

스테로이드제가 백서 폐의 Surfactant B와 C 유전자 발현에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 내과학교실

박익수, 손장원, 윤호주, 신동호, 박성수

=Abstract=

Effect of Dexamethasone on Gene Expression of Surfactant Protein B and Surfactant Protein C

Ik Soo Park, M.D., Jang Won Sohn, 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 : Surfactant protein B(SP-B) and surfactant protein C(SP-C) are important in accelerating surface spreading of surfactant phospholipid. The glucocorticoids accelerate the morphologic differentiation of epithelial cells into type II cells and increase the rate of phosphatidylcholine synthesis. The hydrophobic surfactant protein has been shown to be upregulated by glucocorticoids in vitro, however, its regulation in vivo is not well established.

Methods : The authors investigated the effects of glucocorticoid on the accumulation of mRNA encoding SP-B and SP-C protein content of the lung. Adult rats were given different doses of subcutaneous dexamethasone and sacrificed at 24 hours and 1 week. SP-B and SP-C mRNA were measured by a filter hybridization method.

Results : 1) The accumulation of SP-B mRNA at 24 hours after 0.2 mg/kg dexamethasone treatment was increased by 23.7%. 2) The accumulation of SP-B mRNA at 1 week after 2 mg/kg dexamethasone treatment was significantly increased by 96.6%($P<0.001$). 3) The accumulation of SP-C mRNA at 24 hours after 0.2 mg/kg dexamethasone treatment was significantly increased by 42.7%($P<0.01$). 4) The accumulation of SP-C mRNA at 1 week after 2 mg/kg dexamethasone treatment was significantly

Address for correspondence:

Sung Soo Park, M.D., Ph.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University

17 Haeng dang dong, Sung dong ku, Seoul, 133-792, Korea

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

increased by 60.0% ($P < 0.01$).

Conclusion : The authors concluded that dexamethasone treatment in vivo resulted in increased levels of SP-B mRNA and SP-C mRNA. These results suggested that dexamethasone stimulates the synthesis of hydrophobic proteins associated with surfactant. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:439-448)

Key Words : Gene expression, Surfactant protein B and C, Dexamethasone.

서 론

표면활성물질 단백질(surfactant protein: SP)B와 SP-C는 배수성 단백질이다. SP-B의 비환원형의 분자량은 18kDa 이고, 표면활성물질의 기능을 위하여 필수적이며, SP-C의 전체 제조과정 및 인지질의 포장에 필수적으로 관여한다. 생체내에서 SP-B와 SP-C 유전자들은 SP-A와 표면활성 물질의 지질들이 합성되기 전 발현된다¹. 기관지폐포 세척액 내 SP-B의 양은 급성폐손상, 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 폐렴, 바이러스감염 및 미숙아에서 감소한다^{2,3}. 혈장 내 SP-B가 증가하면 급성호흡부전증환자에서 ARDS로 발전하는 것을 예측할 수 있다⁴. SP-B의 결합은 lamellar body 및 tubular myelin 형성과 표면활성 물질의 인지질과 단백질의 세포 내 통로를 방해한다. SP-C는 배수성 단백질이며, 비환원형의 분자량은 5-8 kDa이고 SP-A와 SP-B에 비하여 지방친화성이 강하다.

SP-B mRNA의 발현은 여러 가지 호르몬에 의하여 영향을 받는다. 즉 시험관 내에서 1-200 nM의 덱사메타손(dexamethasone)과 cAMP는 SP-B mRNA의 발현을 증가시킨 반면에^{5,6}, triiodothyronine은 시험관에서 SP-B mRNA의 축적을 억제한다⁶. 덱사메타손과 dibutyryl-cAMP를 동시에 사용하였을 때 SP-B mRNA 축적 증가효과에 상승작용이 있다⁶. 산모에게 덱사메타손을 투여하면 태아의 폐발생 단계에 따라 SP-B mRNA와 SP-C

mRNA의 발현양상이 증가한다고 한다^{7,8}. 이와 같이 표면활성물질 proteolipid의 발생학적 및 호르몬의 조절은 출생 시 표면활성물질 기능에 중요한 역할을 한다^{9,10}.

시험관에서 덱사메타손은 폐포와 세기관지 상피세포들 내의 SP-B mRNA를 자극한다고 한다⁶. 또한 쥐에서 SP-B mRNA는 덱사메타손처리 후 15시간에 최고치에 도달한 반면 사람에게 있어서는 최고치에 달하는 시간이 2배나 더 길었다. 이러한 종(species)간에 최고치에 도달하는 시간의 차이는 종간의 역동학의 차이에 기인한다고한다. SP-B에 대한 스테로이드제의 효과에서 글루코코르티코이드(glucocorticoid)는 사람의 선암세포계열에서 SP-B mRNA의 합성을 강화시킨다¹¹. 태아 폐 조직배양에서 글루코코르티코이드에 노출시켰을 때 SP-B mRNA와 SP-C mRNA뿐만 아니라 SP-B와 SP-C의 단백질들도 증가한다고 하였다¹⁵. 이와같이 시험관에서의 실험을 통한 결과들에 의하면 투여한 글루코코르티코이드제의 용량과 기간에 따라 SP-B mRNA와 SP-C mRNA는 증가한다. 그러나 동물 실험에서 SP-B mRNA와 SP-C mRNA에 대한 덱사메타손의 효과에 관한 보고는 드물다.

이에 저자들은 실험동물에서의 백에서 서로 다른 용량의 덱사메타손을 투여한 후 SP-B와 SP-C의 유전자의 발현양상을 filter hybridization 방법으로 검색하여 덱사메타손의 서로 다른 투여양과 기간에 따른 실험동물의 SP-B와 SP-C 유전자발현에 대한 덱사메타손의 효과를 관찰하기 위하여 이

연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 300-380 gm의 Sprague-Dawley 쥐 (Sasco, Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응 시킨 후 본 연구에 사용하였다. 테사메타손을 1일 0.2 mg/kg 및 1일 2 mg/kg를 각각 8마리의 실험동물의 피하 내 투여 후 1일 0.2 mg/kg의 투여군에서는 24시간 경과 후에, 1일 2mg/kg의 투여군에서는 1주일간 투여 후에 각각 희생시켰다. 정상 대조군 8마리는 동량의 증류수를 피하 내 주사한 후 24시간 경과 후 및 1주일간 투여 후에 각각 희생하였다. 폐조직을 얻기 위해 실험동물을 희생한 후 폐를 전부 절취하였다. mRNA를 측정하기 위하여 500-750 mg의 폐조직을 10 mL의 solution D (4M guanidium thiocyanate, 25mM 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 균질화한 후 -70℃의 냉동실에 보관하였다.

2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi¹²의 방법으로 총 RNA를 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500 µL의 solution D를 넣고 pH 4.0인 50 µL 2M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 완충한 후 phenol 500 µL을 가하였다. 교반(vortex)으로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49 : 1인 용액 100 µL을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube 내 이 혼합물을 15분동안 얼

음에 담근 후 10,000 G의 microfuge로 5분동안 실온에서 원침하였다. Aqueous phase를 micropipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간이상 -20℃에 잠복시킨 후, 10,000 G에서 5분동안 원침하였다. 상층액을 서서히 따른 후 침전물을 150 µL의 solution D에 녹인 후 -20℃에 하룻밤동안 동량의 isopropanol로 재침전 시켰다. 5분동안 10,000 G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻었다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 1mM EDTA (pH 8)로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry의 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴변질된 시료는 분석대상에서 제외시켰다.

3. RNA hybridization assay

mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과 β -cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybridization 방법으로 측정하였다. 쥐의 SP-B와 SP-C의 각각 SP의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 복사체를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 복사반응으로부터 산출물은 linealized vector microgram (μ g)당 전체 길이가 20-30 μ g의 복사체였다(Fig. 1).

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ng의 sense 복사체와 1 μ g의 RNA를 65℃에서 10-15분 변성시킨 후 3장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 μ m in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 10 \times standard saline citrate (SSC)/ 50% formaldehyde을 20 μ L씩 가하였다. Filter들을 80℃에서 2시간 구워낸 후 1M sodium chloride, 10% dextran

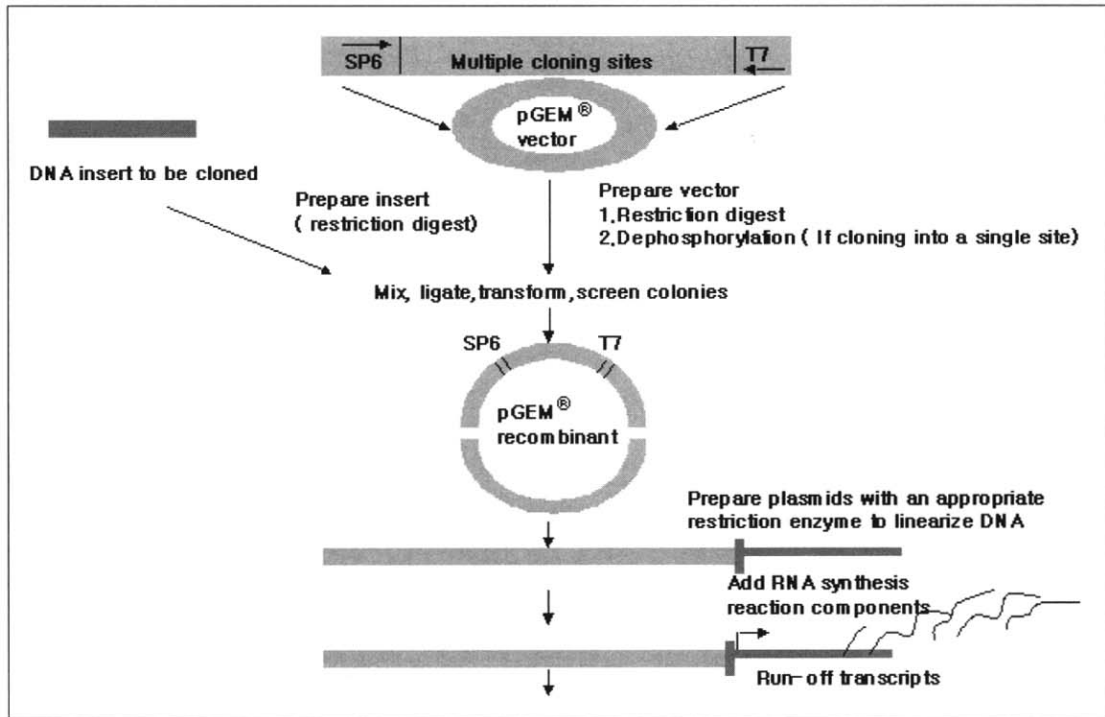


Fig. 1. Schematic of the riboprobe gemini system.

sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5mL 양으로 56°C에서 12-14시간 50mL Falcon centrifuge tube내에서 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 mL 가한 후 특이 활성도가 5×10^6 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 공기 중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다. 특이 mRNA는 회귀방정식을 사용하여 표준곡선으로 부터 산출하였다.

4. 성적 분석

통계학적 평가는 unpaired student's t-test로 정상 대조군과 각 군간의 mRNA값 사이에서 평가하였다. 회귀방정식은 Epistat statistical package를 활용하여 산출하였고, Probability value는 0.05미만을 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. SP-B와 SP-C에 대한 sense 복사체의 표준곡선

SP-B와 SP-C의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수(r)는 다음과 같다. SP-B에 대한 sense 복사체의 표준곡선은 $Y=0.00037X-0.04$ ($Y=$ SP-B mRNA 복사체, $X=$

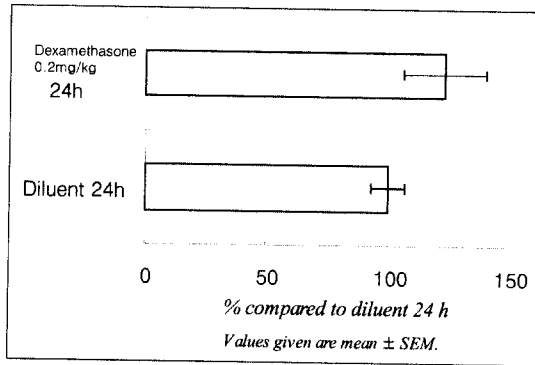


Fig. 2. SP-B mRNA expression from the rat lungs 24 hours after subcutaneous administration of diluent or dexamethasone of 0.2mg/kg

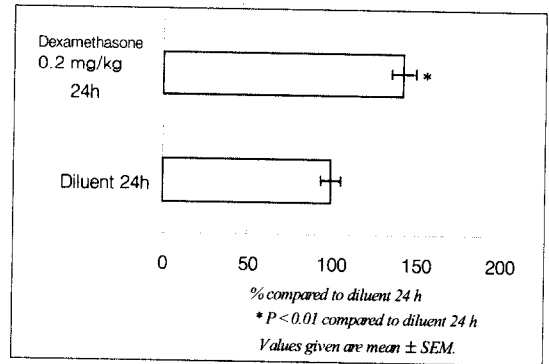


Fig. 4. SP-C mRNA expression from the rat lungs 24 hours after subcutaneous administration of diluent or dexamethasone of 0.2 mg/kg

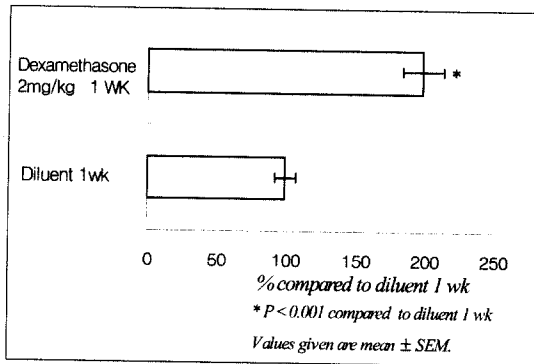


Fig. 3. SP-B mRNA expression from the rat lungs 1 week after subcutaneous administration of diluent or dexamethasone of 2 mg/kg.

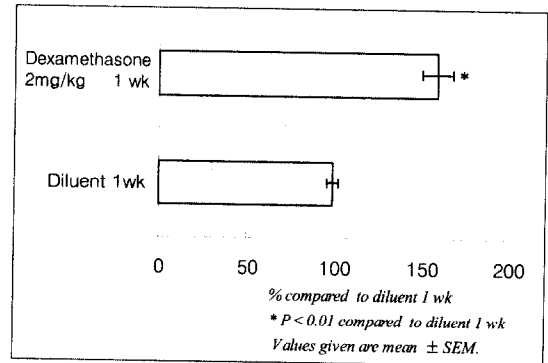


Fig. 5. SP-C mRNA expression from the rat lungs 1 week after subcutaneous administration of diluent or dexamethasone of 2 mg/kg

CPM)이고 r 은 0.99 이었다. SP-C에 대한 sense 복사체의 표준곡선은 $Y=0.0014X-0.19$ (Y =SP-C mRNA 복사체, X =CPM)이고 r 은 0.99 이었다.

2. SP-B mRNA의 측정

덱사메타손을 1일 0.2 mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 23.7%가 증가하였으며(Fig. 2), 덱사메타손을 1일 2 mg/kg씩 1주일간 투여 후 대조군에 비하여 96.6%

가 증가하였다($P < 0.001$) (Fig. 3).

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

3. SP-C mRNA의 측정

덱사메타손을 1일 0.2 mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 42.7%가 증가하였으며($P < 0.01$)(Fig. 4), 덱사메타손을 1

일 2 mg/kg씩 1주일간 투여 후 대조군에 비하여 60.0%가 증가하였다($P < 0.01$) (Fig. 5).

β -actin mRNA의 축적은 정상대조군과 각군간에 유의있는 변화는 없었고, β -actin mRNA의 축적은 일정하였다.

고 찰

SP들은 표면활성물질의 물리적 성상의 결정 및 대사조절에 있어서 중요한 역할을 담당하는데 SP 중 SP-B와 SP-C는 배수성 단백질이지만, 아미노산 염기서열과 이차구조에 있어 현저하게 다르며 폐조직내에서만 발현된다. 그러나 새로 생성된 SP-B와 SP-C의 세포내 진행과정은 서로 유사한 경로를 거친다. SP-B유전자의 불활성화는 표면활성물질 지질분비의 경로를 혼란케 하며 결과적으로 SP-C의 비정상적인 제조과정을 초래하게 된다¹³.

표면활성물질의 신속한 film형성에 있어 필수적인 배수성 단백질인 SP-B와 SP-C, 그리고 SP-A는 상호협동작용을 하여 단층의 표면장력을 감소시킨다¹⁴. SP-B는 SP-A와 협력하여 tubular myelin을 형성하며, 계면필름에 지질 수포를 결합하게 하는 능력을 증강시킨다¹⁵.

SP-B는 표면활성물질 기능을 위한 필수적인 인자이며 동형접합 유전적 SP-B단백의 결함이 있을 때에는 치명적이다^{13,16}. SP-C는 표면에서 인지질의 흡수를 촉진하고¹⁷, film내 인지질의 구성을 변화시켜 작은 압축된 영역을 산출한다¹⁸. 폐 손상을 입은 쥐에 SP-C만 포함한 SP를 투여하였을 때 폐기능이 호전되었다¹⁹. 이와같이 SP-B와 SP-C는 공기액체계면에 지질 수포를 결합하게 하여 인지질의 흡착과 표면활성화를 증강시키는데, 이러한 능력은 SP-B가 SP-C보다 4배 강하다²⁰⁻²⁶.

전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense 복사체를 이용한 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있었다. 이와는 대조적으로 β -actin mRNA의 축적은 각 군에 있어서 항상 일정하였다. 이와같이 cpm치

가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고, hybridization이 특이하다면 정상대조군 및 스테로이드제로 처리한 군에서 filter당 cpm을 비교함으로써 상대량을 평가할 수 있다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 량의 RNA와 결합할 수 있다. 본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 민감하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다²⁷.

Abe와 Tierney²⁸는 히드로코르티손(hydrocortisone)을 1일 8 mg/kg씩 1주일간 쥐에 투여 후 전폐의 saturated phosphatidylcholine이 25%가 증가되었다고 보고하였다. 텍사메타손이 히드로코르티손보다 폐조직에 더 큰 친화력이 있다²⁹. 텍사메타손은 쥐의 폐에서 다른 폐세포들보다 특히 2형 폐세포의 핵에서 증명된다³⁰. Young과 Silbajoris³¹은 텍사메타손을 1일 2 mg/kg씩 1주일간 투여 후 쥐의 폐 표면활성물질의 lipid pool이 증가하는 것은 lamellar body의 용적에는 변화가 없는 것으로 보아 lamellar body에서 인지질의 용적변화 때문이라고 보고하였다. 부신적출술을 시행한 쥐에서 세포의 인지질양의 감소현상이 있었으며, 히드로코르티손을 투여하면 감소현상을 방지할 수 있었다³². 2형 폐포상피세포들과 세기관지 상피세포 중 일부 세포들의 SP-B mRNA는 텍사메타손의 영향을 받는다^{33,34}.

Liley등¹은 사람의 태아 폐내에서 SP-B mRNA와 SP-C mRNA는 임신 13주부터 검출할 수 있으며 임신 24주에 SP-B mRNA는 성인량의 50%까지 도달하며, SP-C mRNA는 15%까지 도달한다 하였다. 이와같이 글루코코르티코이드의 작용기전은 폐의 형태학적 발생을 촉진시키며, 표면활성물질 인지질의 생산을 증가시키고, SP-B와 SP-C의 축적 및 폐탄성을 향상시킨다^{9,10,35,36}.

본 연구의 결과 텍사메타손을 1일 0.2 mg/kg 투여하고 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 23.7%가 증가하였다. 텍사메타손을 1일 2 mg/kg씩 1주일간

투여 후 SP-B mRNA 양은 대조군에 비하여 96.6%가 유의하게 증가하였다. O'Reilly 등¹¹은 시험관에서 10nM 덱사메타손에 노출 시 SP-B mRNA는 12-24시간부터 증가하여 72시간까지 유지된다 하였다. SP-B mRNA는 시험관 내에서 10nM의 덱사메타손에 노출 후 10시간부터 증가하여 48시간에 4배 증가하였다¹. 실험동물에서 SP-B mRNA 양은 덱사메타손을 2mg/kg 투여한지 24시간 경과 후 5.2배 증가하였다³⁴.

본 연구성적에서 덱사메타손을 1일 0.2 mg/kg 투여한지 24시간 경과 후 SP-C mRNA 양은 42.7%가 유의하게 증가하였다. 덱사메타손을 1일 2 mg/kg씩 1주일간 투여 후 SP-C mRNA 양은 대조군에 비하여 60.0%가 유의하게 증가하였다. SP-C mRNA는 시험관 내에서 10nM의 덱사메타손에 노출 후 10시간부터 증가하여 48시간에 30배 증가하였다고 한다¹.

본 연구결과에서 덱사메타손을 투여 후 SP-B mRNA와 SP-C mRNA 양은 시험관 및 실험동물에서 다른 연구결과들과같이 증가하였다^{1,5}.

이상의 결과는 실험동물에서 서로 다른 덱사메타손의 양과 기간에 따른 SP-B mRNA와 SP-C mRNA 양은 소량을 투여하였을 때보다 대량을 투여 하였을 때, 단기간보다는 장기간 사용하였을 때 유의한 증가가 있음을 알 수 있었다.

요 약

연구배경 :

SP는 표면활성물질의 물리적 성상의 결정 및 대사를 결정하는데 있어서 중요한 역할을 담당한다. SP-B와 SP-C는 배수성 단백질이며 공기액체계면에 지질 수포를 결합하게 하여 인지질의 흡착과 표면활성을 증강시킨다. 글루코코르티코이드는 폐의 형태학적 발생을 촉진시키며, 표면활성물질 인지질의 생산을 증가시키고, SP-B와 SP-C의 축적 및 폐탄성을 향상시킨다. 시험관 내 실험을 통하여 관찰한

바에 의하면 글루코코르티코이드를 투여한 후에 SP-B mRNA와 SP-C mRNA가 증가한다. 그러나 동물실험에서 SP-B mRNA와 SP-C mRNA에 대한 스테로이드제의 효과에 관한 보고는 드물다.

방 법 :

저자들은 실험동물에서 SP-B와 SP-C의 유전자 발현을 파악하고자 서로 다른 용량과 기간에 따른 덱사메타손을 백서에 투여한 후 이들 유전자 발현양상을 filter hybridization 방법으로, 덱사메타손의 서로 다른 용량과 기간에 따른 SP-B와 SP-C의 유전자 발현 효과를 평가하였다.

결 과 :

1) 덱사메타손을 1일 0.2 mg/kg 투여하고 24시간 경과 후 SP-B mRNA 양은 대조군에 비하여 23.7%가 증가하였다. 2) 덱사메타손을 1일 2 mg/kg씩 일주일간 투여 후 SP-B mRNA 양은 대조군에 비하여 96.6%가 증가하였다($P < 0.001$). 3) 덱사메타손을 1일 0.2 mg/kg 투여하고 24시간 경과 후 SP-C mRNA 양은 대조군에 비하여 42.7%가 증가하였다($P < 0.01$). 4) 덱사메타손을 1일 2 mg/kg씩 1주일간 투여 후 SP-C mRNA 양은 대조군에 비하여 60.0%가 증가하였다($P < 0.01$).

결 론 :

이상의 결과는 실험동물에서 서로 다른 덱사메타손 용량과 기간에 따른 SP-B mRNA와 SP-C mRNA 양은 덱사메타손 양을 소량을 투여하였을 때보다 대량을 투여 하였을 때, 또는 단기간보다는 장기간 사용하였을 때 유의한 증가가 있음을 지적하고 있다.

참 고 문 헌

1. Liley HG, White RT, Warr RG, Benson BJ, Hawgood S, Ballard PL. Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung. J Clin Invest 1989;83:1191-7.

2. Whisett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD. Human surfactant protein B: structure, function, regulation and genetic disease. *Physiol Rev* 1995;75:749-57.
3. Ingenito EP, Mora R, Cullivan M, Marzan Y, Haley K, Mark L. Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:35-44.
4. Bersten AD, Hunt T, Nicholas TE, Doyle IR. Elevated plasma surfactant protein-B predicts development of acute respiratory distress syndrome in patients with acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:648-52.
5. Whisett JA, Weaver TE, Glasser SW, Korfhagen TR. Regulation of surfactant protein expression. In Wichert P von, Müller B editors. *Basic research on lung surfactant*. 1st ed. vol. 25. *Prog Respir Res* Basel Karger; 1990. p.1-7.
6. Floros J, Gross I, Nicholas KV, Veletza SV, Dynia D, Lu H, et al. Hormonal effects on the surfactant protein B(SP-B) mRNA in cultured fetal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:449-54.
7. Kalinyak JE, Griffin CA, Hamilton RW, Bradshaw JG, Perlman AJ, Hoffman AR. Developmental and hormonal regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA in the rat. *J Clin Invest* 1989; 84:1843-8.
8. Schellhase DE, Shannon JM. Effects of maternal dexamethasone on expression of SP-A, SP-B, and SP-C in the fetal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:304-12.
9. Whisett JA, Pilot T, Clark J, Weaver TE. Induction of surfactant protein in fetal lung. Effects of cAMP and dexamethasone on SAP-35 RNA and synthesis. *J Biol Chem* 1987;262:5256-61.
10. Whisett JA, Weaver TE, Clark JC, Sawtell N, Glasser SW, Korfhagen TR, et al. Glucocorticoid enhances surfactant proteolipid Phe and pVal synthesis and RNA in fetal lung. *J Biol Chem* 1987;262:15618-23.
11. O'Reilly MA, Gazdar AF, Morris RE, Whisett JA. Differential effects of glucocorticoid on expression of surfactant proteins in a human lung adenocarcinoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1988;970:194-204.
12. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
13. Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, et al. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7794-8.
14. Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem J* 1986;236:85-9.
15. Hawgood S, Benson BJ, Schilling J, Damm D, Clements JA, White RT. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:66-70.
16. Noguee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten

- HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New Eng J Med* 1993;328:406-10.
17. Qanbar R, Cheng S, Possmayer F, Schürch S. Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability. *Am J Physiol* 1996; 271:L572-80.
18. Pérez-Gil J, Nag K, Taneva S, Keough KM. Pulmonary surfactant protein SP-C causes packing rearrangements of dipalmitoylphosphatidylcholine in spread monolayers. *Biophys J* 1992;63:197-204.
19. Höfner D, Beume R, Kilian U, Kraznai G, Lachmann B. Dose dependent comparisons of five lung surfactant factor(LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome(ARDS). *Br J Pharmacol* 1995;116:451-8.
20. Wang Z, Gurel O, Baatz JE, Notter RH. Differential activity and lack of synergy of lung surfactant protein SP-B and SP-C in surface-active interactions with phospholipids. *J Lipid Res* 1996;37:1749-60.
21. Revak SD, Merritt TA, Degryse E, Stefani L, Courtney M, Hallman M, et al. The use of human low molecular weight(LMW) apoproteins in the reconstitution of surfactant biological activity. *J Clin Invest* 1988; 81: 826-33.
22. Yu SH, Possmayer F. Comparative studies on the biophysical activities of the low-molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1988;961:337-50.
23. Sarin VK, Gupta S, Leung TK, Taylor VE, Ohning BL, Whisett JA, et al. Biophysical and biological activity of a synthetic 8.7 kDa hydrophobic pulmonary surfactant protein SP-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 2633-7.
24. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, van Golde LM, Demel RA. Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant protein SP-B and SP-C. *Biochemistry* 1991;30:10965-71.
25. Seeger W, Günther A, Thede C. Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C- vs. SP-B-based surfactants. *Am J physiol* 1992;261:L286-L291.
26. Taneva S, Keough KM. Pulmonary surfactant protein SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: III. Proteins SP-B plus SP-C with phospholipids in spread monolayers. *Biophys J* 1994;66: 1158-66.
27. Anderson MLM, Young BD : Chapter 4, Quantitative filter hybridisation, In Hames BD & Higgins SJ editors, *Nucleic acid hybridisation*, 1st ed. Oxford. ILR Press; 1985, p.73-111.
28. Abe M, Tierney DF. Lung lipid metabolism after 7 days of hydrocortisone administration to adult rats. *J Appl Physiol* 1977;42:202-5.
29. Ballard PL. Glucocorticoid receptors in the lung. *Fed Proc* 1977;36:2660-5.
30. Beer DG, Cunha GR, Malkinson AM. Autoradiographic demonstration of the specific binding and nuclear localization of 3H-dexamethasone in adult mouse lung. *Lab Invest* 1983;49:725-34.
31. Young SL, Silbajoris R. Dexamethasone

- increases adult rat lung surfactant lipids. *J Appl Physiol* 1986;60:1665-72.
32. Liebowitz D, Massaro GD, Massaro D. Adrenalectomy and surfactant in adult rats. *J Appl Physiol* 1984;56:564-7.
33. Phelps DS, Floros J. Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:939-42.
34. Phelps DS, Floros J. Dexamethasone in vivo raises surfactant protein B mRNA in alveolar and bronchiolar epithelium. *Am J Physiol* 1991;260:L146-52.
35. Liley HG, White RT, Benson BJ, Ballard PL. Glucocorticoids both stimulate and inhibit production of pulmonary surfactant protein A in fetal human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9096-9100.
36. Odom MJ, Snyder JM, Boggaram V, Mendelson CR. Glucocorticoid regulation of the major surfactant associated protein (SP-A) and its messenger ribonucleic acid and of morphological development of human fetal lung in vitro. *Endocrinology* 1988;123:1712-20.
-