

고삼투압 자극이 호산구의 활성화에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 소아과학교실*, 기생충학교실†, 알레르기 연구소‡, 열대의학 연구소§, 두뇌한국21 의과학사업단||

권병철*, † · 김은수*, † · 김경원*, † · 송태원*, † ·
손명현*, †, || · 신명현†, †, §, || · 김규언*, †, ||

Effects of Hyperosmolar Stimuli on Activation of Human Eosinophilic Leukaemia EoL-1 Cells

Byoung Chul Kwon, M.D.*, †, Eun Soo Kim, M.D.*, †, Kyung Won Kim, M.D.*, †
Tae Won Song, M.D.*, †, Myung Hyun Sohn, M.D.*, †, ||
Myeong Heon Shin, M.D.†, †, §, || and Kyu-Earn Kim, M.D.*, †, ||

Department of Pediatrics*, Department of Parasitology†, Institute of Allergy‡,
Institute of Tropical Medicine§, BK 21 Project for Medical Science||,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Airway dehydration and subsequent hyperosmolarity of periciliary fluid are considered critical events in exercise-induced bronchoconstriction. The aim of this study was to establish if a hyperosmolar challenge could induce activation of eosinophils.

Methods: Human eosinophilic leukaemic cell lines, EoL-1 cells were incubated with hyperosmolar solutions for 15 minutes. Activation of EoL-1 cells was monitored by degranulation and superoxide anion production. In addition, we examined surface expression of CD69 and ICAM-1.

Results: Hyperosmolar stimuli didn't induce superoxide anion production and degranulation. In addition, EoL-1 cells cultured with hyperosmolar medium at 930 mOsm/kg H₂O resulted in no significant increment in fluorescent intensity of CD69 and ICAM-1 expression compared with results for cells incubated with isomolar medium.

Conclusion: We found that hyperosmolar stimuli don't cause activation of EoL-1 cells, but further studies are required to determine the role of eosinophil in the mechanism of exercise-induced asthma. (Korean J Pediatr 2005;48:881-885)

Key Words: Exercise-induced asthma, Hyperosmolar, EoL-1 cells

서 론

운동 유발성 천식은 운동 후 기도폐쇄로 인한 기침, 천명, 호흡곤란을 특징으로 하는 질환이다¹⁾. 운동이 기관지 수축을 일으키는 기전에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않은 상태로 몇몇 가설들이 주장되고 있다²⁾. 첫째, 고삼투압 가설로서 운동으로 인해 기도 표면의 수분 소실이 발생하게 되면 삼투압의 증가를 일으켜 염증 세포로부터 여러 화학매개체가 유리되어 기

관지 수축을 일으킨다는 가설이다. 천식과 같이 기도 내에 만성 염증이 존재할 경우에는 염증 자체가 수분 소실을 더욱 용이하게 함으로써 운동으로 인한 기관지 수축이 쉽게 일어나게 된다^{3, 4)}. 운동 유발성 천식의 발병에 대한 다른 가설로는 수분 소실에 의한 건조보다는 기도 내 온도 변화에 의해 기관지 수축이 발생한다는 설이다. 즉, 운동으로 인해 기도 내의 온도가 감소하게 되면 점막하 혈관들의 확장이 일어나고 기도 점막의 부종이 초래되어 결국에는 기도가 좁아진다는 가설이다⁵⁻⁷⁾.

호산구는 기관지 천식 및 아토피 피부염 등 알레르기 질환에서 염증반응을 일으키는데 핵심적인 역할을 하며⁸⁾, 침윤된 호산구 수와 천식 증상의 심한 정도와의 상관성이 잘 알려져 있다⁹⁾. 활성화된 호산구는 반응성 산소 매개체(reactive oxygen intermediates), 지질 매개체(lipid mediators), 세포독성 과립성 단백질(cytotoxic granular proteins) 등을 분비함으로써 기도 조직에

이 논문은 2003년 소아과학회 MSD 학술상 보조에 의한 연구임.

접수: 2005년 3월 17일, 승인: 2005년 5월 9일

책임저자: 김규언, 연세의료 영동세브란스병원 소아과

Correspondence: Kyu-Earn Kim, M.D.

Tel: (02)3497-3353 Fax: (02)3461-9473

E-mail: kekim@yumc.yonsei.ac.kr

손상을 일으켜 알레르기 증상을 나타낸다¹⁰⁾. 세포독성 단백질에는 major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil peroxidase(EPO), eosinophil protein X(EPX) 등이 있다.

본 연구에서는 운동 유발성 천식의 발병기전으로 생각되어지는 고삼투압 환경을 호산구 세포주(human eosinophilic leukaemic cell line, EoL-1 cells)에 자극했을 때 여러 염증 매개체의 분비와 호산구 세포의 활성화 지표로 알려져 있는 CD69와 유착분자 중에 하나인 intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)의 발현 여부를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 호산구 세포주 배양

호산구 세포주인 EoL-1 세포(Riken Cell Bank, Tsukuba Science City, Japan)를 L-glutamin, gentamycin sulfate, 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 RPMI 1640(Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA) 배양액에 풀어 세포 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 계대 배양하였다. 배양액은 3-4일 간격으로 갈아 주었다.

2. Superoxide anion의 측정

EoL-1 세포를 다양한 삼투질 농도(250-930 mOsm/kg H₂O)의 만니톨 용액에 15분 동안 자극시켰다. 각각의 EoL-1 세포를 세척한 후 10 mM HEPES, 0.03% gelatin, 100 uM cytochrome c가 포함된 Hanks balanced salt solution(HBSS; pH 7.4) 용액을 첨가하여 96-well 조직 배양 플레이트에 분주하였다. 550 nm의 파장에서 microplate reader(Thermomax, Molecular Device, Sunnyvale, Calif., USA)를 이용하여 30분 간격으로 4시간 동안 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정하지 않을 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. Superoxide anion의 생성 정도는 흡광 계수(extinction coefficient: 21.1×10⁻³ M/cm for reduced cytochrome c)를 이용하여 측정하였다.

3. EoL-1 세포 표면의 CD69 및 ICAM-1 발현의 측정

EoL-1 세포(1×10⁶/mL)를 930 mOsm/kg H₂O 삼투질 농도의 만니톨 용액과 295 mOsm/kg H₂O 삼투질 농도의 RPMI 1640 배지에 각각 15분 동안 자극시킨 후 ECP 측정을 위해 배양 상층액을 -20°C에서 보관하였다. 수거된 EoL-1 세포를 1% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 phosphate-buffed saline (PBS) 용액으로 2-3회 세척한 후 FITC-conjugated mouse anti-human CD69 mAb(BD Bioscience, San Jose, Ca, USA)와 FITC-conjugated mouse anti-human ICAM-1 mAb(R & D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 각각 첨가하여 4°C에서 30분간 보관하였다. FITC-conjugated mouse IgG1 mAb(R & D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 iso-

type control antibody로 사용하였다. 이후 세포를 세척하였고, 0.5% paraformaldehyde로 고정한 후 FACScan(BD Bioscience, San Diego, Ca., USA)을 이용하여 CD69와 ICAM-1의 발현을 측정하였다. 다음 실험으로 EoL-1 세포를 고삼투압의 만니톨 용액과 등장성의 RPMI 1640 배지에 각각 15분간 자극시킨 후 배지를 등장성인 RPMI 1640으로 바꾸어 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 5시간 동안 배양한 후 위에서 설명한 바와 같이 EoL-1 세포 표면의 CD69 및 ICAM-1의 발현을 측정하였다.

4. 상층액 내 ECP 측정

앞서 보관해 놓은 배양 상층액 내의 ECP 농도를 Pharmacia CAP system(Pharmacia diagnostics, Uppsala, Sweden)을 이용하여 radioimmunoassay kit으로 측정하였다.

5. 통계 분석

통계 처리는 SPSS 11.0을 이용하여 student's t-test를 실시하였으며, 유의성 검정은 P<0.05 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. Superoxide anion 측정

EoL-1 세포를 250-930 mOsm/kg H₂O 삼투질 농도의 만니톨 용액으로 15분간 자극시켰을 때, superoxide anion의 생성을 거의 관찰할 수 없었다. 또한 시간에 따른 superoxide anion 생성의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

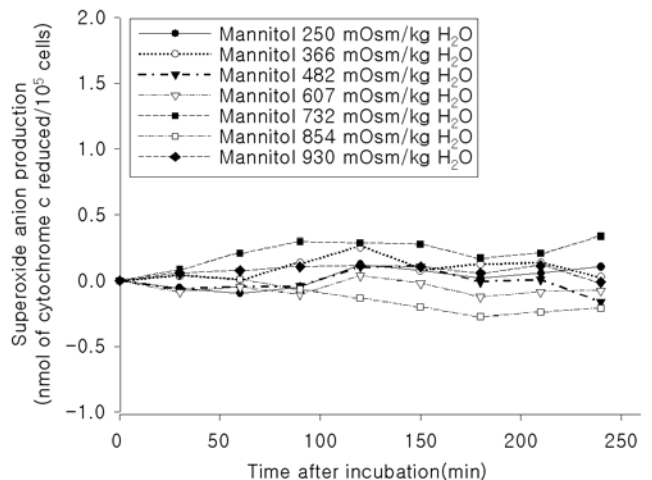


Fig. 1. Superoxide anion production induced by hyperosmolar stimuli. Hyperosmolar stimuli didn't induce superoxide anion production and degranulation.

2. EoL-1 세포 표면의 CD69 및 ICAM-1의 fluorescent intensity 측정

EoL-1 세포를 고삼투압(930 mOsm/kg H₂O) 만니톨 용액과 등장성(295 mOsm/kg H₂O) 배지에 각각 15분간 자극시킨 후 CD69와 ICAM-1의 fluorescent intensity를 측정하였다. CD69는 isotype control(10.3±1.3), 고삼투압 용액 투여군(12.0±0.7), 등장액 투여군(9.7±0.4) 세 군간의 mean fluorescent intensity의 차이가 없었으며, ICAM-1 발현에 있어서는 isotype control(10.3±1.3)에 비해 고삼투압 용액 투여군(138.0±11.3)과 등장액 투여군(145.6±6.1)이 유의한 증가를 보였으나 고삼투압 용액 투

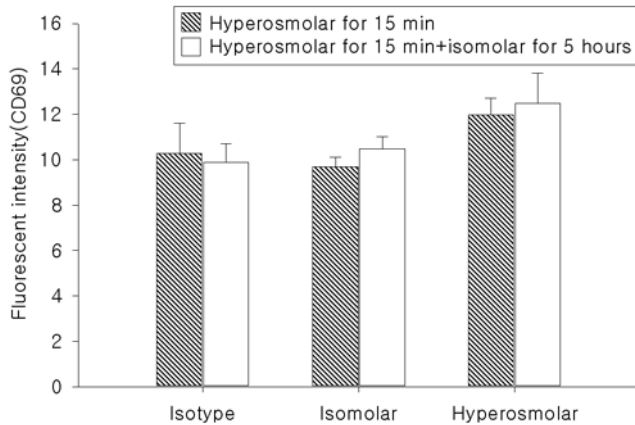


Fig. 2. Effect of hyperosmolar stimuli on the expression of surface CD69 on EoL-1 cells. EoL-1 cells cultured with hyperosmolar medium at 930 mOsm/kg H₂O resulted in no significant increment in fluorescent intensity of CD69 expression compared with results for cells incubated with isomolar medium. Data are presented as mean±SD obtained from five independent experiments.

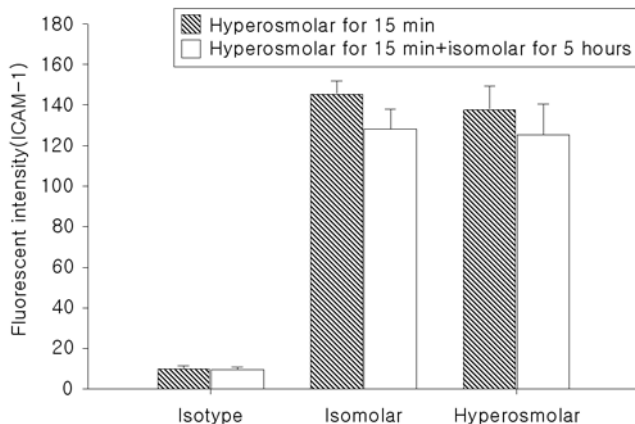


Fig. 3. Effect of hyperosmolar stimuli on the expression of surface ICAM-1 on EoL-1 cells. EoL-1 cells cultured with hyperosmolar medium at 930 mOsm/kg H₂O resulted in no significant increment in fluorescent intensity of ICAM-1 expression compared with results for cells incubated with isomolar medium. Data are presented as mean±SD obtained from five independent experiments.

여군과 등장액 투여군간의 차이는 보이지 않았다(Fig. 2, 3).

다음 실험으로 EoL-1 세포를 고삼투압의 만니톨 용액과 등장성 배지에 각각 15분간 자극시킨 후 배지를 등장성 배지로 바꾸어 5시간 동안 배양한 후, CD69 및 ICAM-1의 fluorescent intensity를 측정하였다. CD69 및 ICAM-1 발현에 있어서 고삼투압 용액 투여군과 등장액 투여군 간의 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(CD69, 12.5±1.3 vs 10.5±0.5; ICAM-1, 125.4±15.0 vs 128.2±9.6)(Fig. 2, 3).

EoL-1 세포를 등장성 배지에 노출시켰을 경우 비록 낮지만 ICAM-1의 발현을 보였으나, CD69의 발현은 관찰할 수 없었다.

3. 상층액 내의 ECP 농도

배양 상층액에서 측정된 ECP 농도는 고삼투압 용액 투여군과 등장액 투여군 모두에서 최저 측정치인 2 µg/L 보다 낮게 측정되었다(data not shown).

고 찰

본 연구에서는 고삼투압의 만니톨 용액으로 호산구 세포주인 EoL-1 세포를 자극시켰을 때 ECP의 생성이나 CD69 및 ICAM-1의 발현에 있어 등장성 배지에 노출시켰을 경우와 비교하여 차이를 보이지 않았다. 위의 결과는 고삼투압 자극을 시킨 직후와 고삼투압 자극을 시킨 다음 등장성 환경에 노출시켰을 경우 모두 같은 결과를 나타내었다. Superoxide anion의 생성에 있어서도 다양한 삼투질 농도에 따른 차이를 보이지 않았으며, 시간의 경과에도 차이를 보이지 않았다.

운동 유발성 천식은 천식 환자에서 흔히 동반되는 질환이며, 운동 후 열손실에 의한 기도 내 온도 변화와 수분 소실에 의한 기도 내 삼투압의 변화가 기관지 수축을 일으키는 것으로 알려져 있다^{2, 11, 12}. 운동에 의한 기관지 수축은 대개 운동 후 5분에서 15분 사이에 일어나며, 약 50%에서는 운동 후 3시간에서 13시간 사이에 일어나는 후기반응을 관찰할 수 있다¹²⁻¹⁴. 이러한 후기 반응은 다양한 염증 매개체와 염증 세포에 의해 발생하는 것으로 생각되어진다^{12, 15-18}.

정상적인 상태에서 기관 내 분비물의 삼투질 농도는 360 mOsm/kg H₂O 정도이며, 운동 후 기관지 내 분비물의 삼투질 농도는 약 900 mOsm/kg H₂O로 증가된다^{19, 20}. 이러한 고삼투압 환경이 여러 세포에 미치는 영향에 대해 살펴보면, 호염기구와 비만세포는 고삼투압 환경에 의해 활성화되어 히스타민을 분비하며, 호염기구는 1,050 mOsm/kg H₂O의 삼투질 농도에서, 비만세포는 700-750 mOsm/kg H₂O의 삼투질 농도에서 히스타민을 최대 분비하였다^{19, 21-23}. 호염기구는 히스타민 분비에 있어 45분에서 60분 정도의 시간이 필요하였고 부분적으로 Ca⁺⁺에 의존적인 양상을 보인 반면, 비만세포는 자극 후 5분 이내 히스타민을 분비를 완성하였고 Ca⁺⁺에 높은 의존적인 양상을 보였다²³. 기관지 상피세포에 고삼투압 자극을 10분간 준 후 등

장성 배지에 옮겨 24시간 동안 배양시켰을 때, 삼투질 농도와 비례하여 IL-8의 생성과 p38 MAP kinase의 tyrosine phosphorylation이 증가함을 관찰하였고, p38 MAP kinase 억제제인 SB203580을 전처리 하였을 때 IL-8의 생성이 부분적으로 억제되었다²⁴⁾. 따라서 기관지 상피 세포에서 p38 MAP kinase가 IL-8 생성의 신호전달경로에 관여하며, 기관지 상피세포가 운동 유발성 기관지 수축의 후기 반응에 있어 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다.

운동 유발성 천식과 관련한 호산구의 역할에 대해 아직까지 명확히 규명되지 않았다. 호산구에 의한 기도 염증은 천식의 중요한 병인의 하나로 운동 유발성 천식의 중증도와와의 관련성이 알려져 있다. 천식 환자를 대상으로 유도 객담을 검사한 결과, 운동 유발성 천식을 가지고 있는 환자에서 그렇지 않은 환자에 비해 객담 내의 호산구 분율과 ECP 농도가 유의하게 높았으며, 운동 후 FEV₁ 감소 정도는 유도 객담 내 호산구 분율과 ECP 농도와 통계학적으로 유의한 양의 상관관계를 가지고 있었다^{25, 26)}. 혈액 내 호산구 분율과 호산구 수의 로그값에 있어서도 운동 유발성 천식을 가지고 있는 환자에서 유의하게 증가되어 있었고, 운동 후 FEV₁ 감소 정도는 호산구 수와 비례하였으며, 호산구 수의 로그값과 유의한 양의 상관관계를 보였다²⁷⁾. 이와는 달리 Gauvreau 등²⁸⁾의 연구에 의하면, 운동 유발성 천식을 가지고 있는 환자를 대상으로 운동 전후의 객담과 혈액 내 호산수를 비교한 결과, 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서는 운동 후 기관지 내의 삼투압 환경과 동일하게 하기 위하여 930 mOsm/kg H₂O의 고삼투압 만니톨 용액을 사용하였고, 고삼투압 자극에 의한 세포독성을 줄이기 위해 자극 시간을 15분으로 하였으며 말초혈액 호산구를 대신하여 EoL-1 세포를 사용하였다. 혈액 내 호산구는 수명이 짧고 적은 농도로 존재하여 실험에 필요한 충분한 수의 호산구를 분리하기 어려운 단점이 있기 때문에 호산구의 기능을 연구하는 데 있어 human eosinophilic leukaemic cell line인 EoL-1 세포가 유용하다²⁹⁾. EoL-1 세포는 말초혈액 호산구와 많은 유사한 특성을 가지고 있어, ECP, CD95(Fas)를 표현하며, IL-3, IL-5, GM-CSF에 대한 수용체를 표현하고 있고, CD49d, CD11b, LFA-1, ICAM-1, Mac-1, integrin a4 등과 같은 유착분자를 표현한다^{29, 30)}.

ICAM-1은 LFA-1과 결합하여 호산구를 염증 부위로 이동시키는 등 기도 내 염증과 관련하여 중요한 역할을 담당하며, 호산구를 활성화시켰을 때 ICAM-1의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다^{31, 32)}. CD69는 활성화된 T 세포, B 세포, NK 세포, 호산구 등에 표현된다. 천식 환자군에 알레르겐을 노출시켰을 때, 대조군에 비해 천식 환자군에서 기관지폐세척액과 말초혈액 내 호산구 세포에 CD69의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다³³⁻³⁵⁾. 따라서 호산구 표면의 ICAM-1 및 CD69 발현의 증가는 호산구의 활성화를 나타냄을 알 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 운동 후 기도 내의 삼투압 환경인 930 mOsm/kg H₂O 정도의 고삼투압 자극을 EoL-1 세포에 자

극시킨 후 호산구 활성화 지표인 CD69, ICAM-1의 발현과 superoxide anion의 생성을 관찰한 결과, 등장성 배지로 자극하였을 때와 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았으며, EoL-1 세포의 탈과립 정도를 확인하기 위하여 측정된 ECP 농도의 증가를 관찰할 수 없었다. 비록 이번 연구에서는 운동 후 발생하는 기관지 수축의 조기 반응과 후기 반응에 있어 고삼투압 자극에 의한 호산구의 활성화를 관찰할 수 없었으나, 향후 연구에 있어 운동 유발성 천식과 관련한 호산구의 역할에 대한 많은 실험과 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

목적 : 운동 중 과호흡으로 인해 기도 내에 열과 수분이 손실되어 기도 내의 삼투압이 높아지게 되고, 이로써 여러 세포들이 염증 매개체를 유리함으로써 운동 유발성 천식을 일으킨다고 추정하고 있다. 이에 본 연구에서는 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하는 호산구에 고삼투압으로 자극시킨 후 호산구의 활성화 여부를 알아보고자 하였다.

방법 : 호산구 세포주인 EoL-1 세포에 각각의 삼투질 농도와 시간에 따른 superoxide anion의 생성을 측정하였고, EoL-1 세포에 15분 동안 고삼투압 자극(930 mOsm/kg H₂O)을 준 직후와 이후 등장성 배지에 옮겨 5시간 동안 배양 후 유세포 분석기를 이용하여 호산구 표면의 CD69와 ICAM-1의 발현을 측정하였고, 배양 상층액에서 ECP 농도를 측정하였다.

결과 : EoL-1 세포에 15분간 고삼투압 자극을 준 직후 측정된 ECP 농도와 CD69 및 ICAM-1의 fluorescent intensity는 등장성 배지에 노출시켰을 경우와 비교하여 차이를 보이지 않았으며, 고삼투압 자극 후 등장성 배지에 5시간 동안 배양하였을 때에도 유의한 차이를 보이지 않았다. Superoxide anion의 생성에 있어서도 다양한 삼투질 농도에 따른 차이를 보이지 않았으며, 시간의 경과에도 차이를 보이지 않았다.

결론 : 이번 연구에서는 운동 후 발생하는 기관지 수축의 조기 반응과 후기 반응과 관련하여 고삼투압 자극에 의한 호산구의 활성화를 관찰할 수 없었으나, 향후 연구에 있어 운동 유발성 천식과 관련한 호산구의 역할에 대한 많은 실험과 연구가 필요하리라 사료된다.

References

- 1) Mahler DA. Exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:554-61.
- 2) Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is... *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:453-9.
- 3) Anderson SD, Argyros GJ, Magnussen H, Holzer K. Provocation by eucapnic voluntary hyperpnoea to identify exercise induced bronchoconstriction. *Br J Sports Med* 2001; 35:344-7.

- 4) Storms WW. Review of exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1464-70.
- 5) Deal EC Jr, McFadden ER Jr, Ingram RH Jr, Strauss RH, Jaeger JJ. Role of respiratory heat exchange in production of exercise-induced asthma. *J Appl Physiol* 1979;46:467-75.
- 6) McFadden ER Jr, Nelson JA, Skowronski ME, Lenner KA. Thermally induced asthma and airway drying. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:221-6.
- 7) Massie J. Exercise-induced asthma in children. *Paediatr Drugs* 2002;4:267-78.
- 8) Sohn MH, Lee YA, Jeong KY, Sim SB, Kim KE, Yong TS, Shin MH. German cockroach extract induces activation of human eosinophils to release cytotoxic inflammatory mediators. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;134:141-9.
- 9) Westerhof F, Timens W, van Oosten A, Zuidhof AB, Nauta N, Schuling M, et al. Inflammatory cell distribution in guinea pig airways and its relationship to airway reactivity. *Mediators Inflamm* 2001;10:143-54.
- 10) Walsh GM. Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *Br J Haematol* 1997;97:701-9.
- 11) Anderson SD, Schoeffel RE, Follet R, Perry CP, Daviskas E, Kendall M. Sensitivity to heat and water loss at rest and during exercise in asthmatic patients. *Eur J Respir Dis* 1982;63:459-71.
- 12) Freed AN. Models and mechanisms of exercise-induced asthma. *Eur Respir J* 1995;8:1770-85.
- 13) Speelberg B, van den Berg NJ, Oosthoek CH, Verhoeff NP, van den Brink WT. Immediate and late asthmatic responses induced by exercise in patients with reversible airflow limitation. *Eur Respir J* 1989;2:402-8.
- 14) Chhabra SK, Ojha UC. Late asthmatic response in exercise-induced asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 80:323-7.
- 15) Crimi E, Balbo A, Milanese M, Miadonna A, Rossi GA, Brusasco V. Airway inflammation and occurrence of delayed bronchoconstriction in exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:507-12.
- 16) Freed AN, Adkinson NF Jr. Dry air-induced late phase responses in the canine lung periphery. *Eur Respir J* 1990; 3:434-40.
- 17) Iikura Y, Inui H, Nagakura T, Lee TH. Factors predisposing to exercise-induced late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:285-9.
- 18) Speelberg B, Verhoeff NP, van den Berg NJ, Oosthoek CH, van Herwaarden CL, Buijnzeel PL. Nedocromil sodium inhibits the early and late asthmatic response to exercise. *Eur Respir J* 1992;5:430-7.
- 19) Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Schleimer RP, Lichtenstein LM. Interaction between hyperosmolar and IgE-mediated histamine release from basophils and mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:86-91.
- 20) Anderson SD, Daviskas E. The airway microvasculature and exercise induced asthma. *Thorax* 1992;47:748-52.
- 21) Findlay SR, Dvorak AM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Hyperosmolar triggering of histamine release from human basophils. *J Clin Invest* 1981;67:1604-13.
- 22) Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Proud D, Adkinson NF Jr, Lichtenstein LM. Disassociation of the release of histamine and arachidonic acid metabolites from osmotically activated basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:960-4.
- 23) Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. A comparison of the osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1043-8.
- 24) Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:634-40.
- 25) Otani K, Kanazawa H, Fujiwara H, Hirata K, Fujimoto S, Yoshikawa J. Determinants of the severity of exercise-induced bronchoconstriction in patients with asthma. *J Asthma* 2004;41:271-8.
- 26) Yoshikawa T, Shoji S, Fujii T, Kanazawa H, Kudoh S, Hirata K, et al. Severity of exercise-induced bronchoconstriction is related to airway eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Eur Respir J* 1998;12:879-84.
- 27) Koh YI, Choi S. Blood eosinophil counts for the prediction of the severity of exercise-induced bronchospasm in asthma. *Respir Med* 2002;96:120-5.
- 28) Gauvreau GM, Ronnen GM, Watson RM, O'Byrne PM. Exercise-induced bronchoconstriction does not cause eosinophilic airway inflammation or airway hyperresponsiveness in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1302-7.
- 29) Wong CK, Ho CY, Lam CW, Zhang JP, Hjelm NM. Differentiation of a human eosinophilic leukemic cell line, EoL-1: characterization by the expression of cytokine receptors, adhesion molecules, CD95 and eosinophilic cationic protein(ECP). *Immunol Lett* 1999;68:317-23.
- 30) Mayumi M. EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk Lymphoma* 1992;7:243-50.
- 31) Tang ML, Fiscus LC. Important roles for L-selectin and ICAM-1 in the development of allergic airway inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:203-10.
- 32) Czech W, Krutmann J, Budnik A, Schopf E, Kapp A. Induction of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 1993;100:417-23.
- 33) Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993;80:281-6.
- 34) Matsumoto K, Appiah-Pippim J, Schleimer RP, Bickel CA, Beck LA, Bochner BS. CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:860-6.
- 35) Julius P, Luttmann W, Knoechel B, Kroegel C, Matthys H, Virchow JC Jr. CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur Respir J* 1999;13:1253-9.