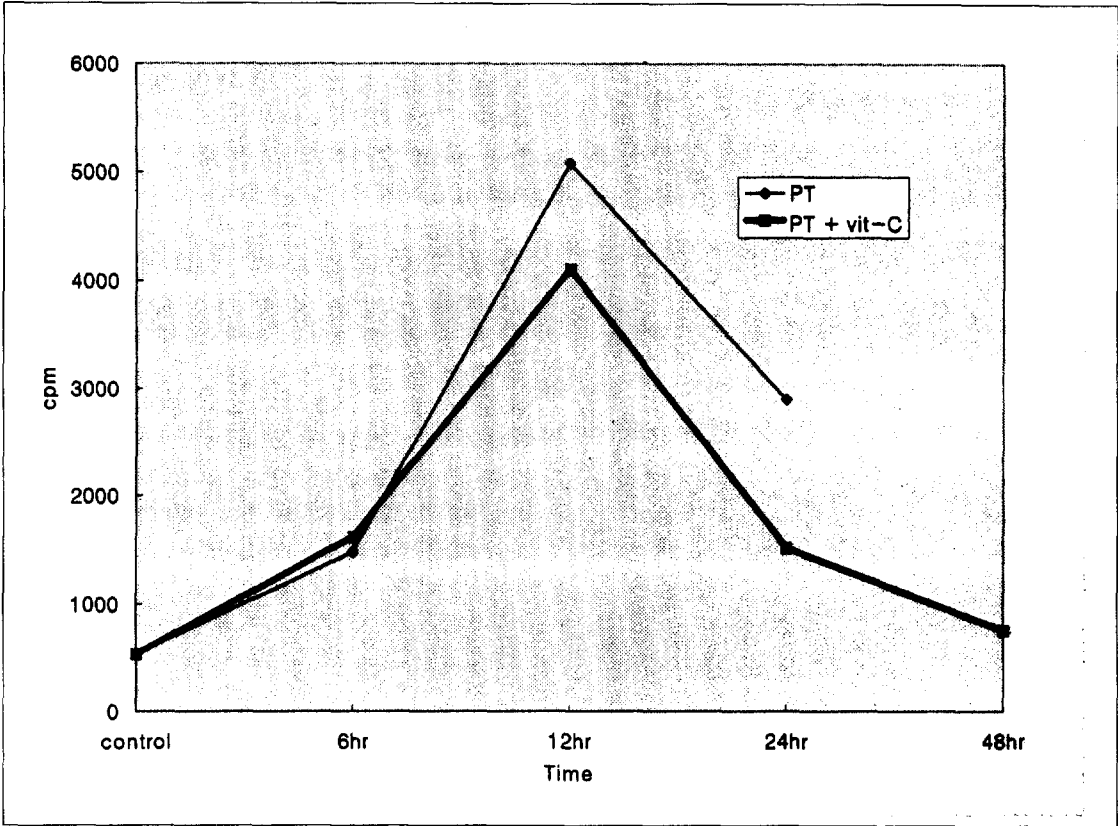


Fig. 4. Effect of vitamin-C on inducible-NOS activity in liver of rat with panperitonitis. ($p = 0.710, 0.421, 0.01$, respectively)

(각각 $p=0.71, 0.421, 0.01, ?$) (Fig. 4).

IV. 고찰

5. 조직 병리학적 변화 : A군의 경우 호중구나 임파구의 침윤이 거의 없고 울혈의 소견도 보이지 않았다. B군에서는 모든 시간대에서 임파구와 호중구의 침윤소견을 보였다. 시간이 경과하면서 점점 심해져서 24시간대에서 침윤소견이 가장 심하게 나타났으며 미세낭포성 지방변성과 sinusoid의 확장, 간소엽 구조의 파괴 등의 소견이 나타났다 (Fig. 5).

C군에서는 경한 호중구와 임파구의 침윤과 동모양혈관의 경미한 확장 및 간질 부종의 소견은 있었으나, 지방변성 소견과 간소엽 구조의 파괴 소견은 나타나지 않았다. B군과 비교하면 24시간대에서 뚜렷한 차이를 보였다 (Fig. 5).

본 실험에서는 실제적인 복강내 감염과 유사하게 맹장을 결찰하고 바늘로 10회 천공시켜 복막염을 유발하여 패혈증 모델을 만들었다^{57,61}. 복강내 농양으로 염증이 국한되지 않고 흘러나온 분변이 복강내에 퍼지도록 복벽을 닫은 후 복부를 수차례 문질러 주었다. 대개의 쥐들이 48시간을 버티지 못하고 사망하였는데, 감염이 경미하여 패혈증이 유발되지 않을 것이 우려되어 천공의 갯수도 다른 연구자들보다 2배이상으로 하고 복부 마사지도 하였다. 사망한 경우에는 재차, 삼차 반복하였으나, 일정한 조건을 위하여 맹장 천공의 숫자를 줄이거나 마사지를 중지하지는 않았다. 종종 감염시 감염 부위가 아닌 전신 조직에 손상이 발생하는 기전은,

A

B

C

Fig. 5. Microscopic findings of liver tissue of each group (A: control liver, B: panperitonitis only, C: panperitonitis + Vit-C)

내독소와 그에 의해 생긴 TNF- α 등의 cytokines 이 상호작용하여 세포들에서 단백분해 효소와 세포독성 산소기를 만들고 이들이 혈관세포 및 조직

세포의 세포막 혹은 세포내 기관에 과산화 손상을 주게 되어 세포사를 일으키게 된다는데 어느정도 합의에 도달한 것 같다. 최근에 NO의 생물학적 중요성이 부각되면서 패혈증에서 NO의 역할과 TNF- α 및 과산화반응의 관계가 어떤 것인지에 대해 많은 연구가 이루어졌다.

본 실험에 의하면, 복막염에 의한 패혈증시, 간조직내의 MDA양은 시간이 흐르면서 계속적으로 증가하였으며 카탈라제 활성도는 초기에 급속하게 소진되는 양상을 보였다. 이는 지질과산화 반응이 증가하였음을 의미하는데, 카탈라제가 소진되면서 MDA의 생성이 더욱 가중되어 증가하는 것으로 설명된다. 즉, 패혈증에 의해 조직내 MDA양이 증가한 것은 패혈증으로 인해 공격인자인 세포독성 산소기의 발생이 증가하고 방어인자인 체내 항산화 기전인 카탈라제가 감소하면서 조직내 지질과산화의 생성이 촉진된 결과인 것이다. 생체내의 과산화반응의 증가는 NO를 비활성화한다³⁴⁾. 지질과산화반응은 세포손상의 한 중요한 기전으로 간주되는데, 따라서 지질과산화반응의 공격인자를 감소시키거나 방어인자를 증가시켜 세포손상을 방지하려는 노력이 이루어져 왔다^{51,55)}.

본 연구에서 비타민-C를 투여한 실험군에서는 간조직내의 MDA양이 범발성 복막염만 유발한 군에 비해 낮았으며 카탈라제 활성도의 소진이 감소되는 형태를 나타냈다. MDA의 생성은 시간이 흐를수록 현저히 억제하였으며, 카탈라제는 특히 초기 소진을 방어해 주는 효과를 보여 주었다. 비타민-C는 자체가 항산화제이어서 투여 즉시 효과를 나타내어야 함을 감안하면, 카탈라제의 소진억제가 초기에 나타난 것은 이해가 되지만, 과산화물의 생성 억제에 약간 시간이 걸린 결과는 설명이 어려웠다. 이는 회석용 정주 비타민-C를 회석하지 않고 근주함으로써 고농도에 의한 심한 근육손상을 초기에 일으켰기(근주후 다리에 심한 부종을 보이며 다리를 잘 움직이지 못함)때문으로 추정되거나 분명하지 않다.

이 실험에서는 혈중 TNF- α 를 측정하였다. TNF- α 는 또 다른 매개물질로 내세운 NO의 생성에도 관련이 깊다. 이 실험의 결과에서는 나군에서는, 정상군에 비하여 혈중 TNF- α 가 10배이상 현격히 증가하는 양상을 보였다. 이는 다른 연구자들의 보고와 부합된다⁴⁰⁾. TNF- α 의 혈중 농도는 초

기부터 상당히 증가하여 12시간대에서 가장 높으며 24 시간대에서는 12시간대의 절반수준으로 떨어진 형태를 보였다. 실제로 맹장 결찰 및 천공을 시술한 경우 1시간내에 내독소혈증이 나타나기 시작한다고 한다. 비타민-C를 투여한 경우에는 복막염만 유발한 군에 비하여 TNF- α 의 수치가 12시간대와 24시간대에서 각각 약 50%와 30% 수준으로 감소하였다. 이 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p = 0.042, 0.001$). 본 실험에서 패혈증에 의한 TNF- α 의 증가를 비타민-C가 억제하는 경향을 확인할 수 있었다. 여기서 항산화제인 비타민-C가 염증 매개물질인 TNF- α 의 생성억제 효능이 탁월하다는 사실에 주목할 필요가 있다. 일반적으로 TNF- α 는 단백분해 효소 및 산소기의 생성을 자극하고, 비타민-C는 이 산소기를 제거하는 항산화 역할을 하는 것으로만 알고 있으나, 적극적인 항산화 요법이 TNF- α 의 생성 자체에도 어떤 기전인지 정확히 설명할 수는 없지만 깊이 영향을 미친다는 사실이다. 패혈증에서 TNF- α 와 IL-6등의 혈중 농도와 사망률간의 비례관계를 증명하는 연구들이 다수 있으며¹⁴⁾, 따라서 이 세포 분비물질들을 감소시키는 조작을 통해 환자 생존률을 개선하고자 하는 시도가 이루어졌다^{46,60)}. 패혈증으로 사망에 이르는 환자의 경우 TNF- α 의 수치가 계속적으로 증가하므로, 비타민-C가 TNF- α 의 생성억제를 한다면 패혈증의 치료에도 도움이 될 가능성이 있다. 비타민-C가 다른 작용없이 항산화작용 자체로만 TNF- α 생성을 억제하는지는 확실히 말하기 어렵다. PGE₂가 TNF- α 의 생성을 억제하는데 중요하며, 화상시 PGE₂의 감소로 TNF- α 의 분비 억제 기능이 감소되어 TNF- α 가 증가한다는 보고가 있다^{10,40)}. 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 않으며⁴⁷⁾, 세포내의 카탈라제의 활성도에 영향을 주지도 않지만 다른 항산화 효과를 가지는 기전을 억제하여 산소기에 의한 손상을 증가시킨다고 하였다²⁶⁾. 본 실험에서 비타민-C가 TNF- α 의 생성은 억제하고 카탈라제 활성도의 소진을 방지하는 효과를 가진 것으로 나타났다. NO가 혈관확장을 일으키는 EDRF와 동일한 물질이고, 패혈증성 속 발생시 i-NOS가 과다하

게 활성화되어 혈관 수축제나 강심제의 투여에 반응을 하지않게 한다는 사실들이 알려지면서^{18,53)}, 패혈증에서 NO의 생성을 억제하여 속을 치료하고자 하는 연구들이 많이 진행되었다. 하지만, 실제로 대부분의 결과들은 패혈증시 NO의 생성의 억제는 오히려 사망률을 증가시킨다는 가설을 입증하는 방향으로 나아가고 있다^{6,15)}. NO의 기능중에 혈관 내피에의 혈소판 및 백혈구의 부착과 응집을 억제하는 기능이 있는데, N-nitro-L-arginine methyl ester(NAME)이나 N-monomethyl-L-arginine(NMA) 같은 NOS 억제제를 사용하면 혈관의 긴장도는 회복되어 혈관 저항이 증가하지만⁴⁵⁾, 좁아진 혈관의 내막에 혈소판 및 백혈구의 부착, 응집이 증가하여 혈관 손상과 폐색이 증가하므로, 따라서 체순환 혈압은 상승하나 심박출량이 감소하게 되어, 조직에로의 혈류량은 더욱 감소하여 조직 손상이 심화되는 것이 문제가 되었다¹⁸⁾. 혈관내피에 대한 이러한 NO의 역할은 허혈-재관류 손상 시에도 확인되어 있다²⁹⁾. 본 연구에서는 복막염에 의해서 정상군의 약 10배에 가까운 NOS 활성도의 증가가 발생하였으며, 비타민-C는 치료적 효과가 기대되는데도 불구하고 대체로 NO의 생성을 억제하는 방향으로 작용하였다. 복막염만 유발한 군과 비교하여, 비타민-C 투여군에서는 6시간대와 12시간대에서는 별 차이를 보이지 않다가 24 시간대에서만 유의한 감소를 보였다. 물론 TNF- α 가 i-NOS의 생성을 유발하는 인자임을 고려하면, 비타민-C가 TNF- α 의 생성을 억제하는 작용을 통해 i-NOS의 활성화를 억제하는 것으로 설명할 수 있다. 만일 이 설명이 적합하다면 다시 다음의 질문들이 생긴다.

첫째, 과연 패혈증에서 NO가 조직 보호적인 작용을 직접적으로 하는가? 세포 배양 등의 방법으로 시행한 in vitro 실험에서는 NO의 세포독성 효과를 주장한 연구들이 다수 있지만 in vivo 실험에서는 NO가 대체로 세포 보호작용을 가진다고 보고하고 있다^{6,25,27)}. 패혈증에서 NO가 간세포에 의한 단백질 합성(급성 단계 단백질 포함)을 증가시켜 사망률을 감소시킨다고 하였다. 이 실험에서 간세포에 의한 단백질 합성 정도를 측정하지 않아서 알 수가 없다. 그렇다면 비타민-C에 의한 NO의 생성 억제를 어떻게 설명할 수 있는가? 간세포에 의한 단백질 합성의 정도와 혈관내피의 기능유지

가 폐혈증시 조직 보호와 중요한 연관을 가진다면, 폐혈증에서의 비타민-C의 치료적 효과가 NO의 생성과는 무관할 가능성이 있다. NO가 폐혈증에서 혈액학적으로 대사적으로 중요한 기능을 가지지만, 비타민-C의 효능의 매개변수가 아니라 단순한 결과변수에 불과하지 않을 가능성을 추정할 수 있다. 일부 밝혀진 바와 같이 폐혈증에서 NO의 생성 자체를 차단하면 역작용이 나타나지만, NO의 생성과정은 그대로 둔채 그 전 단계인 과산화반응이나 cytokines를 조절하여 유해한 NO의 생성을 줄인다면 NO 감소의 역작용이 안 나타나는 것일 수도 있겠다. i-NOS는 주로 전사후 조절에 의해서 합성량이 결정되는 효소이다. 비타민-C가 i-NOS에 미치는 영향을 정확히 판단하기 위해서는, 이 물질들이 전사인자 NF- κ B에 미치는 영향에 대한 연구가 있어야 하리라고 본다. 덧붙여, NO가 항상 세포보호적으로만 작용하는가?하는 질문도 가능하다. 과량의 NO는 세포파괴적 작용을 가진다는 사실이 알려져 있는데, 어느 정도의 i-NOS의 활성화는 세포 보호적 기능을 하지만 그 정도를 초과하면 세포 파괴적 작용을 할 가능성을 생각해 볼 수 있다. 폐혈증에서의 NO 억제 효과에 관한 연구들 중에는 아직까지 c-NOS와 i-NOS를 각각 분리-차단하여 그 효과를 알아본 실험이 거의 없으며, NO의 농도별 효과에 대한 연구도 없다. 향후 전반적 NOS 억제제인 NAME나 NMA 등과 선택적 i-NOS 억제제인 aminoguanidine을 사용하여 폐혈증에서의 NOS 동종형의 역할을 연구해 볼 필요가 있겠다.

둘째, NO와 과산화반응 및 TNF- α , 이 삼자간의 상호관계에 관한 의문이다. 알려진 바에 의하면, 염증반응에서 TNF- α 의 생성이 선행되어 과산화반응과 NO의 생성이 유도되는 것으로 생각된다. 하지만, 과산화반응이 NO의 생성을 억제할 수도 있으며, NO가 과산화반응에 영향을 미칠 수도 있다. SOD를 투여하면 NO에 의한 혈관내피의 기능을 보호한다는 연구가 있다¹⁾. TNF- α 가 NO의 생성을 유도하는 것은 확인이 되었으나 NO가 TNF- α 의 생성에는 다시 어떤 영향을 미치는지는 불확실하다. 본 실험의 결과에 의하면, 역시 TNF- α 가 핵심적인 역할을 할 가능성이 높아 보인다. 하지만, 대표적인 항산화제인 비타민-C가 TNF- α 생성억제 효과를 보이며 동시에 NO 생성

억제 효과도 나타내었다는 점에서, 이들간의 상호관계를 보다 다양한 방향에서 연구해 볼 필요가 있다고 본다.

V 결 론

1. 복강내 감염은 간 조직에 염증 세포의 침윤과 조직 미세구조의 파괴를 가져 오고 혈관내 혈전형성을 유발하였다. 산소기에 의한 세포 손상은 시간이 흐를수록 점점 심해졌으며, TNF- α 는 염증의 초기에 급속하게 증가하였다. NOS의 활성도도 TNF- α 와 유사한 양상으로 증가하였으나 12 시간 이후에도 증가추세가 유지되는 양상을 보였다.

2. 비타민-C는 병리조직학적으로 간의 염증 세포의 침윤이나 조직 미세구조의 파괴 등을 억제하는 효과를 보였다. 비타민-C는 간 조직에서 시술 후 24시간대에서 유의하게 MDA생성을 감소시켰다. 비타민-C는 예상과 다르게 카탈라제 활성도를 유의하게 증가시키지 못하였다. 비타민-C는 12시간대와 24시간대에서 TNF- α 의 생성을 거의 1/2 수준으로 감소시키는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 24시간대에만 있었다. NOS 활성도에 대해서는 24시간대에서 현저히 감소시키는 경향을 나타내었다.

3. 결론적으로, 비타민-C는 중증 복강내 감염으로 인한 간 조직손상을 억제하는 효과를 가지는데, 이는 자체의 항산화 작용에 의한 것으로 생각된다. 이 물질은 TNF- α 의 생성과 i-NOS의 활성화를 억제하는 작용도 가지는데, 항산화 작용과 TNF- α 의 생성 억제 및 NO의 생성 억제중에서 어느 것이 선행 단계이고 어느 것이 결과적인 효과인지는 정확히 알 수가 없다. 추후 연구가 요구된다.

References

1. 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: 1293-1300, 1991*
2. Anggard E. Nitric oxide: mediator, mur-

- derer, and medicine. *Lancet*. **343**(May 14): 1199-1206, 1994
3. Balz F, Roland S, Bruce N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 9748-9752, 1988
 4. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Bio Chem.* **195**: 133, 1952
 5. Bidlack WR, Tappel AL. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids.* **8**: 177-182, 1973
 6. 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, 1992
 7. 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**: 6765-6772, 1994
 8. 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**: 975-978, 1989
 9. David M, Michael N, Victor G, et al. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *JACC.* **24**(7): 1611-1617, 1994
 10. 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**: 489-494, 1989
 11. Demling R, Lalonde C. Early postburn lipid peroxidation: effects of ibuprofen and allopurinol. *Surgery.* **107**: 85-93, 1990
 12. Demling R, Seekamp A, Lalonde C, et al. Catalase prevents prostanoid release and lung lipid peroxidation after endotoxemia in sheep. *J Appl Physiol.* **65**: 1210-1216, 1988
 13. Dennis KJ, Shibamoto T. Gas chromatographic determination of malondialdehyde formed by lipid peroxidation. *Free rad Biol Med.* **7**: 187-192, 1989
 14. Drost AC, Burlison DG, Cioffi WG, et al. Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn. *J Trauma.* **35**: 335-339, 1993
 15. Emery A, Jian S, Hassan N, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* **129**(Feb.): 142-148, 1994
 16. Esterbauer H, Cheeseman K. eds. (1987) *Chem. Phys. Lipids* **44** (2-4)
 17. Feldman PL, Griffith O, Stuehr D. The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News.* **71**: 26-39, 1993
 18. Frank M, Patrick J, David P, et al. Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg.* **129**(Feb.): 149-156, 1994
 19. 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**: 700-709, 1994
 20. Fry DE, Garrison RN, Heitsch RC, et al. Determinants of death in patients with intraabdominal abscess. *Surgery.* **88**: 517-522, 1980
 21. Garry R. B. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. of Biochemistry and Biophysics.* **300**(2): 535-543, 1993
 22. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis.* **140**: 531-554, 1989
 23. 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)**: 22-28, 1996
24. Hiroyuki K, Toshiaki N, Tsuyoshi K, et al. *Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver.* *J Surg. Res.* **59**: 772-779, 1995
 25. 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)**: 1829-1837, 1995
 26. Ishii Y, Partridge CA, Del-Vecchio PJ, et al. *TNF- α mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H₂O₂.* *J Clin Invest.* **89**: 794-802, 1992
 27. J. Frederick, P. Hasselgren, S. Davis, et al. *Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein synthesis during endotoxemia.* *Arch Surg.* **128(Feb.)**: 152-157, 1993
 28. 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**: 1175-1182, 1992
 29. 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**: 273-281, 1995
 30. James A, Crol L, Edythe D. *Interaction of ascorbic acid with the neurotoxic effects of NMDA and sodium nitroprusside.* *Life Sciences.* **58(4)**: 367-371, 1996
 31. Jureta W, Paula B. *Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion.* *Am. J. Physio.* **1515-1520**, 1993
 32. Kazunori K, Takeyoshi S, Hiroki N, et al. *Role of nitric oxide during carrageenan-sensitized endotoxin shock in mice.* *Life Sciences.* **57(25)**: 2309-2316, 1995
 33. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harian JM, et al. *Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.* *J Immunol.* **136**: 4220-4225, 1986
 34. Koichi N, Nobukazu W, Kenjiro M, et al. *Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension ?* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88(Nov.)**: 10045-10048, 1991
 35. Leng H, Caroline F, Michel D. *The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome.* *Inflammation.* **19(5)**: 599-610, 1995
 36. Livingston DH. *Management of the surgical patient with Multiple system organ failure.* *Am J Surg.* **165(suppl)**: 8s-13s, 1993
 37. Matsuda T, Tanaka H, Yuasa H, et al. *The effects of high-dose vitamin-C therapy on postburn lipid peroxidation.* *J Burn Care & Rehabilitation.* **14(6)**: 624-629, 1993
 38. McNarama DB, Bedi B, Aurora H, et al. *L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia.* *Biochem. Biophys. Res.* **193**: 291-296, 1993
 39. Mitsuhiro T, Yukiko K, Hiroshi K, et al. *Marked increase in urinary excretion of nitrate and N-nitrosothioproline in the osteogenic disordered syndrome rats, lacking ascorbic acid biosynthesis, by administration of lipopolysaccharide and thioproline.* *Carcinogenesis.* **16(11)**: 2653-2657, 1995
 40. Molloy RG, Riordain MO, Holzheimer R, et al. *Mechanism of increased tumor necrosis factor production after thermal injury.* *J Immunology.* **151**: 2142-2149, 1993
 41. Nobuo A, Martin S, Allan M. *Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries.* *Am. J. Physiol.* **H1509-H1512**, 1989
 42. 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)**: 4705-4708, 1994

43. Paul K, D. Neil G. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.* **H611-H615**, 1992
44. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* **161**: 488-503, 1991
45. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, et al. N^G -methyl-L-arginine inhibits TNF-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 3629-3632, 1990
46. Rouman RMH, Hendriks T, van der Ven-Jongekrig J, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg.* **218**: 769-776, 1993
47. Royall JA, Gwin PD, Parks DA, et al. Responses of vascular endothelial oxidant metabolism to lipopolysaccharide and TNF- α . *Arch Biochem Biophys.* **294**: 686-694, 1992
48. Shaohua L, Sharon X, Thomas M. Role of nitric oxide in sepsis-induced hyporeactivity in isolated rat lungs. *Shock* **5(2)**: 122-129, 1996
49. Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology.* Orlando: Academic Press. **105**: 283-293, 1984
50. Takeda K, Shimada Y, Okada M, et al. Lipid peroxidation in experimental rats. *Crit Care Med.* **14**: 719-723, 1983
51. Takeda K, Shimada Y, Amano M, et al. Plasma lipid peroxides and α -tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med.* **12**: 957-959, 1984
52. Thomas J, Tomoki Y, G. Tom S, et al. The role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the acute cardiovascular response to endotoxin. *Ann. of Surg.* **223(1)**: 63-69, 1996
53. Timothy R. Nitric oxide: Novel biology with clinical relevance. *Ann. of Surg.* **221(4)**: 339-349, 1995
54. Turren JF, Boveris A. A generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* **191**: 421-427, 1980
55. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest.* **73**: 87-95, 1984
56. Ulrich F, Hartmut K. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.* **352**: 351-364, 1995
57. Villa P, Sartor G, Angelini M, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin-Diagn-Lab-Immunol. Sep.* **2(5)**: 549-53, 1995
58. Volker B, Anne G, Kerstin B, et al. Suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by α -tocopherol. *FEBS.* **364**: 259-263, 1995
59. Walee C, Mark E, Sandra J, et al. Tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sciences.* **57(24)**: 2273-2280, 1995
60. 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**: 114-116, 1990
61. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* **29**: 189-201, 1980