

중합도 50mer 이하의 염기성 아미노산 중합체들이 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포에서의 생리적 뮤신유리 및 분비자극 상태에서의 뮤신유리에 미치는 영향

이충재* · 이재훈 · 석정호 · 허강민
충남대학교 의과대학 약리학 교실

Effects of Polymerized Basic Amino Acids Under 50mer Range of Degree of Polymerization on Physiological and Stimulated Mucin Release from Cultured Hamster Tracheal Surface Epithelial Cells

Choong Jae LEE*, Jae Heun LEE, Jeong Ho SEOG and Gang Min HUR
Department of Pharmacology, College of Medicine, Chungnam National University

(Received July 23, 2002 ; accepted September 10, 2002)

Abstract -- In the present study, we tried to investigate whether polymerized basic amino acid e.g. poly-L-lysine (PLL) which has the degree of polymerization under 50mer significantly affects the physiological and stimulated mucin release from cultured hamster tracheal surface epithelial cells. Confluent primary hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hr and chased for 30 min in the presence of either PLLs or adenosine triphosphate (ATP) and PLL to assess the effects on basic or ATP-stimulated ^3H -mucin release. Possible cytotoxicities of PLLs were assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release from HTSE cells during treatment. The results were as follows: (1) PLLs significantly inhibited basic mucin release from cultured HTSE cells in a dose-dependent manner from the range of 46mer to 14mer ; (2) PLL 46mer significantly inhibited the stimulated mucin release by ATP from cultured HTSE cells ; (3) there was no significant release of LDH from cultured HTSE cells during treatment. We conclude that PLLs inhibit both physiological and stimulated mucin release from airway epithelial cells without significant cytotoxicity and PLL lost its activity under the range of 14mer. This finding suggests that polymer of basic amino acid like PLL might function as a regulator for hypersecretion of mucus manifested in various respiratory diseases.

Keywords □ airway, PLL, mucin, ATP, HTSE

인체 호흡기에 존재하는 점액은 섬모세포와의 협동적 작용을 통해, 인체에 불필요하거나 혹은 유해한 물질의 제거에 있어서 중요한 역할을 한다(Newshound *et al.*, 1983). 점액의 인체방어 기능은 주로 점액의 구성요소인 뮤신의 점성 및 탄성(viscoelasticity)에 기인하는데, 이러한 뮤신의 양과 질의 이상은, 기도 생리의 이상뿐 아니라 인체의 방어작용에 영향을 주어 더 심한 병리 현상을 유발할 수 있다. 즉, 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 혹은 점액의 과다분비는 이러한 질환군의 예후

를 악화시키는 주 요인임이 알려져 있다(Frigas *et al.*, 1981; Gleich, 1990). 현재, 이러한 과다분비 점액의 생성 및 분비를 조절할 수 있는 유일한 약물은 glucocorticoid로 알려져 있고, 임상에서 사용되고 있으나, glucocorticoid의 다양한 약리작용 및 그에 수반되는 광범위한 부작용이 치료약물로서의 효용성을 제한하고 있는 실정이다(Mutschler *et al.*, 1995). 최근, 본 연구자 등은 호흡기 뮤신의 약리 연구에 보편적으로 사용되는 일차배양된 햄스터 기관표면 상피(HTSE)세포(Kim *et al.*, 1989) 및 기도점액의 과다분비 상태가 유발된 흰쥐(Pon *et al.*, 1994)를 대상으로 염기성 아미노산의 중합체인 poly-L-arginine (PLA)을 투여하고, PLA가 호흡기 뮤신의 유리를 억제하

*To whom correspondence should be addressed.

며, *in vivo* 호흡기 배상세포 내에 함유된 점액의 함량을 정상화시킴(Lee, 2001a)을 보고한 바 있다. 이에 연계된 본 연구에서는 PLA와 유사한 염기성 아미노산인 L-lysine의 중합체인 poly-L-lysine을 이용하여, 호흡기 배상 세포로부터 뮤신의 분비를 조절할 수 있는 최적의 후보 물질을 탐색하고자 하였다. 즉, 뮤신유리 억제활성을 보여주는 최소의 중합도(분자량)를 검색하고, 이러한 물질이 PLA의 경우에서와 같이 생리적(기초적) 상태에서의 뮤신유리에만 억제적으로 작용하는지 혹은 ATP와 같은 뮤신유리를 자극하는 물질을 동시 투여함으로써 분비 자극된 상태에서의 뮤신유리도 억제하는 지 여부를 규명함으로써 이러한 염기성 아미노산 중합체가 과다분비 호흡기 점액의 조절약물로 응용될 가능성을 검증해 보고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위하여 8주령의 음성 Golden Syrian 햄스터를 사용하였다. 동물이 실험실에 도착한 후 2-3일간 실험실 환경에 순화시키고, 순화기간 중 일반상태를 관찰, 건강한 동물만을 사용하였다. 환기가 잘되고, 12시간 명암 주기가 유지되며, 실온이 25°C 내외로 유지되는 환경에서 사료와 식수를 자유로이 섭취시켰다.

시약

Poly-L-lysine (PLL), pronase (Type XIV), insulin, trans-ferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), trypsin-EDTA, LDH assay kit (LD-L 10), retinoic acid, gentami-cin, sodium dodecyl sulfate, Sepharose CL-4B, ATP 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium (S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME), fetal bovine serum (FBS), Medium 199 (M199)등은 GIBCO사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, Vitrogen 100은 Celtrix Lab. (Santa Clara, CA, U.S.A.)에서 구입하였으며, 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 이차증류수를 사용하였다.

햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험방법은 Kim 등의 방법(Kim *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1989)을 사용하였다. 8주령의 음성 햄스터를 이산화탄소

로 질식사시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca^{++} , Mg^{++} free Minimum Essential Medium에 용해시킨 0.1% pronase를 기관강 내에 주입하고, 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 16시간 후, 기관강 내용물을 세척 및 수거하고, 10% FBS를 함유하는 MEM 내에서 $200\times g$ 로 원심분리 함으로써 수거한 세포를 2회 세척했다. 세척된 cell pellets는 insulin (5 $\mu g/ml$), transferrin (5 $\mu g/ml$), epidermal growth factor (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1 μM), sodium selenite (0.01 μM), retinoic acid (0.1 μM), fetal bovine serum (5%, v/v), Penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu g/ml$), Gentamicin (50 $\mu g/ml$) 등이 함유된 DME와 M199의 1:1 혼합 배양액에 재현탁 시켰다. Vitrogen 100을 이용하여 준비된 두꺼운 collagen gel (0.15 ml/cm²)이 도포된 24 well plate에 세포를 10^4 cells/cm²의 밀도로 분포시켰다. 세포는, 습도가 충분히 유지되며, 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는, 37°C 세포배양기내에서 배양되었으며, 1-3일간 배양된 후에는 37°C에서 32°C 조건으로 변경하여 배양하였다. 배양액 교체는 배양 개시후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다.

뮤신의 대사적 방사선 표지

Kim 등(Kim *et al.*, 1985)의 방법을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10^5 cells/well)에, 10 $\mu Ci/ml$ 의 [^{6-³H}] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200 μl 씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양 함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)되었다.

약물 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액(pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5ml의 Dulbecco's Ca^{++} , Mg^{++} free PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 최종농도 0.1 μM -100 μM 의 각 중합도별 PLL을 함유하는 PBS를 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. ATP에 의한 뮤신유리(분비) 자극상태에서의 PLL의 영향을 검증하기 위한 실험에서는 200 μM 의 ATP와 10 μM 의 PLL 46mer를 동시에 처리하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample (이하 T sample, T로 약칭)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 50 μl 의 상등액은 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용하기 위해 덜어 놓은 후, 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저

장하였다(Kim *et al.*, 1985).

뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였다(Kim *et al.*, 1985). 수거된 PT, T sample을 0.1 M citric acid를 써서 pH 5.0으로 조정하고 100 unit/ml의 testicular hyaluronidase (Type VI-S)를 가한 뒤 37°C에서 16시간 동안 incubation하였다. Incubation이 끝나면 digestion mixture를 0.2 M NaOH로 중화시키고 최종농도가 0.1%가 되도록 SDS 용액을 가한 뒤 2분간 끓인 다음 12,000×g에서 5분간 원심분리했다. PT의 경우 원심분리 후의 상등액 50 μl에 150 μl의 running buffer (50 mM NaAc, 0.1% SDS, pH 7.2), 2 μl의 10% SDS, 3 μl의 5 M NaCl을 가했고, T의 경우에는 상등액 100 μl에 100 μl의 running buffer, 2 μl의 10% SDS, 3 μl의 5 M NaCl을 가한 뒤 철저히 혼합하였다. 이렇게 조제된 loading sample들을 running buffer로 평형화된 Sepharose CL-4B column (1×50 cm)에 적용하였다. Column은 0.336 ml/min의 유속으로 작동되었고, 한 분획의 용량은 0.42 ml로 하였다. 수거된 각 분획에 3.2 ml의 scintillation cocktail을 가하고 잘 섞은 뒤 Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac)를 이용, 방사선량을 측정하였다. 전체 분획 중 void volume peak의 4분획의 방사선량 총합을 그 sample 중의 뮤신의 양으로 정의하였다. 각 culture well 간에 있을 수 있는 뮤신 기초유리율의 변이도를 보정하기 위하여, T기간 동안 유리된 뮤신의 양을 PT기간 동안 유리된 뮤신의 양으로 나누어 얻어지는 비율을 분비지수(secretory index)로 정의하고, 대조군과 약물처리군의 분비지수 평균값을 통계학적으로 비교함으로써, 뮤신유리에 미치는 약물의 효과를 검증하고자 하였다.

약물 처리시 HTSE 세포로부터 유리되는 젖산 탈수소효소(LDH) 활성 측정

LDH 활성 측정은 commercial kit (Sigma, LD-L 10)을 이용하였다. 50 μl의 배양 상등액을 assay kit의 reaction mixture와 혼합하고 340 nm에서의 경시적 흡광도 증가치를 UV-spectrophotometer로 측정, LDH 활성도를 계산하였다.

통계처리

모든 측정 결과는 mean±S.E.M.으로 환산된 후, 약물처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판

정하였다.

결과 및 고찰

다수의 연구자들의 보고(Coyle *et al.*, 1993, Gleich *et al.*, 1988, Uchida *et al.*, 1993, Wardaw *et al.*, 1988, Elferink, 1991, Hammes *et al.*, 1994, Frigas *et al.*, 1980, Frigas *et al.*, 1981, Motogima *et al.*, 1989, Gleich, 1990)와는 달리, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포(HTSE)에서, EPO와 MBP 등의 양이온성 내인성 펩티드 및 PLA 혹은 PLL 등의 염기성 아미노산의 중합체에 의해 호흡기 상피 배양세포로부터의 뮤신유리가 억제된다는 실험 결과가 최근에 들어와서 연속적으로 보고되었다(Ko, 1995, Ko *et al.*, 1999, Lee, 2001a, Lee 2001b). 현재, 호흡기 임상에서 잦은 뮤신의 생성이나 분비를 감소시킬 수 있는 약물은 광범위한 치료작용과 부작용을 발현하는 glucocorticosteroid가 유일하며, 따라서 nonsteroidal agent로서 뮤신의 유리(분비)를 억제하는 것으로 보고된 물질은 이러한 염기성 아미노산 중합체가 최초인 것으로 알려져 있다. 이러한 보고와 연계된 본 연구에서는, 세포독성이 발현되지 않으면서 뮤신유리를 특이적으로 억제할 수 있는 PLL의 최소 중합도(분자량)를 검색하고, 동시에 잘 알려진 mucin secretagogue인 ATP를 투여하여 뮤신유리(분비)가 자극된 상태에서도 PLL이 여전히 뮤신유리를 억제할 수 있는지를 검증하고자 하였다. Fig. 1, 2, 3에서

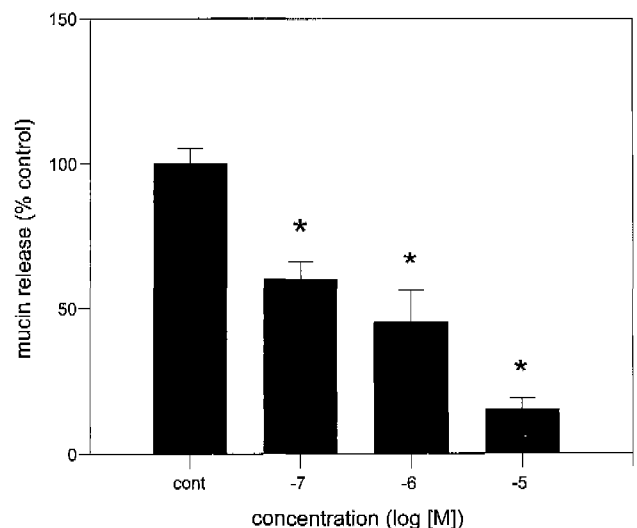


Fig. 1. Effect of PLL 46mer on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.1-10 μM of PLL 46 mer and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean±S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control (p<0.05).

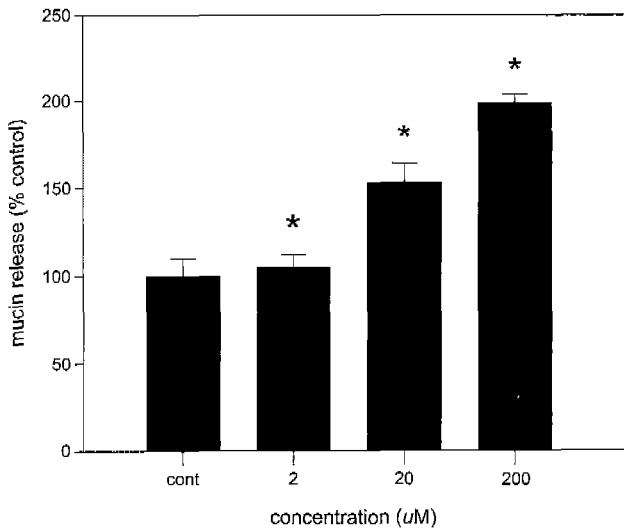


Fig. 2. Effect of ATP on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 2-200 µM of ATP and the amount of ³H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control (p<0.05).

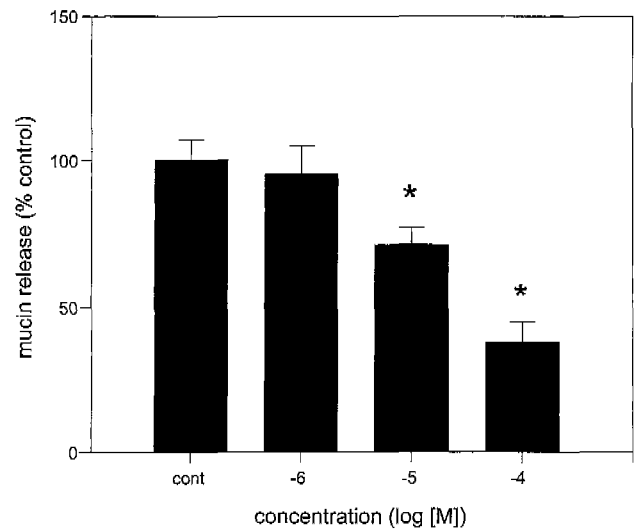


Fig. 4. Effect of PLL 20mer on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 1-100 µM of PLL 20mer and the amount of ³H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control (p<0.05).

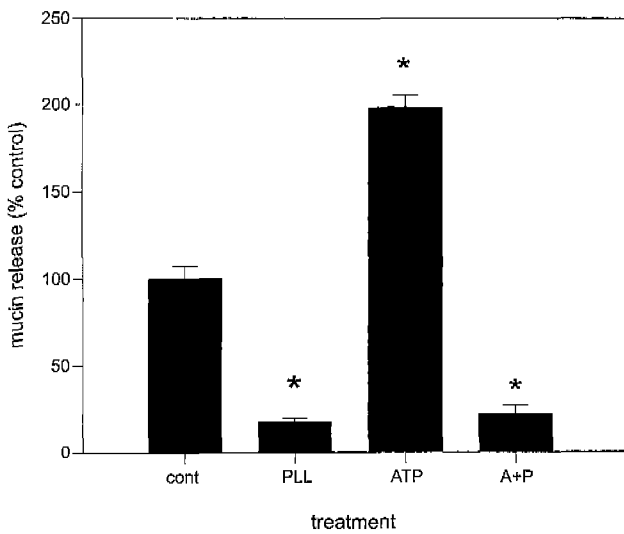


Fig. 3. Effect of PLL 46mer on stimulated mucin release by ATP from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of a combination of 200 µM of ATP and 10 µM of PLL 46mer. The amount of ³H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control (p<0.05).

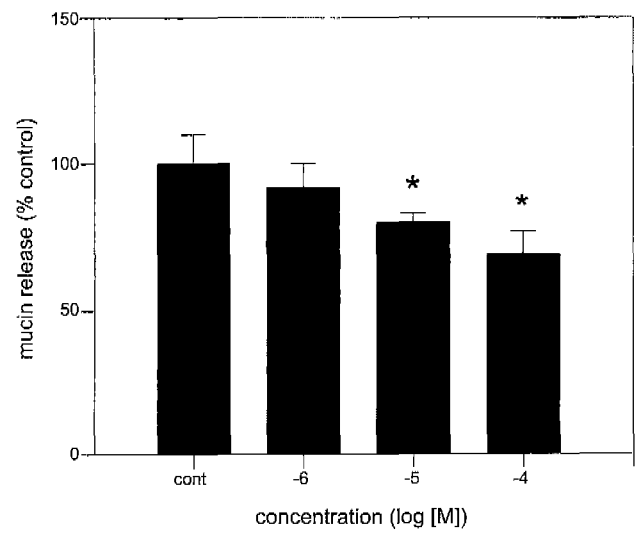


Fig. 5. Effect of PLL 14mer on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ³H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 1-100 µM of PLL 14mer and the amount of ³H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean ± S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control (p<0.05).

볼 수 있듯이 PLL 46mer는 기초적(생리적) 뮤신유리를 용량의존적으로 억제하며, 동시에 뮤신유리를 강하게 자극하는 물질인 ATP에 의한 분비자극된 상태에서의 뮤신유리도 억제하였다. ATP에 의한 뮤신유리 자극상태는 만

성 기관지염, 천식, 낭포성 섬유증, 기관지 확장증, 폐렴 등의 질환에서 객담이 과다생성, 분비되는 상태와 유사한 것으로 간주할 수 있다. 따라서, 이러한 실험결과는 PLL 등이 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 객담 과다분비를 효과적으로 조절할 수 있는 약물로 작용할 가능

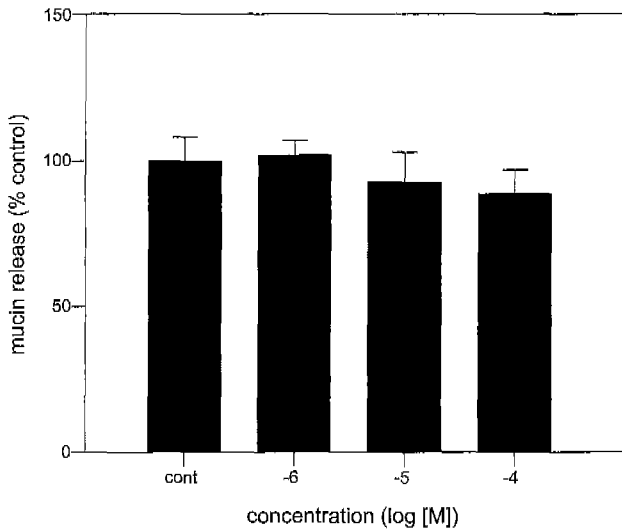


Fig. 6. Effect of PLL 5mer on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radio-labeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 1-100 μM of PLL 5mer and the amount of ^3H -mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

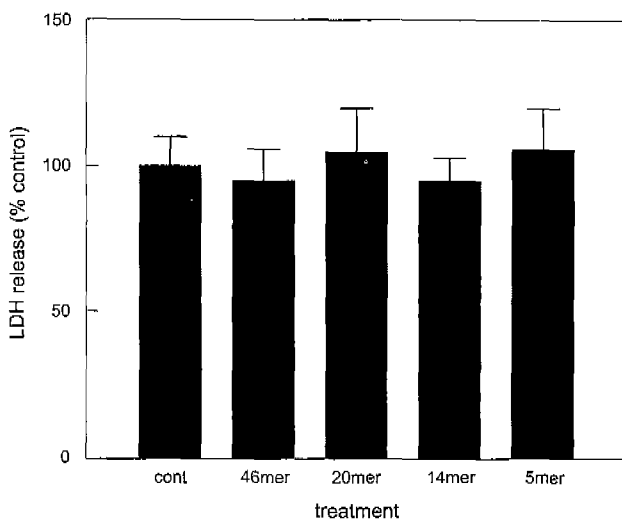


Fig. 7. Effects of PLLs on LDH release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were treated with varying concentrations of PLLs for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells (46mer; 10 μM , 20mer; 100 μM , 14mer; 100 μM , 5mer; 100 μM).

성을 시사한다고 볼 수 있다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 PLL의 중합도가 20mer일 때, 최종 투여농도 10 μM 에서 대조군의 71 \pm 6%, 100 μM 에서 38 \pm 7%의 뮤신유리를 나타내었고, Fig. 5에서 볼 수 있듯이 PLL의 중합도가 14mer로 감소했을 때에는, 최종 투여농도 10 μM 에서 대조군의 80 \pm 3%, 100 μM 에서 69 \pm 8%의 뮤신유리를 나

타내었다. 그러나, 중합도가 5mer로 감소했을 때(Fig. 6.)에는 최고 농도인 100 μM 에서도 뮤신유리를 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 PLL 등의 염기성 아미노산 중합체의 뮤신유리 억제 활성의 유지를 위해서 최소한 14mer 혹은 적어도 10mer 부근의 중합도가 요구된다는 점을 시사하는 것이다. 뮤신유리 억제 활성을 유지하면서 최소의 중합도를 가지는 PLL을 검색하는 이유는, 보고된 바와 같이(Ko *et al.*, 1999, Lee, 2001b), PLL 등의 뮤신유리 억제 활성이 그 보유 양전하를 경유하여 나타나고, 중합도가 커질수록 세포독성이 강하게 나타날 수 있다는 사실에 근거하여, 가능하면 중합도가 낮은, 즉 분자량이 작은 물질이, 그렇지 않은 물질에 비해 생체에 투여될 때 부작용을 유발할 가능성이 상대적으로 적을 것으로 예상되기 때문이다. 또한, PLL 등의 폴리양이온성 물질들에 의한 세포독성 유발 가능성을 검증하기 위하여, 뮤신유리 억제 작용을 발현하는 최소 중합도의 PLL 등이 동일한 배양세포에서 LDH 유리에 미치는 영향을 검증하였다. 잘 알려진 바와 같이, 세포질 내에 존재하는 효소인 LDH는 유해물질 혹은 유해한 세포 외 환경으로 인한 세포막의 손상에 의해 세포 외로 유리될 수 있으며, 따라서, 특정물질에 의해 발현될 수 있는 세포독성의 한 지표로 채택될 수 있다. Fig. 7에 나타난 결과에서 볼 수 있듯이 PLL 등은 뮤신유리 억제 활성을 보유하는 46mer에서 14mer의 범위까지 대조군과 비교시 LDH 유리를 유의성 있게 증가시키지 않았음을 알 수 있다. 또한, ^{51}Cr 을 이용한 세포독성 실험에서도 PLL 등은 유의성있는 세포독성을 발현하지 않음을 확인하였으며 (data not shown), 이는 이전의 연구보고(Ko *et al.*, 1999, Lee, 2001a, Lee, 2001b)에서와 동일하게, PLL이 일차배양 HTSE 세포에 대해 독성을 유발하지 않음을 일관되게 시사하는 결과이다. 결론적으로, PLL 등은 생리적 상태에서의 뮤신유리 뿐만 아니라 분비자극된 상태에서의 뮤신유리도 효과적으로 억제하였으며, 활성 발현에 요구되는 최소 중합도는 14mer임을 알게 되었으며, 비교적 고농도(100 μM)에서도 유의성있는 세포독성이 발현되지 않음을 알게 되었다.

본 연구자 등은 이러한 현상에 개재된 기전을 규명하고자, PLL이 보유하는 양전하를 매개로 하는 이러한 활성이 입체 이성체 별로 상이할 수 있는지, 혹은 소수성 아미노산과 PLL 등을 결합시켜 배양세포막에의 접근성을 감소시켰을 때에 활성 유지에 어떤 변화가 오는지 등의 주제를 중심으로 후속 연구를 진행 중이다.

참고문헌

Coyle, A.J., Ackerman, S.J. and Irvin, C.G. (1993). Cationic

- proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 896-900.
- Elferink, J.G.R. (1991). Changes of plasma membrane permeability in neutrophils treated with polycations. *Inflammation*, **15** (2), 103-115.
- Frigas, E., Loegering, D.A. and Gleich, G.J. (1980). Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab. Invest.*, **42**, 35-43.
- Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J. (1981). Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.*, **56**, 345-353.
- Gleich, G.J., Flavahan, N.A., Fugisawa, T. and Vanhoutte, P.M. (1988). The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium; a model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **81**, 776-781.
- Gleich, G.J. (1990). The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **85**, 422-436.
- Hammes, M. and Singh, A. (1994). Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayer to albumin. *J. Lab. Clin. Med.*, **123**, 437-446.
- Kim, K.C., Opaskar-Hincman, H. and Bhaskar, K.R. (1989). Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.*, **15**, 299-314.
- Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettesheim, P. and Jetten, A.M. (1985). Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4021-4027.
- Ko, K.H. (1995). Inhibitor for secretion of mucin. The patent in the Republic of Korea, Registered No. 6828.
- Ko, K.H., Lee, C.J., Shin, C.Y., Jo, M.-J. and Kim, K.C. (1999). Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.*, **277** (21), L811-L815.
- Lee, C.J. (2001a). Effects of poly-L-arginine on the mucin release from airway goblet cells of hamster and on the mucosubstances of airway goblet cells of rats. *J. Appl. Pharmacol.*, **9** (4), 263-269.
- Lee, C.J. (2001b). Specificity in the inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *J. Appl. Pharmacol.*, **9** (3), 218-223.
- Motogima, S., Frigas, E., Loegering, D.A. and Gleich, G.J. (1989). Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **139**, 801-805.
- Mutschler, E. and Derendorf, H. (1995). Drug actions. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, 410-411.
- Newshound, M.T. and Biemenstock, J. (1983). Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease (Baum, G.L. and Wolinsky, E. (eds)), 3rd ed., Little Brown and Company.
- Pon, D.J., Van Staden, C.J., Boulet, L. and Rodger, I.W. (1994). Hyperplastic effects of aerosolized sodium metasilfite on rat airway mucus-secreting epithelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 1025-1030.
- Uchida, D.A., Ackerman, S.J., Coyle, A.J., Larsen, G.L., Weller, P.F., Freed, J. and Irvin, C.G. (1993). The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat *in vivo*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 982-988.
- Wardaw, A.J., Dunnette, S., Gleich, G.J., Collins, J.V. and Kay, A.B. (1988). Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**, 62-69.