

일차배양 햄스터 기관표면 상피세포에 대한 양이온성 폴리아민의 무독성 효과

이충재 · 고광호*
서울대학교 약학대학

Non-cytotoxic Effects of Cationic Polyamines on Cultured Hamster Tracheal Surface Epithelial (HTSE) Cells

Choong Jae LEE and Kwang Ho KO*
College of Pharmacy, Seoul National University

(Received November 3, 1997; accepted November 22, 1997)

Abstract—In the present study, we intended to investigate whether cationic polyamines including poly-L-lysine (PLL) and poly-L-arginine (PLA) induce cytotoxicities to cultured hamster tracheal surface epithelial (HTSE) cells. Confluent HTSE cells were chased for 30 min in the presence of PLL or PLA of different molecular weights. Possible cytotoxicities of PLL or PLA were assessed by measuring both Lactate Dehydrogenase (LDH) release during treatment and the number of floating cells after treatment and by checking the possible changes on the morphology of HTSE cells during treatment. The results were as follows: in the case of treatment of PLL or PLA of which molecular weight is about 78,000 and 92,000, respectively, (1) there was significant release of LDH during treatment, (2) the number of floating cells were significantly increased after treatment and (3) there were significant changes on the morphology of cultured HTSE cells. However, in the case of PLL or PLA of which molecular weight is under 10,000 (about 9,600 and 8,900, respectively), no significant signs of cytotoxicities mentioned above were detected. We found that cationic polyamines might be non-toxic under specific range of molecular weights and suggest that the cytotoxicity of cationic polyamine might depend on the molecular sizes of each cationic polyamine.

Keywords □ HTSE cells, PLL, PLA, Non-cytotoxicity

천식(asthma)은 기도 과민반응, 점액 과다분비, 기도의 염증 등을 특징으로 하는 폐쇄성 호흡기 질환으로 정의된다(Ellis, 1985). 천식환자의 기도에서 관찰되는 병리학적 소견으로는 기도 상피의 탈락, 기도 평활근의 비후, 점액분비세포의 증식, 혈관확장, 점막과 점막하의 부종, 호산성구의 침윤(Antic and Macklem, 1976) 등이 있다. 이중에서도 호산성구(eosinophil)의 기도내 침윤은 천식의 주요한 악화요인으로 추정되어 왔으며, 천식환자의 혈중, 호흡기 세척액 내 및 객담중의 호산성구 증다증(hypereosinophilia)은 천식환자에서 관찰되는 현저한 특징(Wardaw et al., 1988; Gleich et al., 1988)이고, 천식성 기도 과민반응 발작에 있어서도 중요한 역할을 할 것으로 제시된 바 있다(Frigas et al., 1981; Gleich, 1990). 호산성구는 세포질에 염기성을 나타내는 과립을 함유하고 있으며, 과립내에는 major basic protein of

eosinophil(MBP), eosinophil peroxidase(EPO)와 같은 염기성 단백질이 존재(Gleich, 1990)한다. 이 단백질들은 호흡기계에 독성을 나타내는 것으로 보고되어 왔는데, 구체적으로 기도 과민반응(Coyle et al., 1993)을 포함하여, 기도 상피세포의 부종, 박리 등(Frigas et al., 1980; Frigas et al., 1981; Motogima et al., 1989)이 보고되어 있다. MBP와 EPO는 등전점(isoelectric point)이 각각 10 이상이라고 보고(Gleich, 1990)되어 있으며, 양전하를 다량 보유하고 있는 폴리양이온성 펩티드인데, 이는 그 구성 아미노산중 양이온성 아미노산인 arginine이나 lysine residue 때문임이 확인(Wasmoen et al., 1988; Gleich et al., 1992)되어 있다. 다수의 연구자들은 MBP나 EPO의 작용이 그 특징적인 양이온성 때문이라는 점에 착안, lysine의 homopolymer인 PLL과 arginine의 homopolymer인 PLA와 같은 양이온성 폴리아민을 이용, 이들 물질의 호흡기계에 대한 작용을 연구해 왔다(Coyle et al., 1993; Hammes and Singh, 1994; Singh et al.,

* To whom correspondence should be addressed.

1992; Uchida et al., 1993). 그러나, 지금까지 수행된 실험들은 호흡기 organ culture(Frigas et al., 1980; Motogima et al., 1989), cell line(Ayars et al., 1985), in vivo system(Coyle et al., 1993; Uchida et al., 1993)을 대상으로 수행되었는데, organ culture는 배양 system 자체의 불안정성, 주위 조직의 혼입, 배양기간중 세포의 지속적 형태 변화 등(Niles et al., 1986)의 단점이 있으며, cell line은 in vivo상의 호흡기 세포들의 거동을 반영하는데 있어서 문제점이 있을 수 있다. 그러므로, 이러한 단점들을 보완하여, 좀더 in vivo 상태에 유사하면서도, in vivo에서 개재되는 신경계 혹은 전신 반응등의 요소가 배제되어 호흡기 세포의 거동만을 비교적 정확히 평가할 수 있는 일차배양 기도상피세포를 대상으로, 앞서 언급한 양이온성 폴리알민인 독성유발 여부를 규명할 필요성이 대두되는 것이다. 다수의 기도상피세포 일차배양법이 여러 동물을 이용, 개발되어 왔으나, 그중에서도 햄스터 기관표면 상피세포(Hamster Tracheal Surface Epithelial (HTSE) cell) 배양법이 생화학적, 형태학적으로 특성이 잘 규명되어 있다(Kim et al., 1985). 또한, 폴리알민이온성 자체가 독성유발의 원인일수 있다면, 각 양이온성 폴리알민 분자의 중합도, 즉 분자의 크기에 따라서 독성유발 현상에 어떤 차이점이 존재할 가능성도 있는 것이다.

따라서, 본 연구에서는 호산성구 단백질중 EPO의 분자량과 유사한 분자량 78,000의 PLL 및 분자량 92,000의 PLA와, MBP의 분자량과 유사한 분자량 9,600의 PLL 및 분자량 8,900의 PLA를 대상으로, 이들 물질의 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포에 대한 독성유발 여부를 파악, 기존의 가설에 따라 폴리알민이온성 물질이 천식과 같은 호흡기 질환을 악화시키는 요인으로 작용하는지 혹은 그렇지 않은지 여부를 검증해 보고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위해, 8-10 주령의 음성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 사육 및 수입업체인 해운무역에서 공급받았다. 동물이 실험실에 도착한 후 2-3일간 실험실 환경에 순화시키고, 순화기간중 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)(mw 78,000), poly-L-lysine (PLL)(mw 9,600), poly-L-arginine (PLA)(mw 92,000), poly-L-arginine (PLA)(mw 8,900), pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), trypsin-EDTA, LDH

assay kit (LD-L 10), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate 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 한번더 탈이온하여 사용하였다.

햄스터 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

햄스터의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험 방법은 Kim 등의 방법(Kim et al., 1985; Kim et al., 1989)을 사용하였다. 8내지 10주령의 음성 햄스터를 이산화탄소로 질식사시켜, 기관을 무균상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca^{++} , Mg^{++} free Minimum Essential Medium에 용해시킨 0.1% pronase를 기관강내에 주입하고, 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 16시간 후, 기관강 내용물을 세척 및 수거하고, 10% fetal bovine serum을 함유하는 MEM내에서 $200 \times g$ 로 원심분리함으로써 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 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 M199의 1:1 혼합 배양액에 재현탁시켰다. 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.

양이온성 폴리알민 처리시 배양세포로부터 유리되는 젖산 탈수소효소 (LDH) 활성 측정

최종농도 0.01-1 μM 의 PLL 78,000 또는 PLA 92,000 및 0.1-10 μM 의 PLL 9,600 또는 PLA 8,900을 함유하는 Ca^{++} , Mg^{++} -free Phosphate-buffered saline(PBS)을 culture plate의 각 well마다 200 μl 씩 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 및 기타 잔사를 제거하고, 50 μl 의 상등액을 젖산탈수소효소 활성측정(LDH activity assay)에 사용했다. LDH 활성 측정은 commercial kit (Sigma, LD-L 10)을 이용하였다. 50 μl 의 배양상등액을 assay kit의 reaction mixture와 혼합하고 340 nm에서의 경시

적 흡광도 증가치를 UV-spectrophotometer로 측정, LDH 활성도를 계산하였다.

양이온성 폴리아민 처리 24시간후 배양세포의 culture matrix로 부터 박리된 부유세포수의 측정

최종농도 1 μ M의 PLL 78,000 또는 PLA 92,000 및 10 μ M의 PLL 9,600 또는 PLA 8,900을 함유하는 PBS를 culture plate의 각 well마다 200 μ l씩 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하고, PBS로 배양세포를 2회 세척한 뒤, 신선한 배양액을 다시 가하고, 24시간동안 재배양하였다. 24시간이 지나서 배양액을 수거하고, 수거된 배양액을 4°C에서 200×g로 5분간 원심분리함으로써 부유세포를 침강시켰다. 상등액을 제거 한뒤 침강된 세포에 37°C에서 10분간 0.02% trypsin과 0.5% EDTA를 처리하여 세포들을 단리시켰고, hemacytometer를 이용, 세포의 수를 측정하였다.

양이온성 폴리아민 처리 직후 배양세포의 형태학적 변화

최종농도 1 μ M의 PLL 78,000 또는 PLA 92,000 및 10 μ M의 PLL 9,600 또는 PLA 8,900을 함유하는 PBS를 culture plate의 각 well마다 200 μ l씩 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하고 대조세포 및 양이온성 폴리아민 처리세포의 외형에 유발된 변화를 광학현미경으로 관찰한 후 사진촬영하여, 비교하였다.

결과 및 고찰

세포막이 손상되면 그 세포는 완전성과 정상기능을 상실한다. 세포질내에 존재하는 효소인 LDH는 유해물질 혹은 유해한 세포외 환경으로 인한 세포막의 손상에 의해 세포외로 유리될 수 있으며, 세포독성 측정시 흔히 이용되는 try-

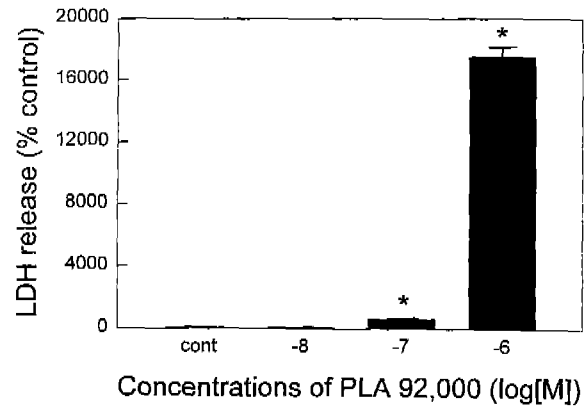


Fig. 2. Effect of poly-L-arginine (PLA) 92,000 on LDH release from cultured airway goblet cells. Confluent HTSE cells were treated with various concentrations of PLA 92,000 for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E. from 4 culture wells. *Significantly different from control(p<0.05).

pan blue exclusion viability assay는 종종 배양세포의 생존율을 과대측정하는 경향이 있다(Freshney, 1994; Yu et al., 1994)고 한다. 따라서 본 연구에서는 양이온성 폴리아민 처리에 의한 LDH유리를 세포막 손상의 한 지표로 채택하였다. Elferink는, 분자량 80,000을 상회하는 양이온성 폴리아민을 처리시 호중성구로부터 상당량의 LDH가 유리됨을 보고(Elferink, 1991)하였다. 이러한 보고와 유사하게, 본 연구에서도, 분자량 78,000 정도의 PLL는 1 μ M 처리시 대조군의 25배에 해당하는 양의 LDH 유리됨(Fig. 1), 분자량 92,000정도의 PLA는 대조군의 170배에 해당하는 LDH 유리를 일으켰으나(Fig. 2), 분자량 9,600의 PLL(Fig. 3)과 분자

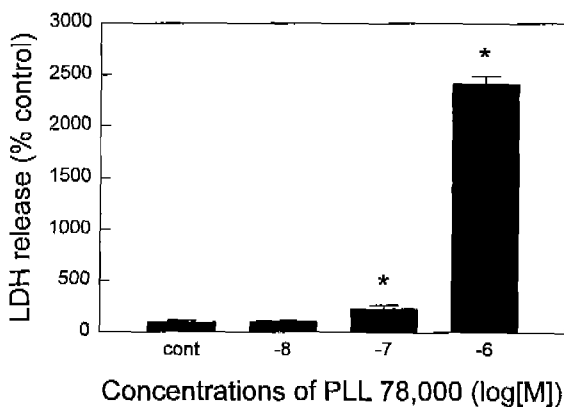


Fig. 1. Effect of poly-L-lysine (PLL) 78,000 on LDH release from cultured airway goblet cells. Confluent HTSE cells were treated with various concentrations of PLL 78,000 for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E. from 4 culture wells. *Significantly different from control(p<0.05).

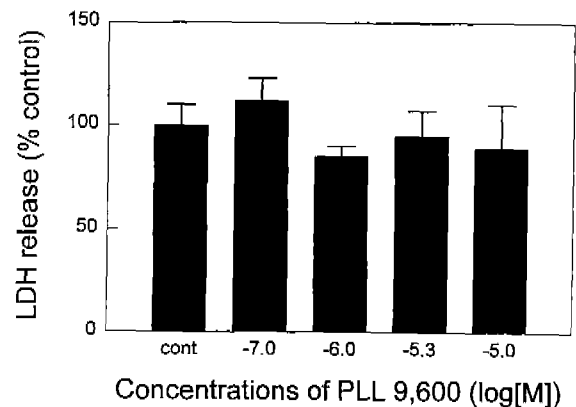


Fig. 3. Effect of poly-L-lysine (PLL) 9,600 on LDH release from cultured airway goblet cells. Confluent HTSE cells were treated with various concentrations of PLL 9,600 for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E. from 3 or 4 culture wells.

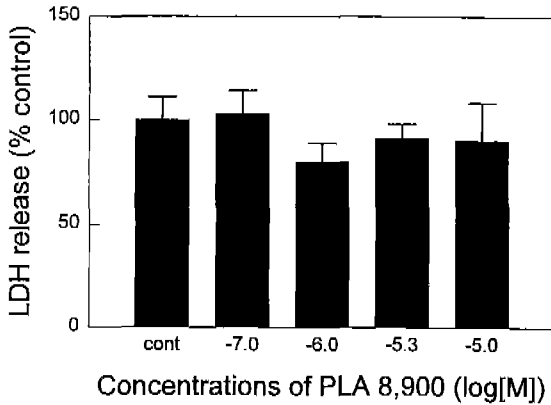


Fig. 4. Effect of poly-L-arginine (PLA) 8,900 on LDH release from cultured airway goblet cells. Confluent HTSE cells were treated with various concentrations of PLA 8,900 for 30 min and supernatants were collected for LDH activity assay at the end of the treatment. Each bar represents a mean \pm S.E. from 3 or 4 culture wells.

량 8,900의 PLA(Fig. 4)는 대조군과 비교시 LDH 유리를 유의성있게 증가시키지 않았다. 이러한 결과는, 분자량 80,000-90,000 정도의 양이온성 폴리아민은 호흡기 세포의 세포막에 손상을 주어 세포의 정상기능을 저해할 가능성이 있으나, 분자량이 10,000 정도로 감소하면 그러한 세포독성의 유발 가능성이 소실됨을 의미하는 것이다.

양이온성 폴리아민이 배양된 기관상피세포에 대해 나타낼 수 있는 독성의 또다른 지표로서, 양이온성 폴리아민 처리 이후 24시간 동안에 culture matrix로부터 박리되어 배양액 표면으로 부유되는 세포수를 측정할 수 있다. 이 현상은 천식환자에게서 관찰되는 기도상피세포의 박리와 유사한 현상(Frigas et al., 1980; Frigas et al., 1981; Motogima et al., 1989)으로 볼 수 있다. 기도상피세포의 박리는 곧 기도과민반응을 유발할 수 있는데, 이 현상은, in vivo에서 상피세포층이 제거된 경우 기도수축 유발물질에 대한 기도 평활근의 반응성이 증가된다는 연구결과(Gleich, 1990)에서도 확인된다. 또한, 이러한 폴리양이온성 물질이 기도상피세포에서 유래하는 epithelial-derived constricting factor를 유리시키거나, relaxing factor를 억제하여 기도과민반응에 관여한다는 보고(Brofman et al., 1989)도 있으나 그러한 결과를 입증하기 위해서는 더 많은 연구와 실험적 증거가 요구되는 실정이다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼, 1 μ M의 PLL 78,000 또는 PLA 92,000 및 10 μ M의 PLL 9,600 또는 PLA 8,900을 처리시, PLL 78,000 및 PLA 92,000의 경우 culture matrix로부터 박리된 부유세포수가 대조군의 110배-170배 정도였지만, PLL 9,600 및 PLA 8,900의 경우에는 대조군과 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다(Fig. 5 and Fig. 6). 이 결과 역시, matrix에 부착되어 고유의 기능을 수행하는 호흡기 세포의 생리작용이 분자량 80,000-90,000 정도의 양

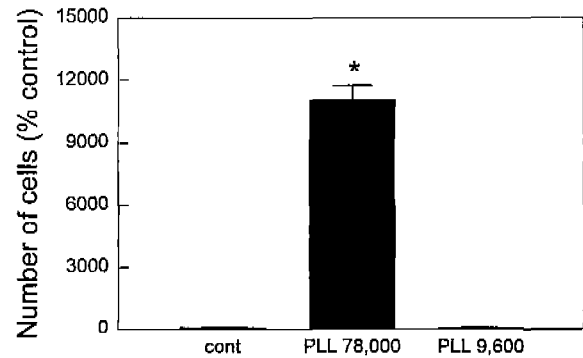


Fig. 5. Effect of poly-L-lysine (PLL) 78,000 or poly-L-lysine (PLL) 9,600 on the number of floating cells. Confluent HTSE cells were treated with 10^{-6} M of PLL 78,000 or 10^{-5} M of PLL 9,600 for 30 min. At the end of the treatment, cultures were washed extensively with PBS and reincubated with fresh complete medium for 24 hr. And then, the number of floating cells in spent media was counted as described in Methods. Each bar represents a mean \pm S.E. from 4 culture wells. *Significantly different from control($p < 0.05$).

이온성 폴리아민에 의해서는 저해될 수 있으나, 분자량이 9,600정도에 이르면 저해작용이 소실될 수 있다는 점을 시사하는 것이다.

양이온성 폴리아민에 의한 세포독성의 세번째 지표로서, 양이온성 폴리아민 처리 직후 배양세포의 외형에 생기는 형태학적 변화가 채택될 수 있다. Fig. 7과 Fig. 8에서 볼 수 있는 것처럼, 대조배양세포와 비교시, 1 μ M의 PLL 78,000 또는 PLA 92,000 처리에 의해 배양세포의 외형에는 현저한 변화가 초래되었다. 광학현미경하에서 관찰할 때, 작고, 촘촘하고, 균일하게 분포되어 있으며, 밝아 보이는 분비성

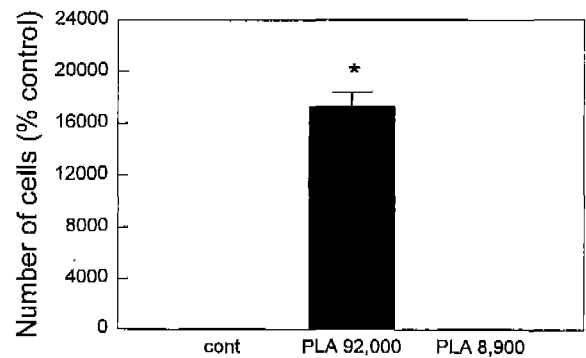


Fig. 6. Effect of poly-L-arginine (PLA) 92,000 or poly-L-arginine (PLA) 8,900 on the number of floating cells. Confluent HTSE cells were treated with 10^{-6} M of PLA 92,000 or 10^{-5} M of PLA 8,900 for 30 min. At the end of the treatment, cultures were washed extensively with PBS and reincubated with fresh complete medium for 24 hr. And then, the number of floating cells in spent media was counted as described in Methods. Each bar represents a mean \pm S.E. from 4 culture wells. *Significantly different from control($p < 0.05$).

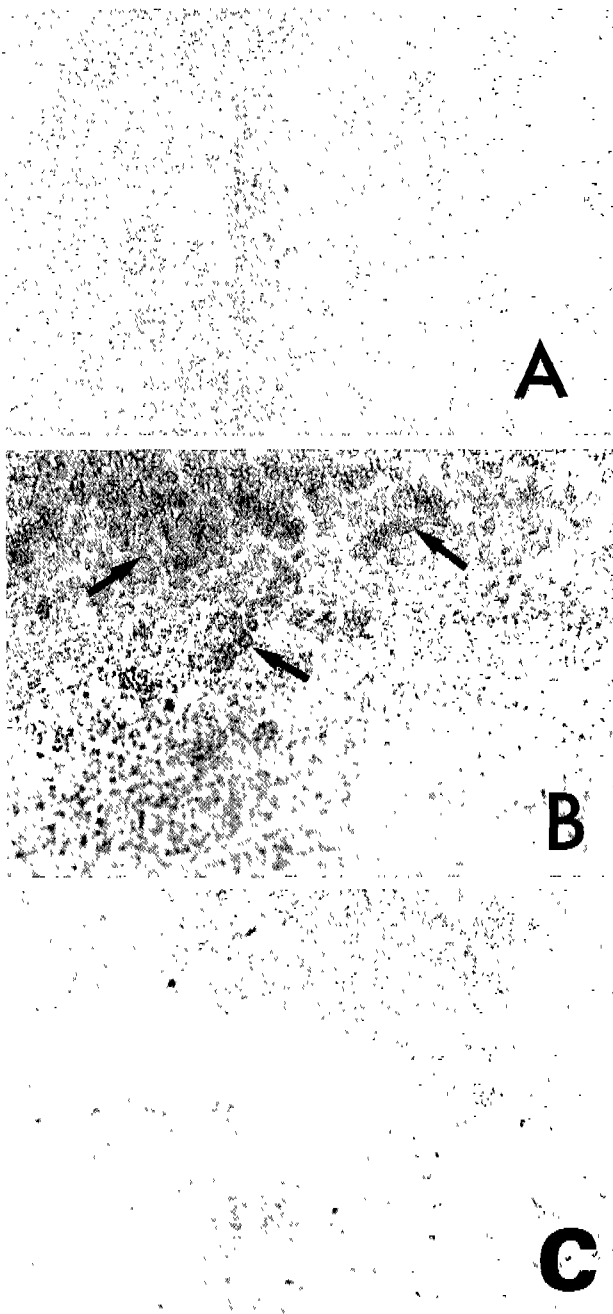


Fig. 7. Effect of poly-L-lysine (PLL) 78,000 or poly-L-lysine (PLL) 9,600 on the morphology of cultured cells. Confluent HTSE cells were treated with 10^{-6} M of PLL 78,000 or 10^{-5} M of PLL 9,600 for 30 min. At the end of the treatment, cultured cells were observed under light microscope. Significant changes on the morphology of the cultured cells were detected as described in Results and Discussions (A; Control, B; PLL 78,000, C; PLL 9,600).

세포의 전형적 외형(Wasano *et al.*, 1988)이, 무리지어지고, 기질로부터 박리 및 괴사의 징후를 보이는 외형으로 변화됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과 역시, 분자량 80,000-

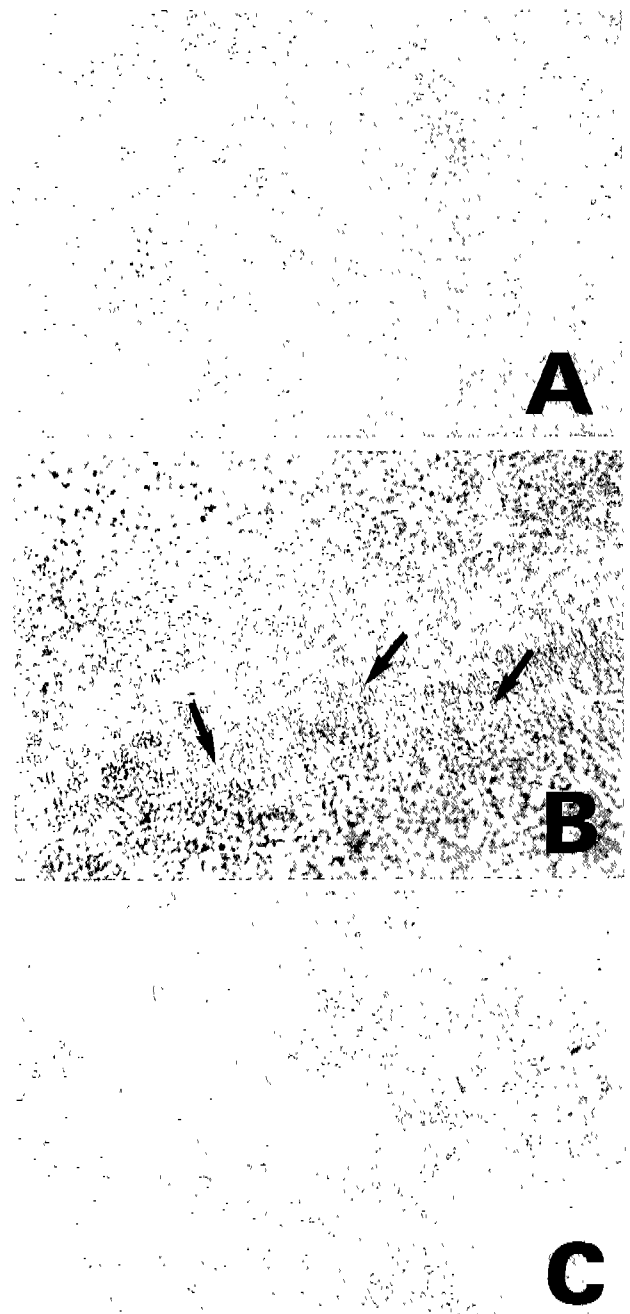


Fig. 8. Effect of poly-L-arginine (PLA) 92,000 or poly-L-arginine (PLA) 8,900 on the morphology of cultured cells. Confluent HTSE cells were treated with 10^{-6} M of PLA 92,000 or 10^{-5} M of PLA 8,900 for 30 min. At the end of the treatment, cultured cells were observed under light microscope. Significant changes on the morphology of the cultured cells were detected as described in Results and Discussions (A; Control, B; PLA 92,000, C; PLA 8,900).

90,000의 양이온성 폴리아민이 호흡기 세포의 정상적 구조에 변형을 일으켜 그 기능에도 영향을 줄 가능성을 시사하는 것이다. 그러나, $10 \mu\text{M}$ 의 PLL 9,600 또는 PLA 8,900을

처리시에는 앞의 두 결과에서와 마찬가지로, 대조배양세포와 비교시 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서, 분자량 80,000-90,000정도의 양이온성 폴리아민은 일차배양된 기도상피세포에 대해서도 현저한 세포독성을 유발함을 확인할 수 있으나, 기존의 보고들 (Coyle et al., 1993; Frigas et al., 1980; Frigas et al., 1981; Motogima et al., 1989)에서와는 다르게, 그 분자량이 일정 정도 이하(약 10,000 이하)로 감소시에는 세포독성이 유발되지 않음을 발견하게 되었다. 이러한 발견은, EPO나 MBP 같은 폴리양이온성 물질이 천식 등의 호흡기 질환을 악화시키는 요인이 아니라, 기도 과민반응 등의 병리현상을 억제 혹은 방어하는 요인일 가능성도 배제할 수 없게 하는 실험적 증거라 할수 있을 것이며, 현재 본 연구자들은 이러한 현상에 개재된 세포생리적 기전을 규명할 목적으로 후속 실험을 진행중이다.

참고문헌

- Antic, R. and Macklem, P. T. (1976). The influence of clinical factors on site of airway obstruction in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 114, 851-859.
- Ayars, G. H., Altman, L. C., Gleich, G. J., Loegering, D. A. and Baker, C. B. (1985). Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 595-604.
- Brofman, J. D., White, S. R., Blake, J. S., Munoz, N. M., Gleich, G. J. and Leff, A. R. (1989). Epithelial augmentation of trachealis contraction caused by major basic protein of eosinophils. *J. Appl. Physiol.* 66, 1867-1873.
- 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.
- Ellis, E. F. (1985). Asthma in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72(suppl), 526-539.
- Freshny (1994). Measurement of viability and cytotoxicity. In, *Culture of animal cells* (3rd edn), Willey-Liss, Inc., p. 288.
- 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.
- Gleich, G. J., Adolphson, C. R. and Leiferman, K. M. (1992). Eosinophils, In "Inflammation: Basic principles and clinical correlates" (2nd edn), Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R., Raven press, Ltd., New York. p 663-700.
- 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.
- 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.
- Niles, R. M., Christensen, T. G., Breuer, R., Stone, P. J. and Snider, G. L. (1986) Serine proteases stimulate mucous glycoprotein release from hamster tracheal ring organ culture. *J. Lab. Clin. Med.* 108, 489-497.
- Singh, A. K., Kasinath, B. S. and Lewis, E. J. (1992). Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1120, 337-342.
- 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.
- Wasano, K., Kim, K. C., Niles, R. M. and Brody, J. S. (1988). Membrane differentiation markers of airway epithelial secretory cells. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 167-178.
- Wasmoen, T. L., Bell, M. P., Roegering, D. A., Gleich, G. J., Prendergast, F. G. and McKean, D. J. (1988). Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J. Biol. Chem.* 263(25), 12559-12563.
- Yu, X.-Y., Schofield, B. H., Croxton, T., Takahashi, N., Gabrielson, E. W. and Spannhake, E. W. (1994). Physiologic modulation of bronchial epithelial cell barrier function by polycationic exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 188-198.