

Quartz 자극에 의한 iNOS 발현의 자가조절

가톨릭대학교 산업의학센터, 성모병원 산업의학과¹⁾

김경아¹⁾ · 남혜윤¹⁾ · 문제혁¹⁾ · 정진숙¹⁾ · 임 영¹⁾ · 정치경

— Abstract —

Autoregulation of Quartz-induced iNOS by iNOS-derived Hydrogen Peroxide in Rat2 Fibroblast

Kyoung Ah Kim¹⁾, Hae Yun Nam¹⁾, Je Hyeok Mun¹⁾, Jin Sook Jeong¹⁾,
Young Lim¹⁾, Chee Kyung Chung

Catholic Industrial Medical Center, Department of Occupational and Environmental Medicine¹⁾, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea

Objectives : This study was performed in order to investigate the molecular mechanism regulating nitric oxide synthase(NOS) induced by α -quartz in Rat2 fibroblast.

Methods : α -quartz-induced nitric oxide(NO) and H₂O₂ formation and α -quartz-induced iNOS protein expression in Rat2 fibroblast were monitored. With iNOS inhibitor(L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine hydrochloride, L-NIL) or antioxidant(catalase), we observed NO and H₂O₂ formation and iNOS protein expression in Rat2 fibroblast stimulated with α -quartz.

Results : α -quartz stimulated iNOS-induced NO and H₂O₂ formation in Rat2 fibroblast. L-NIL inhibited H₂O₂ formation and iNOS protein expression by α -quartz in Rat2 fibroblast. Pretreatment with catalase blocked the autoinhibitory pathway of iNOS by iNOS-induced H₂O₂, therefore H₂O₂ and NO production and iNOS protein expression were increased in Rat2 fibroblast stimulated with α -quartz

Conclusions : α -quartz-induced iNOS stimulated H₂O₂ formation in Rat2 fibroblast. iNOS-induced H₂O₂ by α -quartz plays an important role in the autoinhibition pathway for regulating the iNOS function in Rat2 fibroblast

Key Words : Quartz, NOS, H₂O₂, NO, Autoregulation.

〈접수일 : 2001년 6월 5일, 채택일 : 2001년 10월 19일〉

교신저자 : 임 영(Tel : 02-3779-1401) E-mail : nglim@cmc.cuk.ac.kr

* 이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-1997-005-F00184).

서 론

nitric oxide(NO)는 가스 형태의 라디칼로서 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 생산이 유도되며 혈관내피세포의 이완이나 신경전달 등 여러 가지 중요한 세포기능에 있어 signalling molecule로 작용한다(Kotsonis et al., 1999). 또한 NO는 반응성 산소기와 같이 반응하여 강력한 세포독성을 나타내며 여러 가지 독성물질에 의한 폐질환의 병태생리기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 최근 분진에 의한 폐상피세포의 파괴 및 질환 발생 기전에 있어 NO 및 NOS의 역할에 대한 연구에 관심이 모아지고 있으나(Seekamp et al., 1993, Thomas et al., 1994, Haddad et al., 1994, Setoguchi et al., 1996., Choe et al., 1998) 그 조절기전에 대해서는 아직 확실히 밝혀져 있지 않다.

분진의 자극에 의한 NO의 증가는 주로 inducible NOS(iNOS)에 의한 것으로 생각되고 있는데 NOS는 FAD와 FMN과 같은 falvin과 NADPH 결합 부위를 가지고 있고 NOS의 아미노산 배열이 cytochrome P450와 homology가 높아 NOS의 작용 기질인 L-arginine이 부족할 때 cytochrome P450과 유사한 작용을 하여 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 생산에 관여한다는 보고가 있었다(Pou et al., 1992). 또한 NOS에 의하여 생성된 NO와 reactive oxygen species(ROS) 들간의 상호작용에 의하여 세포독성이 강한 반응물질을 만들어 낸다는 보고들이 뒤따르고 있어 분진에 의한 폐질환 발생과정에서 ROS와 reactive nitrogen species(RNS)의 중요성을 생각해 볼 때 NOS는 매우 중요한 의미를 갖는다. 그러므로 분진에 의해 유도된 NOS를 조절하는 기전을 이해하는 것이 세포수준에서 RNS와 ROS의 기능이나 그 조절기전을 파악하는데 매우 중요하다.

최근의 보고에 의하면 NOS의 활성화는 NOS에 의하여 합성된 NO를 포함한 산물들에 의하여 자가조절된다는 보고들이 있으므로(Kotsonis et al., 1999) 분진의 자극에 의하여 발현 증가된 NOS에 의하여 NO 뿐 아니라 H₂O₂가 생산이 증가될 수 있으며 이 H₂O₂가 iNOS 발현의 억제 및 조절작용을

할 가능성이 있다.

섬유모세포는 섬유화를 유발하는 중심세포로서 분진에 의하여 자극된 대식세포나 상피세포로부터 분비된 여러 가지 매개물질의 작용을 받아 증식되는 것으로 생각되어져 왔다. 그러나 최근에는 반응성 산소기나 cytokine을 분비하는 효과세포로서의 작용이 점차 알려지고 있다(Rolfe et al., 1992, 안병용 등., 2000). 분진에 의하여 유도된 염증반응 및 그 산물에 의하여 파괴된 정상 조직은 섬유모세포 증식과 이 세포로부터 분비되는 기질의 침착으로 이루어진 섬유화로 치환됨으로 분진에 의한 폐질환 발생과정에 섬유모세포의 역할이 매우 중요하나 효과세포로서의 역할이나 그 발현기전에 대하여는 많이 연구되어진 바 없다.

따라서 본연구에서는 시험관내 실험을 통하여 폐독성 및 섬유화성이 강한 분진중의 하나인 quartz로 자극한 Rat2 fibroblast로부터 NO와 H₂O₂분비 증가에 iNOS가 미치는 영향과 H₂O₂가 iNOS 발현을 조절하는 기전이 실제로 존재하는지에 대하여 조사하고자 시도되었다.

대상 및 방법

1. 분진

결정형 규산분진으로 α -quartz(Min-U-sil, Pennsylvania Glass Sand Corp., Pittsburg, PA)을 사용하였다. α -quartz는 실험에 사용하기전 분진에 함유되어 있을 수 있는 내독소를 제거하기 위하여 고압멸균(autoclave)하였으며 배지에 섞어 1시간동안 초음파 처리한 후 사용하였다.

2. 세포배양

섬유모세포는 정상 쥐(Fischer)에서 분리된 섬유모세포 세포주인 Rat2(ATCC CRL-1764, Rockvill, MD)를 이용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 부유시킨 세포를 1×10⁶개/well이 되도록 6-well plate에 분주하고 37 °C, 5 % 이산화탄소 배양기에 배양하였다. 세포가 well에 90 % 정도 차기를 기다렸다가 0.1 % 우테아혈청이 포함된 DMEM으로 갈아주고 48시간 동안 이산화탄소 배양기에서 배양하여 생존율에 변화는 없으나 증식은 억제된 상태로 유지시켰다

(quiescent cell). 48시간 뒤 세포를 DMEM으로 세척한 후 α -quartz가 함유된 배지로 갈아주었다. 대조군은 분진이 포함되지 않은 배지로 갈아주었다. 분진으로 자극하고 지정된 시간동안 배양한 후 배양상층액을 거두어 $10,000 \times g$ 로 원심분리하여 분진을 제거하고 즉시 상층액내 H_2O_2 및 nitrite 농도를 측정하였다. catalase와 iNOS 억제제인 L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine hydrochloride(L-NIL)은 분진 처리 1시간 전에 전 처리하였다.

3. Rat2 세포 배양상층액내 H_2O_2 농도 측정

배양상층액내 H_2O_2 의 농도는 Heinzl 등(1992)이 기술한 방법에 의하여 측정되었다. 상층액에 HCl을 넣고 잘 섞은후 10 mM ferrous ammonium sulphate 20 μ l와 2.5 M potassium thiocyanate 30 μ l을 가하고 10분간 반응시켰다. 495 nm에서 흡광도를 측정하고 H_2O_2 표준곡선에 의하여 농도를 환산하였다.

4. Rat2 세포 배양 상층액내 nitrite 농도 측정

세포로부터 NO 생산의 지표로서 배양상층액내 nitrite 농도를 측정하였다. 상층액 100 μ l에 Griess reagent(sulfanilamide 1 %, naphthylethylenediamine 0.1 %, phosphoric acid 2.5 %) 100 μ l를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 $NaNO_3$ 를 사용하여 구하였다.

5. iNOS Western blotting

10 cm 배양접시에 Rat2 세포를 동일수로 분주한 후 세포가 배양접시에 90 %정도 찼을 때 0.1 % FBS가 포함된 배지로 바꾸어주고 48시간 동안 이산화탄소 배양기에 배양하였다. 48시간후 분진이 함유된 배지로 갈아주고 24시간 다시 배양하였다. 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 배양접시에 단백질 용해용액 300 μ l를 넣고 4 $^{\circ}C$ 에 10분동안 놓아두었다. 용해된 세포용액을 1.5 ml tube에 옮겨 4,000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 여기에 3배 sample 용액 100 μ l를 추가하였다. 단백질을 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리시킨 후 nitrocellulose membrane에

transfer 시켰다. 전기영동한 단백질을 transfer 시킨 nitrocellulose membrane을 일차항체인 anti-iNOS rabbit IgG(Santa Cruz, CA)을 TTBS에 1 : 1000으로 희석시킨 용액에 담그어 실온에서 3시간 반응시키고 3번 세척한 후 anti-rabbit IgG-HRP(Santa Cruz, CA)을 TTBS에 1:2000 으로 희석시킨 용액에 40분간 반응시켰다. TTBS로 10분씩 3번 세척한 후 ECL detection kit(Amersham-Pharmacia Biotech)로 확인하였다.

6. 통계학적 검정

모든 실험은 5배수로 시료를 준비하여 실시하였다. 실험성적은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 대조군과 각 실험군간의 차는 Wilcoxon 순위 검정법을 이용하여 검정하였고 실험군내 용량이나 약제처리에 따른 변화는 ANOVA검정 및 multiple comparison 방법을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. NO의 생성

α -quartz로 자극한 Rat2 fibroblast의 NO 생성능을 α -quartz로 처리하고 24시간 배양한 후 배양상층액내의 nitrite 농도를 측정함으로써 알아보았다. 자극한 α -quartz의 농도가 증가할수록 배양상층액내의 nitrite의 농도가 증가하였으며 500과 1000 $\mu g/cm^2$ 자극군에서 배지만을 첨가한 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다(Fig. 1).

2. H_2O_2 생성

자극한 α -quartz의 농도가 증가할수록 Rat2 세포의 배양상층액내의 H_2O_2 의 농도가 증가하였으며 α -quartz의 농도가 100 $\mu g/cm^2$ 일 때 H_2O_2 의 농도가 최대치를 보였다(Fig. 2).

3. α -quartz로 자극한 Rat2 세포로부터 NO와 H_2O_2 분비에 iNOS의 역할

본 연구 모델에서 L-NIL이 iNOS 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 western blotting으로 확인한바 분진 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 α -quartz 처리시 iNOS 발현이 증가하였으며 iNOS 특이 억제제인 L-NIL의 농도가 증가할수록 세포내

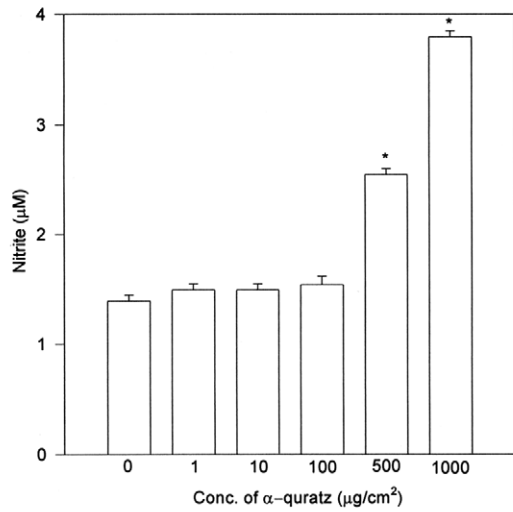


Fig. 1. Nitrite concentration in Rat2 cell supernatants stimulated with α -quartz *P<0.05 compared with control

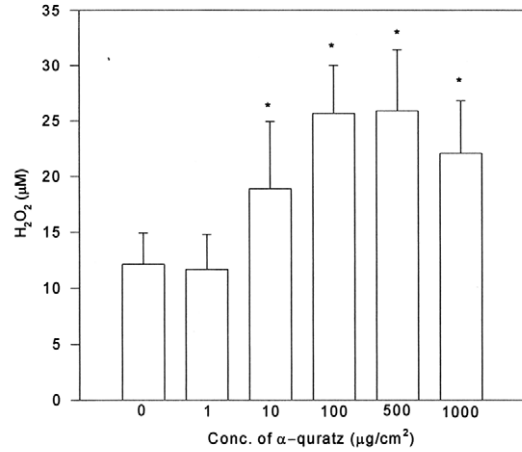
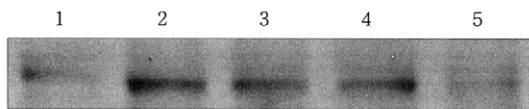
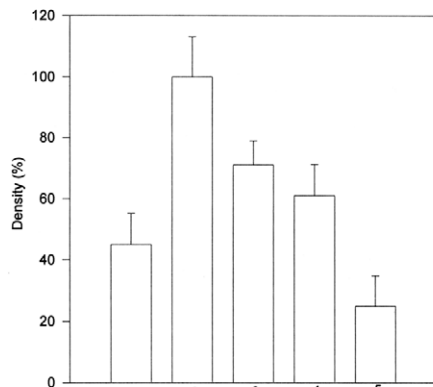


Fig. 2. H₂O₂ concentration in Rat2 cell supernatants stimulated with α -quartz *P<0.05 compared with control



A



B

Fig. 3. Effect of L-NIL on α -quartz-induced iNOS expression in Rat2 cells 1: control, 2: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 3: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ +10 μM L-NIL, 4: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ +50 μM L-NIL, 5: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ +100 μM L-NIL

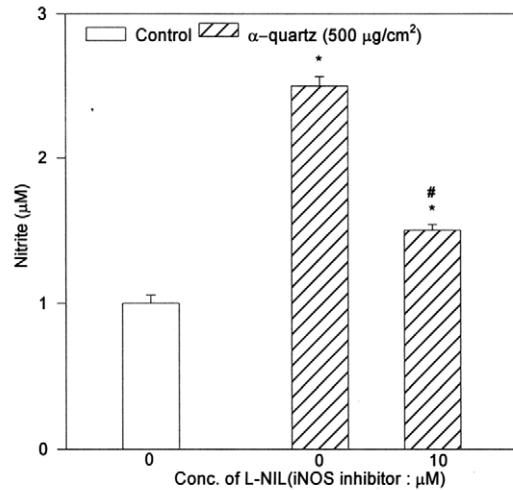


Fig. 4. Effect of L-NIL on α -quartz-induced production of NO in Rat2 cells. *P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with silica treated group.

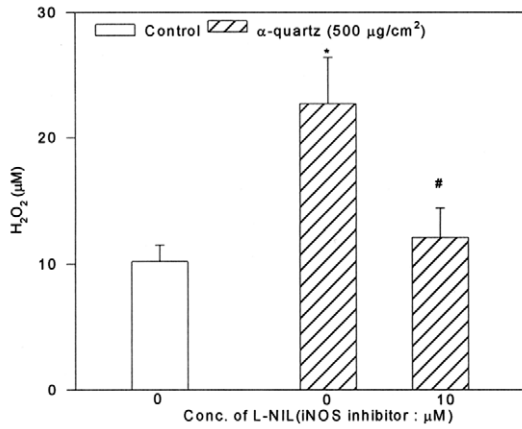


Fig. 5. Effect of L-NIL on α-quartz-induced production of H₂O₂ in Rat2 cells. *P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with silica treated group

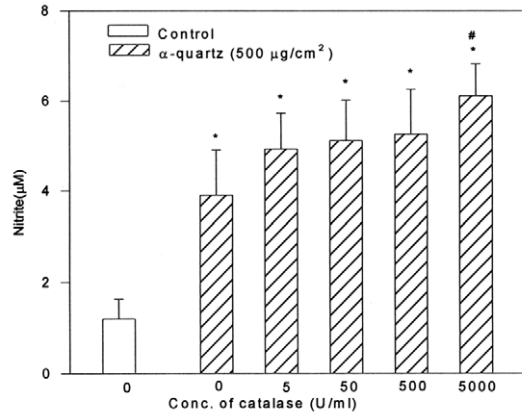


Fig. 6. Effect of catalase on iNOS-induced NO production from Rat2 cells stimulated with α-quartz. *P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with α-quartz treated group

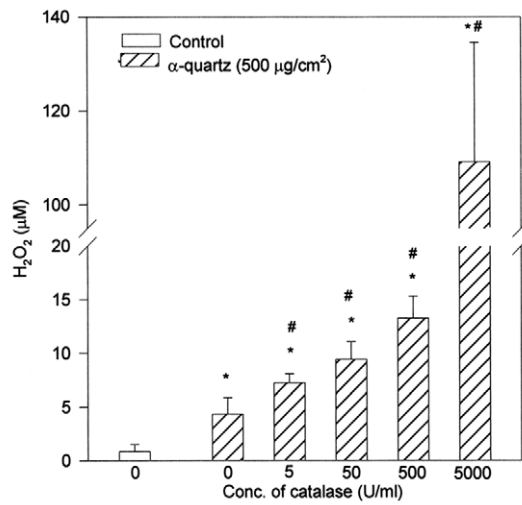


Fig. 7. Effect of catalase on iNOS-induced H₂O₂ production from Rat2 cells stimulated with α-quartz. *P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with α-quartz treated group

iNOS 단백질양이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3A). Fig. 3B는 western blotting을 3회 실시하여 band의 density를 측정된 결과이다.

iNOS가 α-quartz 자극에 의해 Rat2 fibroblast로부터 H₂O₂를 생성에 어떠한 역할을 하는지 알아

보기 위하여 Rat2 세포를 iNOS 특이 억제제인 L-NIL를 전처리 한 후 α-quartz(500 μg/cm²)로 처리하고 배양하여 배양 상층액내 nitrite(Fig. 4.)와 H₂O₂(Fig. 5.)농도를 측정하였다.

L-NIL 전처리시 nitrite 농도와 H₂O₂의 농도가 α-quartz만을 처리한 군에 비하여 유의하게 감소하여 iNOS가 α-quartz 자극에 의한 Rat2 세포로부터의 NO의 분비 뿐 아니라 H₂O₂ 분비에도 관여하는 것으로 생각되었다.

4. Rat2 세포에서 α-quartz에 의한 iNOS 발현에 iNOS에 의하여 생성된 H₂O₂의 자가억제 효과

지금까지의 결과에서 α-quartz에 의하여 Rat2 cell의 iNOS 발현이 증가하며 이 증가된 iNOS에 의하여 NO 뿐 아니라 H₂O₂ 생성이 증가됨을 알 수 있었다. 분진에 의하여 증가된 iNOS-induced H₂O₂가 iNOS를 자가 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여 항산화제인 catalase를 전처리 한 후 α-quartz로 자극하였는바 그 결과는 Fig 6, 7, 8에서 보는 바와 같다.

Catalase를 전처리 하였을 때 α-quartz에 의한 H₂O₂ 생산이 catalase의 농도가 증가할수록 증가하였다(Fig. 7). NO도 마찬가지로 양상을 보였으나 H₂O₂만큼 현저한 변화는 아니었다(Fig. 6). Western blotting 검사상에도 α-quartz에 의하여

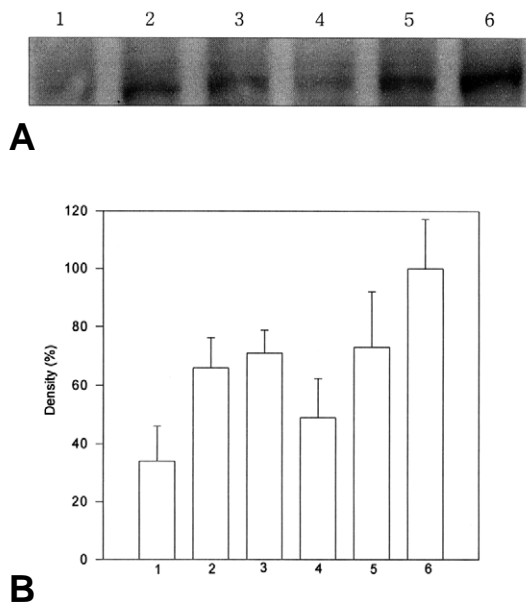


Fig. 8. Effect of catalase on α -quartz induced iNOS expression in Rat2 cells. 1: control, 2: α -quartz 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 3: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4: catalase 500 U/ml, 5: α -quartz 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ +catalase 500 U/ml, 6: α -quartz 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ +catalase 500 U/ml

증가된 iNOS의 발현이 catalase 전처리시 증가하였으며 catalase의 농도가 증가할수록 density가 증가하였다(Fig. 8).

이상의 결과에서 분진에 반응하여 증가된 iNOS에 의하여 생산된 H_2O_2 가 iNOS를 자가조절하는 작용을 가짐을 알 수 있었다.

고 찰

분진이 폐장내로 흡입되면 폐장내의 세포들과 반응하여 염증반응을 유발하며 이와 같은 염증반응이 오랜기간 지속되면서 정상 폐구조가 파괴되고 섬유화로 대치 된다는 것이 지금까지 밝혀진 분진에 의한 폐질환 발생기전이다. RNS 및 NOS가 급성 혹은 만성 염증반응에 관여한다는 것이 알려지면서 분진에 의한 폐질환 발생과정에 RNS 및 NOS의 역할에 대한 연구가 이루어 졌는데 Thomas 등(1994)은 쥐의 폐포대식세포를 석면으로 자극하는 경우 NO의 분비가 증가된다고 보고하였으며 Blackford 등

(1994)은 결정형 규산분진을 기관내 주입하였을 때 폐 염증세포의 NOS mRNA 발현이 증가됨을 보고한 바 있다. 이와 같은 결과들은 분진에 폭로되었을 때 발현 증가되는 NOS가 분진에 의한 폐질환 발생에 중요한 역할을 하는 것을 시사하나 지금까지의 연구들은 모두 일과성으로 존재하는 폐의 염증세포를 중심으로 이루어져 왔다. 본 연구에서는 폐장의 구성 세포이면서 분진에 의한 폐 섬유화 변화과정에 중요한 역할을 하는 섬유모세포에 있어 결정형 규산분진 자극에 의한 NOS의 발현 및 그 조절기전에 대하여 알아보았다.

분진에 의하여 폐장내 여러 세포들이 ROS와 RNS를 분비하며 NOS를 발현한다(Vallyathan et al., 1988; Jornes et al., 1991; Castranova, 1994; Martin et al., 1997). 때로는 질소기와 산소기의 상호반응에 의하여 다른 산화제에 비하여 더욱 강력한 물질을 만들어 내기도 한다(Stamler와 Hausladen., 1998; Eu et al., 2000). 또한 질소기는 산소기와 더불어 신호전달계에 작용하여 cytokine 활성화와 같은 과정에 관여하는 것으로 알려진바 분진에 의한 NO와 NOS의 조절기전의 파악은 분진에 의한 폐장의 반응 및 질환발생기전의 이해에 매우 중요하다. NO는 NADPH 의존성 반응에 의하여 L-arginine의 guanidino 군으로 부터 만들어지는데 이 반응은 NOS에 의하여 촉진되어진다. NOS는 3가지 isoform이 있는데 neuronal NOS(nNOS, type I), inducible NOS(iNOS, type II) 그리고 endothelial NOS(eNOS type III)이다. 분진이나 자극물질에 의한 iNOS의 발현 및 생산증가가 보고되어 있는바 분진 흡입에 의한 NO의 분비증가는 주로 iNOS에 의한 것으로 생각되어진다. 본 연구결과에서도 α -quartz 처리시 섬유모세포 세포주인 Rat2 세포의 iNOS 단백질발현이 분진의 농도 의존적으로 증가함이 확인되었다.

NOS는 cytochrom P450 reductase와 유사하게 hemeprotein을 함유한 FAD, FMN, NADPH, calmodulin 그리고 ferroprotoporphyrine IX 결합부위를 가지고 있으며 NO를 합성하는데 작용할 뿐 아니라 L-arginine의 농도가 낮을 때 superoxide anion을 생산시키고 이것은 SOD에 의하여 H_2O_2 로 변화되어 결과적으로 H_2O_2 의 분비를 증가시키는 작용을 가지고 있는 것이 밝혀졌다(Heinzel

etal., 1992; Pou et al., 1992). 그러나 어떤 세포에서 NOS에 의하여 superoxide가 생산되는지 그리고 NOS가 NO와 superoxide의 생산을 어떻게 조절하는지는 알려져 있지 않다. Xia(1996)에 의하면 NOS에 의하여 생산되는 NO와 superoxide가 반응하여 강력한 산화제인 peroxyxynitrite를 만들어 세포독성을 더욱 높인다고 발표하며 있어 이와 관련된 기전에 대한 이해가 더욱 요구되어진다. 본 연구에서는 섬유화 부위의 주요 구성세포인 섬유모세포를 독성이 가장 강한 분진 중의 하나인 α -quartz와 반응시킨 후 NO와 H_2O_2 의 생산을 확인한 바, 분진 처리에 의하여 NO와 H_2O_2 의 분비가 증가되었으며 iNOS 억제제에 의하여 분진에 의한 NO와 H_2O_2 의 분비 증가가 억제되었는바 α -quartz로 자극 받은 섬유모세포에서 증가된 iNOS가 이 세포로부터 NO와 H_2O_2 의 분비를 촉진시키는 것을 알 수 있었다.

Kotsonis 등(1999)은 실험관내 모델에서 일정량의 L-arginine을 주었을 때 NOS에 의하여 NO의 생산이 급격하게 증가하는 Phase I과 점차 NO 생산 속도가 점차 둔화되는 Phase II로 구별됨을 보고한 바 있어 일정량의 L-arginine를 주었을 때 실험관내에서는 NOS에 의하여 이 적정 수준이하로 감소되면 충분한 양의 NOS가 있어도 NO가 생산되지 않음을 알 수 있었다. 또한 실험관내에서 L-arginine의 양이 일정할 때 NOS에 의하여 초기에는 NO의 생산이 증가하나 후기에는 NO의 분비증가가 둔화되는 반면 H_2O_2 의 생산이 급격히 증가한다는 보고가 있어 NOS가 ROS의 생산에도 관여함이 증명된 바 있다. 본 연구는 시험관내 실험으로 진행되어 배지내에 L-arginine의 양이 제한되어 있음으로 분진을 처리하고 24시간 배양하여 iNOS에 의하여 H_2O_2 가 충분히 생산될 수 있는 조건을 만들어 주었다. iNOS에 의하여 생산된 H_2O_2 가 iNOS의 발현 조절에 어떠한 작용을 하는지 알아보기 위하여 분진 처리 30분전에 항산화제인 catalase로 전처리한 후 섬유모세포의 NO와 H_2O_2 생산능 및 iNOS 단백질 발현 정도를 관찰하였다. Catalase에 처리한 군에서 NO 및 H_2O_2 생산이 증가하였으며 특히 H_2O_2 는 현저하게 증가하였고 iNOS 발현도 증가하였다.

따라서 결정형 규산분진은 섬유모세포에서 iNOS 발현을 자극하고 증가된 iNOS는 RNS뿐 아니라 ROS의 분비를 유도하며 RNS와 ROS가 iNOS의

억제하여 자가조절하는 효과를 가지고있는 것으로 생각되었다.

요 약

목적 : Rat2 섬유모세포에서 α -quartz에 의해 유도된 NOS의 조절기전을 알아보기 위하여 본 연구가 시도되었다.

방법 : Rat2 세포에 있어서 α -quartz 자극에 의한 NO와 H_2O_2 의 분비 및 iNOS의 발현을 관찰하였고, iNOS 억제제인 L-NIL과 H_2O_2 억제제인 catalase를 전처리하고 마찬가지로 NO와 H_2O_2 분비 그리고 iNOS의 단백질 발현 정도를 western blotting을 이용하여 관찰하였다.

결과 : α -quartz는 Rat2 세포에서 iNOS에 의한 NO와 H_2O_2 의 분비를 유도하였다. L-NIL은 Rat2 세포에서 α -quartz에 의한 H_2O_2 의 분비와 iNOS 발현을 완전히 억제하였다. Catalase 로 전처리 하였을 때 α -quartz로 유도된 iNOS에 의하여 생산증가된 H_2O_2 가 iNOS를 억제하는 autoinhibitory pathway가 차단되어 결과적으로 H_2O_2 의 분비와 iNOS의 발현이 증가하였다.

결론 : Rat2 세포에서 α -quartz에 의하여 유도된 iNOS는 H_2O_2 의 분비를 촉진하고 이 H_2O_2 는 iNOS 기능을 조절하는 자가조절기전에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 안병용, 김경아, 문제혁, 정진숙, 김은경 등. 결정형 규산분진에 폭로된 섬유모세포의 자가증식. 대한산업의학회지 2000;12:209-217.
- Blackford JA Jr, JM Antonini, V Vastranova, RD Dey, Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:426-431.
- Castranova V. Generation of oxygen radicals and mechanism of injury prevention. Environ Health Perspect 1994;(Suppl 10):65-68.
- Choe N, Tanaka S, Kagan E. Asbestos fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial

- cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:226-236.
- Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler J. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000;39:1040-1047.
- Haddad IY, S Zhu, J Crow, E Barefield, T Gadilhe et al. Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol* 1996;270:L898-L906.
- Heinzel B, John M, Klatt R, Bohme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochemical J*. 1992;283:627-630.
- Jornes PG, Van Overveld FJ, Bult H, Vermeire PA, Herman AG. L-arginine-dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur J Pharmacol*. 1991;200:205-209.
- Kotsonis P, Frey A, Frohlich LG, Hofmann H, Rief A et al. Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. *Biochim J*, 1999;340:745-752.
- Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Jiang NF, et al. The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect* 1997;105(Suppl 5):1301-1307.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biochem Chem* 1992;267:24173-24176.
- Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Orringer MB, Phand S, et al. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Am J Physiol* 1992;263:L536-542.
- Seekamp A, MS Mulligan, GO Till, PA Ward. Requirement for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993;142:1217-1226.
- Setoguchi K, M Takeya, T Akaike, M Suga, R Hatorri, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and its involvement in pulmonary granulomatous inflammation in rats. *Am J Pathol*. 1996, 149:2005-2022.
- Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nature Struct Biol*. 1998;5:247-249.
- Thomas G, T Ando, K Verma, E Kagan. Asbestos fibers and interferon γ up-regulate nitric oxide production in rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:707-715.
- Vallyathan V, Shi X, Dalal NS, Irr W, Castranova V. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. *Annu Rev Respir Dis* 1988;18:1213-1219.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:6770-6774.