

□ 원 저 □

Tumor Necrosis Factor가 Surfactant Protein A, B, C의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

한양대학교 의과대학 내과학교실

최진원, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수

= Abstract =

The Effect of Tumor Necrosis Factor (TNF) on Gene Expression of Surfactant Protein A, B, and C

Jin Won Choi, M.D., Jang Won Sohn, M.D., Seok Chul Yang, M.D.,
Ho Joo Yoon, M.D., Dong Ho Shin, M.D., Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background : TNF may play an important role(central mediator) in the development of an acute respiratory distress syndrome. Since TNF induced lung injury in the acute respiratory distress syndrome and abnormalities in surfactant function have been described in acute respiratory distress syndrome, the authors investigated the effects of TNF on the regulation of surfactant protein A, B and C mRNA accumulation.

Methods : The effects of TNF on gene expression of surfactant protein A, B, and C were analyzed using filter hybridization, 12 and 24 hours after intravenous injection of TNF in rats.

Results : 1. The accumulation of SP-A mRNA in the TNF treated group (12 and 24 hours after TNF injection) was significantly decreased by 22.9% and 27.4%, respectively, compared to the control group ($P < .025$, $P < .025$). 2. The accumulation of SP-B mRNA in 24 hours after TNF treated group was significantly decreased by 20.5% compared to that of the control group ($P < .01$). 3. The accumulation of SP-C mRNA in 12 hours after TNF treated group was significantly decreased by 31% the compared to that of the control group ($P < .01$).

Address for correspondence :

Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Hanyang University Hospital, Division of Respiratory Medicine, 17 Haengdang-dong, Sungdong-ku, Seoul 133-792, Korea

Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2298-9183 E-mail : parkss@email.hanyang.ac.kr

Conclusions : These findings indicate the marked inhibitory effects of tumor necrosis factor on surfactant proteins expression in vivo. This finding, in turn, supports the idea of inhibitory effects of tumor necrosis factor on surfactant proteins expression as it relates to pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2000, 48 : 513-521)

Key words : Gene expression, Surfactant proteins, Tumor necrosis factor.

서 론

급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)은 1967년 Ashbaugh¹가 처음 보고할 당시 사망률이 58% 이었고 현재도 50-80%의 높은 사망률을 보이고 있다²⁻⁴. ARDS의 발생의 원인은 다양하고 여러가지 기전에 의하여 관련된 폐손상을 유발시킨다. ARDS의 가장 흔한 병리학적 특징은 미세혈관의 투과성 증가로 인한 폐포내 단백성분이 풍부한 부종현상이다⁵⁻⁷. 이 결과 가스교환의 장애, 폐탄성의 소실 및 비식상성 부종의 결과를 초래한다. 호중구, 혈소판 및 보체, prostaglandin, leukotriene, thromboxane, interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF)들 같은 체액매개물들이 ARDS의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있다⁸.

TNF- α 는 주로 대식세포에서 분비되는 대표적인 최염성(proinflammatory) cytokine으로 IL-1과 유사한 cytokine이며, 그람음성균으로 유발된 패혈증에서 발생한 폐손상의 중요한 매개물로 알려져 있다⁹⁻¹². TNF- α 를 폐장내 주입시 내독소에 의하여 유발되는 폐손상과 동일한 병리조건들을 관찰할 수 있으며, 생체 주입시 패혈성 저혈압을 관찰할 수 있으므로 TNF- α 는 폐손상이나 패혈증의 주요 매개물의 하나로 알려져 있다¹³. TNF- α 는 자극된 표적세포들에서 IL-8의 발현을 유도하여 호중구의 화학주성을 증강시키며, 자극초기에 항원에 의해 자극된 순환 호중구의 내피세포 유착능을 증가시키고 동원된 호중구의 경-내피세포간 이동을 촉진시킨다^{14,15}. 또한 호중구에 직접 작용하여 유리산소기 발생이나 호중구의 탈과립현상을 증가시켜 염증반응을 일으킬 수 있으며 자극된 호

중구에서 IL-8, IL-6, IL-1 β 의 발현을 유발하기도 한다. 이와같이 TNF- α 는 내피세포 및 상피세포의 삼출을 직접 증가시킬 수 있으며, 내피세포 및 상피세포의 유착분자 발현을 유도한다¹⁶. TNF- α 에 의하여 자극된 표적세포들에서 IL-1을 합성할 수 있는 능력이 증가하고, 분비된 IL-1과 상승적으로 작용하여 조직의 염증성 치명도를 높일 수 있으며, IL-1과 더불어 단핵구에서 분비되는 interferon도 TNF- α 의 생리효과를 증폭시키는 것으로 알려져 있다^{17,18}. 기도내 내독소 주입으로 유발된 폐손상에서 TNF- α mRNA가 호중구내 다량으로 검출되며, 대식세포에 비해 오랫동안 지속되는 결과를 나타내 지속적인 TNF- α 생성에 호중구의 역할이 중요하다¹⁹.

TNF는 호중구, 대식세포 및 단핵세포같은 염증세포들의 화학주성 및 각종 염증성 매개물들의 분비에 영향을 미치는 최염성 cytokine으로 작용할 뿐 아니라 직접적으로 세포손상을 야기시키는 세포독성 cytokine으로도 작용한다²⁰. 동물실험에서 전신 또는 폐장내 국소적으로 투여하면 급성 폐손상을 유발하고 ARDS 환자의 혈청 및 기관지폐포세척액에서 TNF 농도가 증가되며 ARDS의 발생기전에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{15, 21-23}. 또한 폐부종 및 백혈구 축적현상이 TNF에 대한 항혈청을 투여하였을 시 개선되었다는 보고가 있다²⁴.

ARDS에 있어서 surfactant의 역할은 복합적이지만 표면장력의 이상이 ARDS의 병태생리에 부분적으로 기여하여²⁵ 폐탄성의 감소와 환기와 관류사이의 균형을 악화시킨다. Surfactant 계통의 변화가 ARDS 때 폐손상의 일차적인 발병기전은 아니지만 그렇다고 해서 ARDS의 이차적인 중요성만의 의미를 부여해서

도 안된다. Surfactant 계통은 일차적이든 이차적이든간에 적절한 폐기능을 유지하는데 지극히 중요할 뿐만 아니라, 어떤 형태든 surfactant 결핍이 폐의 병태 생리학적 결과에 의미심장하게 기여하기 때문이다²⁶⁻²⁸.

이에 저자들은 ARDS의 중요한 매개체의 하나인 TNF를 실험동물의 정맥내 투여하였을시 투여후 surfactant 단백질 A, B, C 유전자가 어떻게 발현하는지를 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Sasco 회사로부터 분양받은 300-400 gm의 Sprague-Dawley 쥐 (Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응 시킨후 본 연구의 실험동물로 사용하였다. Pentobarbital(0.2 cc/rat)로 마취하여 TNF 50 microgram을 6마리의 실험동물의 정맥내 투여 후 12시간 및 24시간에 각각 희생시켰다. 정상 대조군 6마리는 동량의 bovine albumin 0.1% 용액 (BSA) 0.1 ml을 TNF 대신으로 정맥내 주사한 후 12시간 및 24시간에 각각 희생하였다. 폐조직을 얻기 위해 pentobarbital로 마취시킨 후 폐를 일괄 채취하였다. Wet to dry weight ratio(WDR)을 측정하기 위하여 한쪽 폐의 2/3 부위를 저울로 무게를 측정하였다. mRNA를 측정하기 위하여 500-750 mg의 폐 조직을 10 ml의 solution D (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에 넣은 후 Tissumizer(Tekma, Cincinnati, Ohio)로 high speed에서 30-60초 동안 균질화후 -70℃의 냉동실에 보관하였다.

2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi²⁹의 방법으로 총 RNA을 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Ep-

pendorf tube에 500 μ l의 solution D에 pH 4.0인 50 μ l 2 M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)로 완충한 후 phenol 500 μ l을 가하였다. Vortex로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49:1인 용액 100 μ l을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube내 이 혼합물을 15분 동안 얼음에 담근 후 10,000 G의 microfuge로 5분 동안 실온에서 원심하였다. Aqueous phase을 micropipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간이상 -20℃에 잠복시킨 후, 10,000G에서 5분동안 원심하였다. 상층액을 가만히 따른후 침전물을 150 μ l의 solution D에 녹인 후 -20℃에 하룻밤동안 동량의 isopropanol로 재 침전 시켰다. 5분동안 10,000G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻는다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 1 mM EDTA(pH 8)로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질(quality)은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agaro-se denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외시켰다.

3. RNA Hybridization Assay

각각의 mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과 β -cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybridization assay로 측정하였다. 쥐의 SP-A, SP-B와 SP-C 각각의 surfactant 단백질의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 복사체(transcript)를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 복사반응으로부터 산출물은 linealized vector microgram(μ g)당 전체 길이가 20-30 μ g의 복사체였다.

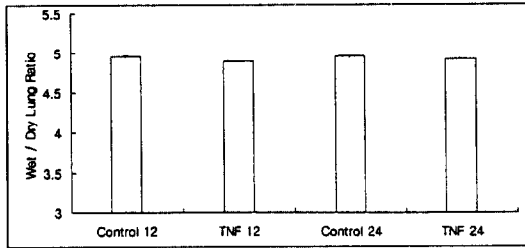


Fig. 1. Comparison of wet to dry lung ratio in Control and TNF Treated Rats
Control 12 : 12 hours after normal saline; Control 24 : 24 hours after normal saline; TNF 12 : 12 hours after TNF injection of 50 mcg; TNF 24 : 24 hours after TNF injection of 50 mcg

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ng의 sense 복사체와 1 μ g의 RNA를 65°C에서 10-15분 denature 후 3 장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 μ m in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.)에 10 \times standard saline citrate (SSC)/ 50% formaldehyde를 20 μ l씩 가하였다. Filter들을 80°C에서 2 시간 구워낸 후 1 M sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)을 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5 cc 양으로 56°C에서 12-14 시간 50 cc Falcon centrifuge tube 내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 4 \times SSC, 1 \times Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1mg/ml salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 cc 가한 후 특이 활성도가 5 $\times 10^6$ cpm/ml인 32 P로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA probe로 56°C에서 흔들면서 17-20시간 동안 hybridization하였다. 모든 filter는 실온에서 2 \times SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 65°C에서 0.1 \times SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다. 특이 mRNA는 회귀방정식 (regression equation)을 사용하여 표준곡선 (standard curve) 으로부터 산출하였다.

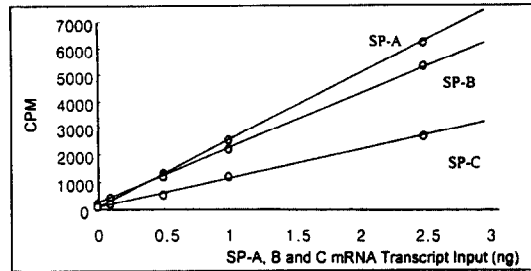


Fig. 2. Standard Curve for SP-A, B and C mRNA Transcript Input.

SP-A curve : Correlation coefficient = 1.0, $Y = 103.9 + 2476.6X$

SP-B curve : Correlation coefficient = 1.0, $Y = 159.1 + 2034.9X$

SP-C curve : Correlation coefficient = 1.0, $Y = 68.6 + 1062.6X$

4. 성적 분석

통계학적 평가는 unpaired student's t-test로 정상 대조군과 각 군간의 mRNA 값 사이에서 평가하였다. 회귀방정식은 Epistat statistical package로부터 산출하였다.

Probability value는 0.05이하를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 폐손상의 정도

Wet to dry weight ratio (WDR)은 TNF로 처치한 군이 12시간 및 24시간 후 WDR은 4.89 및 4.92로, 정상대조군의 4.95 및 4.96에 비하여 감소하였으나, 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다 (Fig. 1).

2. SP-A, B, C에 대한 sense 복사체의 표준곡선

SP-A, B, C의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수 (r)는 다음과 같다. SP-A에 대한 sense 복사체의 표준곡

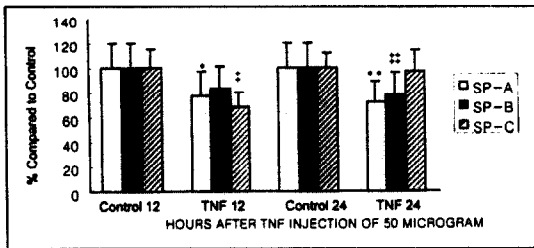


Fig. 3. SP-A, B and C mRNA Accumulation After TNF Injection of 50 Microgram.

* <0.025 compared to control 12

** <0.025 compared to control 24

† <0.01 compared to control 12

†† <0.01 compared to control 24

선은 $Y = 103.9 + 2476.6 X$ ($X = \text{SP-A mRNA 복사체}$, $Y = \text{CPM}$)이고 상관계수는 1.0 이었다. SP-B에 대한 sense 복사체의 표준곡선은 $Y = 159.1 + 2034.9 X$ ($X = \text{SP-B mRNA 복사체}$, $Y = \text{CPM}$)이고, r 은 1.0이었다. SP-C에 대한 sense 복사체의 표준곡선은 $Y = 68.6 + 1062.6 X$ ($X = \text{SP-C mRNA 복사체}$, $Y = \text{CPM}$)이고, r 은 1.0이었다(Fig. 2).

3. SP-A, B, C mRNA의 측정

SP-A mRNA 양은 TNF 투여후 12시간 및 24시간 군에서 대조군 12시간 및 24시간군에 비하여 각각 22.9%, 27.4% 유의하게 감소하였으며($P < .025$, $P < .025$), SP-B mRNA 양은 TNF 투여후 24시간 군에서 대조군 24시간군에 비하여 20.5% 유의하게 감소하였다($P < .01$). SP-C mRNA 양은 TNF 투여후 12시간군에서 대조군 12시간군에 비하여 31% 유의하게 감소되었다($P < .01$)(Fig. 3).

β -actin mRNA의 측정은 정상대조군과 각 군간의 유의있는 변화는 없었고, β -actin mRNA의 측정은 일정하였다.

고 찰

TNF- α 는 주로 대식세포에서 분비되는 대표적인 최염성 cytokine으로 IL-1과 유사한 cytokine이며, 그

람 음성균으로 유발된 패혈증에서 발생한 폐손상의 중요한 매개물로 알려져 있다¹⁰⁻¹². TNF- α 를 폐장내 주입시 내독소에 의하여 유발되는 폐손상과 동일한 병리 소견 및 생체 주입시 패혈성 저혈압을 관찰할 수 있으므로 TNF- α 는 폐손상이나 패혈증의 주요 매개물의 하나로 알려져 있다¹³. TNF 투여 12시간후 폐포액내 호중구가 증가된다고 하며³⁰, TNF는 호중구와 상호작용하여 모세혈관 투과성과 모세혈관압을 증가시켜 폐부종을 유발한다^{31, 32}.

TNF는 동물실험에서 전신 또는 폐장내 국소적으로 투여하면 기능 및 구조적변화를 가져와 ARDS와 유사한 급성 폐손상을 유발한다²¹. ARDS 환자의 혈청 및 기관지폐포세척액에서 TNF의 농도가 증가되며 ARDS의 발생기전에도 중요한 매개물로 알려져 있다^{15, 22, 23, 33}. 이와 같이 TNF는 ARDS의 병인에 중요한 매개물중 하나로 알려져 있다^{15, 21}.

본 연구에서 TNF를 이용하여 실험을 하였던 이유는 패혈증 병발기전에 관여하는 여러가지 cytokine중 TNF가 중심적 역할을 하기때문이다.

본 연구에서 Wet to dry weight ratio(WDR)은 TNF로 처치한 군이 12시간 및 24시간후 4.89 및 4.92로 정상대조군의 4.95 및 4.96에 비하여 감소하였으나, 정상대조군과 TNF로 처치군사이에 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다. 이는 폐의 WDR가 폐손상의 지표로 사용되지만³⁴, WDR의 변화없이도 광학 또는 전자현미경상 폐손상이 발생할 수 있다³⁵.

전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense 복사체를 이용한 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있다(Fig. 2). 이와는 대조적으로 β -actin mRNA의 측정은 각 군에 있어서 항상 일정하였다. 이와같이 cpm 치가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고, hybridization이 특이하다면 정상대조군 및 TNF로 처치한 군에서 filter당 cpm을 비교함으로써 상대량을 평가할 수 있다. 본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 예민하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 량의 RNA

와 결합할 수 있다. Surfactant는 폐방어기전에 영향을 미치는데 첫째 특히 SP-A와 대식세포간 상호작용이 적절한 대식세포기능을 유지하는데 중요하다³⁶. 둘째 염증에 관여되는 많은 매개물들을 적절이 조정하며^{37, 38}, 세째 surfactant 단백질 자체가 중요한 산화방지능이 있으며³⁹, 네째 호기시 폐포밖으로 입자들을 제거한다⁴⁰. 이 중 어느하나 장애가 있게 되면 ARDS의 병인에 중요한 영향을 미친다. ARDS에 있어서 surfactant구성성분 중 표면활성 특성을 갖는 phosphatidylinositol 및 phosphatidylethanolamine같은 지질성분 및 surfactant의 유포기능과 폐의 방어기전에 중요한 역할을 하는 surfactant단백의 변화를 초래한다^{4, 40}.

Surfactant단백들은 type II pneumocyte 기능의 표지자로 이용되었고, 염증성 cytokine들에 의하여 조절되며, surfactant 단백질농도들은 ARDS발생시 감소한다^{41, 42}. Surfactant 단백질 중 SP-A는 당단백이며 환원형의 분자량이 28-36 kD.이며 전체 surfactant 단백질의 30-40%를 점하고⁴³, SP-A의 기능은 tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. SP-A는 type II pneumocyte로부터 인지질의 흡수를 강화하고 type II pneumocyte로부터 surfactant의 분비를 조절하여 지질교체를 관장한다. 이와같이 SP-A는 surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다. 또한 양수내 저농도의 SP-A치는 폐의 미성숙 및 ARDS의 발생을 예측할 수 있다 하였다^{44, 45}. SP-A치가 ARDS환자 및 ARDS으로 발전할 위험성이 큰 환자의 기관지폐포 세척액에서 감소하였다^{46, 48}. 또한 혈청 SP-A치를 이용하여 ARDS로 발전할 위험성이 큰 환자를 조기 확인할 수 있다⁴⁹. 본 실험에서 SP-A mRNA 양은 TNF투여후 12시간 및 24시간에서 대조군에 비하여 각각 22.9%, 27.4% 유의하게 감소하였던 바($P < .025$, $P < .025$), 이와같은 감소는 TNF 투여로 폐의 미세혈관의 투과성이 증가하여 초래되고 혈장단백, 세포막지질 및 혈색소 등의 다양한 구성물질로 부종을 가져와 결과적으로 폐포내 존재하는 surfactant의 생

물 물리화적으로 억제시키는 원인으로 인한 SP-A mRNA 발현의 감소현상을 가져온 것으로 생각된다. SP-B는 배수성단백이며, 비환원형의 분자량은 18 kD. 이고, SP-C는 배수성단백이며, 비환원형의 분자량은 5-8 kD.이다. SP-B와 SP-C는 surfactant의 신속한 film형성에 있어서 SP-A와 상호협동작용을 한다. SP-B mRNA 양은 TNF 투여후 24시간에서 대조군에 비하여 20.5% 유의하게 감소하였으며($P < .01$), SP-C mRNA 양은 TNF 투여후 12시간에서 대조군에 비하여 각각 31% 유의하게 감소되었던바($P < .01$), 이러한 배수성 단백질들은 신속한 surfactant의 film형성에 있어 필수적이며, TNF 투여로 인한 SP-B와 SP-C의 mRNA의 발현억제로 인하여 surfactant의 불활성 현상이 이미 존재하는 폐손상을 악화시키는 방향으로 작용하고 결과적으로 폐포와 기도의 폐쇄를 야기시키는 악순환을 조장하였다고 생각 한다.

이상의 결과는 SP-A, B, C mRNA에 대한 TNF의 억제효과를 입증한 것으로 이와같은 surfactant 단백질들의 발현에 대한 TNF의 억제효과가 ARDS의 병인의 한요인으로 작용한다고 생각된다.

결 론

저자들은 TNF를 백서에 투여후 surfactant단백 A, B, C의 유전자 발현양상을 filter hybridization방법으로 검색하고 surfactant 단백질 A, B, C의 유전자 발현에 대한 TNF의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) SP-A mRNA 양은 TNF 투여후 12시간과 24시간에 대조군에 비하여 각각 22.9%, 27.4%로 유의하게 감소하였다($P < .025$, $P < .025$).

2) SP-B mRNA 양은 TNF 투여후 24시간에서 대조군에 비하여 20.5%로 유의하게 감소하였다($P < .01$).

3) SP-C mRNA 양은 TNF 투여후 12시간에서 대조군에 비하여 31% 유의하게 감소하였다($P < .$

01).

이상의 결과는 SP-A, B, C mRNA에 대한 TNF의 억제효과를 입증한 것으로 이와같은 surfactant 단백질의 발현에 대한 TNF의 억제효과가 급성 호흡곤란 증후군의 발병기전에 중요한 요인으로 작용한다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-23.
- Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 1983;98:593-7.
- Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest* 1999;116:74S-82S.
- Steinberg KP. Surfactant therapy in the adult respiratory distress syndrome. *Respir Care* 1993; 38:365-72.
- Rinaldo JE, Rogers RM. Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 1982;306:900-9.
- Shale DJ. The adult respiratory distress syndrome: 20 years on. *Thorax* 1987;42:641-5.
- Petty TL. Acute respiratory distress syndrome: where did we start and where are we now? *Sem Respir Crit Care Med* 1994;15:243-9.
- Spragg RG, Smith RM. Biology of acute lung injury. In Crystal RG, West JB, Barnes PJ: *The Lung*, Chap.7,7, Raven Press, New York, 1991
- Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Loyd JE, Lucht WD, et al. Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* 1983;3:719-44.
- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318:1481-6.
- Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 1988;81: 1925-37.
- Li XY, Donaldson K, Brown D, MacNee W. The role of tumor necrosis factor in increased air-space epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:185-95.
- Thomas R, Luke U, Waston R. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am J Pathol* 1991;138:1485-95.
- Kevin JT, Lowry SF, Cerami AC. Cachectin/TNF- α in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1988;138: 1377-9.
- Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:268-71.
- Yu ML, Limper AH. Pneumocystis carinii induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF- α mediated mechanism. *Am J Physiol* 1997;273(Lung Cell Mol Physiol 17): L1103-L1111.
- Waage A, Espevik T. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor α /cachectin in mice. *J Exp Med* 1988;167:1987-92.
- Calantra T, Baumgartner J-D, Grau GE, Wu M-M, Lambert P-H, Schellekens J, et al. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon- α and interferon- γ in

- the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 1990;161:982-7.
19. Xing Z, Kirpalani H, Torry D, Jordana M, Gauldie J. Polymorphonuclear leukocytes as a significant source of tumor necrosis factor- α in endotoxin-challenged lung tissue. *Am J Pathol* 1993;143:1009-15.
 20. Kaley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:765-88.
 21. Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW. Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. *Arch Surg* 1989;124:1400-5.
 22. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, et al. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock; Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:94-7.
 23. Parsons PE, Moore FA, Moore EE, Iklé DN, Henson PM, Worthen GS. Studies on the role of tumor necrosis factor in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:694-700.
 24. Colletti LM, Remick DG, Burch DG, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA. Role of TNF in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85:1936-43.
 25. MacIntyre NR. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 1995;16:47-52.
 26. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkins ND. Characteristics of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:531-6.
 27. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence for lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982;70: 673-683.
 28. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald W, et al. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987;317:1565-70.
 29. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
 30. Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, et al. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines; Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 1991;138:1485-96.
 31. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 1981;289:646-50.
 32. Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, Johnson A. Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 1990;67:68-77.
 33. Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema: comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1364-70.
 34. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987;79:1498-1509.
 35. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in the rat.

- topographical and electron-microscope study. *J Pathol* 1972;106:25-35.
36. van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defence mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:91-8.
37. Ansfield MJ, Kaltreider HB, Benson BJ, Shalaby MR. Canine surface active material and pulmonary lymphocyte function: studies with mixed-lymphocyte culture. *Exp Lung Res* 1980;1:3-11.
38. Sitrin RG, Ansfield MJ, Kaltreider HB. The effect of pulmonary surface active material on the generation and expression of murine B- and T-lymphocyte effector functions in vivo. *Exp Lung Res* 1985;9:85-97.
39. Ghio AJ, Young SL, Piantadosi CA. Synthetic surfactant diminishes oxidant generation in vitro. (Abst.) *Am Rev Respir Dis* 1993;147:A362.
40. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:218-33.
41. Wispé JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman R, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 1990;86:1954-60.
42. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler III AA, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88:1976-81.
43. Sueishi K, Benson BJ. Isolation of a major apolipoprotein of canine and murine pulmonary surfactant: biochemical and immunochemical characteristics. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:442-53.
44. Katyal SL, Amenta JS, Singh G, Silverman JA. Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:48-53.
45. Kuroki Y, Takahashi H, Fukada Y, Mikawa M, Inagawa A, Fujimoto S, et al. Two-site "simultaneous" immunoassay with monoclonal antibodies for the determination of surfactant apoproteins in human amniotic fluid. *Pediatr Res* 1985;19:1017-20.
46. Greene KE, Wright JR, Wong WB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, et al. Serial SP-A levels in BAL and serum of patients with ARDS (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A587.
47. Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:176-84.
48. Veldhuizen RA, McCaig LA, Akino T, Lewis JF. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1867-71.
49. Greene KE, Ye S, Mason RJ, Parsons PE. Serum surfactant protein-A levels predict development of ARDS in at-risk patients. *Chest* 1999;116:90S-91S.