

호흡기 배상세포에서 폴리양이온성 펩티드에 의해 야기되는 뮤신유리 억제 현상의 특이성 규명

이 충 재*

삼육간호보건대학 치위생과 기초의학교실

Specificity in the Inhibition of Mucin Release from Airway Goblet Cells by Polycationic Peptides

Choong Jae Lee*

Lab of Basic Sciences, Department of Dental Hygiene, Sahmyook Nursing and Health College

(Received August 20, 2001; accepted September 22, 2001)

Abstract – In the present study, we intended to investigate whether polycationic peptides including poly-L-lysine (PLL) and poly-L-arginine (PLA) specifically inhibit the mucin release and do not affect significantly the release of the other releasable glycoproteins with less molecular weight than mucin's from cultured airway goblet 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 varying concentrations of either poly-L-arginine (PLA) or poly-L-lysine (PLL) to assess the effects on ³H-mucin release and on the total elution profile of the treated culture medium. The results were as follows : (1) PLL 78,000, PLL 9,600 and PLA 8,900 inhibited mucin release in a dose-dependent manner; (2) These polycationic peptides did not inhibit the release of the other releasable glycoproteins with less molecular weights than mucin's. We conclude that these polycationic peptides 'specifically' inhibit mucin release from airway goblet cells. This finding suggests that these polycationic peptides might be used as a specific airway mucin-regulating agent.

Key words □ Polycations, mucin, airway, epithelial, HTSE cells

폐쇄성 호흡기 질환인 천식을 앓는 환자에서 관찰되는 현저한 특징인 호산성구의 침윤(Antic and Macklem, 1976; Wardaw *et al.*, 1988; Gleich *et al.*, 1988) 및 호산성구 증다증은 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, 과립 내에는 major basic protein of eosinophil(MBP), eosinophil peroxidase(EPO)와 같은 염기성 단백질이 존재(Gleich, 1990)한다. 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 arginine

의 homopolymer인 PLA와 같은 폴리양이온성 펩티드를 이용, 이들 물질의 호흡기계에 대한 작용을 연구해 왔다(Coyle *et al.*, 1993; Hammes and Singh, 1994; Singh *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 1993). 이 단백질들은 호흡계에 대해 과민반응(Coyle *et al.*, 1993)을 포함하여, 기도 상피세포의 부종, 락리 등(Frigas *et al.*, 1980; Frigas *et al.*, 1981; Motogima *et al.*, 1989)의 독성 작용을 야기하는 것으로 보고되어 왔다. 최근, poly-L-lysine(PLL) 혹은 poly-L-arginine(PLA)과 같은 polycationic peptides가 기도 배상세포에 세포독성을 나타내지 않으면서도 배상세포로부터의 뮤신분비를 억제하는데, 그 억제 현상은 이러한 물질이 보유하고 있는 다량의 양전하에 기인한다는 실험 결과가 보고되었다(Ko *et al.*, 1999). 이러한 보고는, 기존의 연구 결과에 근거한 추정과는 반대의 결과를 나타내고 있을 뿐 아니라, 폴리양이온성 펩티드가 호흡기 뮤신의 유리를 억제한다면, 대다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 호흡기 점액 과다분비를 조절할 수 있는 신물질로서 계속연구될 필요성을 제시하고 있는 것이다. 이 문적으로, 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 점액 과다분비

*To whom correspondence should be addressed.

로 인한 과량의 점액을 기도로부터 제거하는 데는 두 가지 방법이 있을 수 있다. 첫째, 물리적 방법에 의한 점액의 제거, 즉 점액의 점도를 낮춘 뒤 흡인해내는 방법이고, 둘째는, 점액 생성 자체를 억제할 수 있는 약물의 투여이다. 물리적 방법은 기도 내부의 자극을 유발하고, 반사기전에 의해 점액 분비를 오히려 자극하게 된다. 마취 하에서 그런 방법이 시도된다고 해도, 점액의 제거는 feedback mechanism을 통해 점액의 생성과 분비를 더욱더 자극하게 된다. 그러므로 물리적 방법은 점액 과다분비로 고생하는 환자에게 있어 효율적인 방법은 아닌 것으로 평가할 수 있다. 또한 현재까지, 호흡기 점액의 생성 자체를 억제할 수 있는 약물의 발견에 대한 보고는 없었다. 따라서, 호흡기 점액에 점조성을 부여하는 주 구성요소인 유신의 유리(분비)를 억제하기 위한 약물학적 접근은 그러한 환자에게서 호흡기 점액 분비를 조절하여, 기도질환의 치료에 기여함에 있어 중요한 방향이 될 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 다양한 농도의 분자량 78,000의 PLL, 분자량 9,600의 PLL 및 분자량 8,900의 PLA를 대상으로, 이들 물질이 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포로부터의 유신유리에 미치는 영향을 확인하고, 이러한 유신유리 억제 현상에 특이성이 존재하는지의 여부, 즉 이러한 물질이 호흡기 배상세포에서 분비되는 모든 종류의 분비성 당단백질에 대해 비특이적인 유리 억제작용을 발현하는지, 혹은 유신과 같은 거대 당단백질의 유리에만 억제 작용을 발현하는지의 여부를 검증하여, 이러한 물질이 호흡기 점액분비에 대한 특이한 분비 조절물질로 작용할 가능성이 있는지를 알아보려고 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

일차배양 기관표면 상피세포를 얻기 위해, 8주령의 웅성 Golden Syrian 햄스터를 실험동물 사육 및 수입업체인 해은 무역에서 공급받았다. 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)(mw 78,000), poly-L-lysine(PLL)(mw 9,600), 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, 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 한 번 더 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 웅성 햄스터를 이산화탄소로 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% fetal bovine serum을 함유하는 MEM내에서 200×g로 원심분리 함으로써 수거한 세포를 2회 세척했다. 세척된 cell pellets는 insulin(5 µg/ml), transferrin(5 µg/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 µg/ml), Gentamicin(50 µg/ml) 등이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DME)과 M199의 1:1 혼합 배양액에 재현탁 시켰다. vitrogen 100을 이용하여 준비된 두꺼운 collagen gel(0.15 ml/cm²)이 도포된 24 well plate에 세포를 10⁴ 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.

유신의 대사적 방사선 표지

Kim 등(Kim *et al.*, 1985)의 방법을 이용하였는데, 배양 세포중의 유신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5×10⁵ cells/well)에, 10 µCi/ml의 [6-³H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200 µl씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)되었다.

폴리양이온성 펩티드의 처리

24시간 동안의 대사적 방사선 표지가 완결된 후 배양액(pretreatment sample, 이하 PT로 약칭)을 수거해 두었다. 배양세포에 well당 0.5 ml의 Dulbecco's Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포

의 잔사 등을 제거한 뒤 최종농도 1 μM 혹은 10 μM 의 PLL 또는 PLA를 함유하는 PBS를 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액을 수거하여, treatment sample(이하 T sample)로 정의하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 방사성 뮤신 함량을 측정할 때까지 -70°C에서 냉동 저장하였다(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 0.1M 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 0.2M NaOH로 중화시키고 최종농도가 0.1%가 되도록 SDS 용액을 가한 뒤 2분간 끓인 다음 12,000 \times g 에서 5분간 원심분리했다. PT의 경우 원심 분리후의 상등액 50 μl 에 150 μl 의 running buffer(50 mM NaAc, 0.1% SDS, pH 7.2), 2 μl 의 10% SDS, 3 μl 의 5M NaCl을 가했고, T의 경우에는 상등액 100 μl 에 100 μl 의 running buffer, 2 μl 의 10% SDS, 3 μl 의 5M NaCl을 가한 뒤 철저히 혼합하였다. 이렇게 조제된 loading sample들을 running buffer로 평형화된 Sepharose CL-4B column(1 \times 50 cm)에 적용하였다. column은 0.336 ml/min의 유속으로 작동되었고, 한 분획의 용량은 0.42 ml로 하였다. 6 ml용량의 vial에 수거된 각 분획에 3.2 ml의 scintillation cocktail을 가하고 잘 섞은 뒤 Liquid Scintillation Counter(LKB Wallac)를 이용, 방사선량을 측정하였다. 전체 분획중 void volume peak의 4분획의 방사선량 총합을 그 sample중의 뮤신의 양으로 정의하였다. 각 culture well간에 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.

폴리양이온성 펩티드의 뮤신유리 억제작용에서의 특이성 측정

배양세포중의 뮤신은, 성숙한 배양세포(24 well plate, 5 \times 10⁵ cells/well)에, 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 [³H] glucosamine(39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을 well당 200 μl 씩 가하고 32°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지하였고, 방사선 표지가 완결된 후 spent medium은 수거해 따로 보관해 두었다. 배양세포에 well당

0.5 ml의 PBS를 가하고 세척하는 조작을 2회 반복함으로써 배양세포의 잔사 등을 제거한 뒤 최종농도 1 μM 혹은 10 μM 의 PLL 또는 PLA를 함유하는 PBS를 가하고 32°C에서 30분간 배양하였다. 30분의 배양이 끝난 뒤 반응액(T sample)을 수거하였다. 수거된 모든 sample들은 원심분리하여 부유세포 기타 잔사를 제거하고, 얻어진 T sample을 0.7 \times 50 cm 규격의 Sepharose CL-4B column에 적용하였다. 한 분획의 용량은 0.35 ml로 하였고 뮤신이 용출되는 void volume뿐만 아니라 included volume과 total bed volume이 용출될 때까지 분획을 수거하였다. 각 분획에 scintillation cocktail을 첨가한 뒤 LSC를 이용, 방사선량을 측정하였다. 대조 Sample과 각 약물의 처리가 뮤신 및 그 보다 분자량이 작은, 표지된 여타의 당단백질들의 전체 용출 양상에 미치는 영향을 비교하였다(Kim *et al.*, 1985).

통계처리

모든 측정 결과는 Mean \pm S.E.M.으로 환산된 후, 약물처리군의 측정치는 대조군 측정치의 백분율로 나타냈다. 통계 처리는 unpaired Student's t-test로 하였으며, p<0.05인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

많은 연구자들의 보고에 의하면, 다수의 내인성 혹은 외인성의 폴리양이온성 물질들은 기도 과민반응(Coyle *et al.*, 1993, Gliech *et al.*, 1988, Uchida *et al.*, 1993, Wardaw *et al.*, 1988)을 일으키거나, 상피세포막의 투과도를 증가시키는 등(Elferink, 1991, Hammes *et al.*, 1994)의 작용을 나타낸다. 이러한 보고들에 근거하여, 폴리양이온성을 보유하는 물질은 기도 상피세포로부터의 뮤신유리를 증가시키는 경향을 나타낼 것으로 추정되어 왔다. 그러나, 일차배양 햄스터 기관표면 상피세포(HTSE)에서, 폴리양이온성을 보유하는 EPO와 MBP등의 내인성 펩티드가 뮤신유리를 억제한다는 보고(Ko, 1995) 및 동일한 연구자들에 의한 최근의 보고(Ko *et al.*, 1999)는, 위에서 언급된 실험결과들에 근거한 추정과는 전혀 판이한 보고이었다. 본 연구의 결과에서도, 기존의 보고(Ko *et al.*, 1999)와 일치하는 결과, 즉, PLL 78,000은 1 μM 농도에서 뮤신유리를 90% 가량 억제하고(Fig. 1), PLL 9,600은 10 μM 농도에서 뮤신유리를 85% 가량 억제하며(Fig. 2), PLA 8,900도 10 μM 농도에서 뮤신유리를 85% 가량 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). PLL 78,000이 PLL 9,600보다 저농도에서 뮤신유리를 억제하는 이유는, 이들 물질이 보유하고 있는 양전하의 절대량과 관계가 있는 것으로 추측된다. 즉, 분자량이 증가할수록 뮤신유리 억제의 효력도 증가하는 현상을 관찰할 수 있는 것이다.

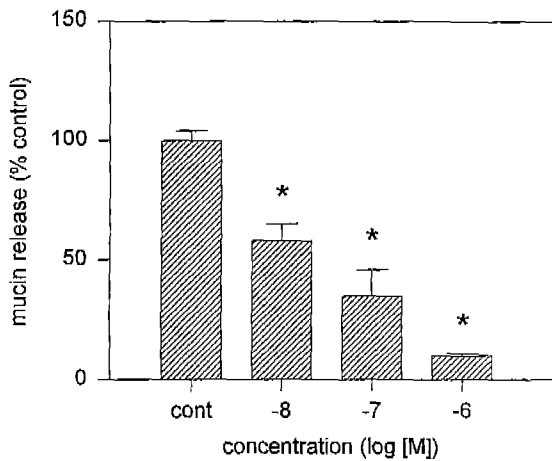


Fig. 1. Effect of PLL 78,000 on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.01~1 μ M of PLL 78,000 and the amount of 3H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*significantly different from control ($p < 0.05$).

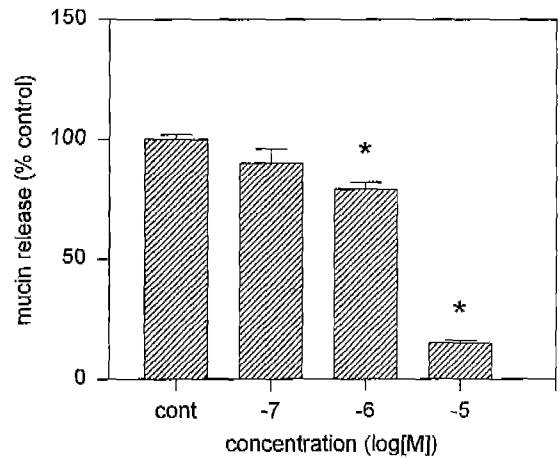


Fig. 3. Effect of PLA 8,900 on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.1~10 μ M of PLA 8,900 and the amount of 3H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*significantly different from control ($p < 0.05$).

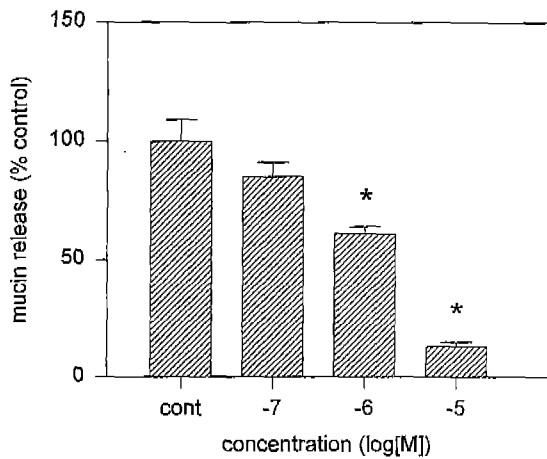


Fig. 2. Effect of PLL 9,600 on mucin release from cultured HTSE cells. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with 3H-glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of 0.1~10 μ M of PLL 9,600 and the amount of 3H-mucins in the spent media was measured. Each bar represents a mean \pm S.E.M. from 4 culture wells.
*significantly different from control ($p < 0.05$).

그러나, 이러한 물질들이 뮤신과 같은 분자량 수백만 dalton의 거대 당단백 분자의 유리(혹은 분비)에만 영향을 주는 것이 아니라, 호흡기 배상세포로부터 유리되어 아직은 확인 미상이지만 모종의 생리작용을 발현할 가능성이 있는, 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 분비될 수 있는 당단백질들의 유리에도 비특이적인 억제작용을 나타낼 가능성이 있는 것이다. 만일, 이러한 물질의 유리 억제 작용에 특이성이 없다면, 이 물질이 호흡기 뮤신 유리의 특이한

조절 물질로 이용될 가능성이 희박해짐을 의미하는 것이다. 이런 이유로, 본 연구에서는 폴리양이온성 펩티드가 거대 당단백질인 뮤신의 유리에만 특이적으로 영향을 미치는지, 혹은, 뮤신보다 분자량이 작고 구조도 다른 여타의 방사선 표지 당단백질들의 유리에도 유의성 있는 영향을 미치는지를, gel filtration chromatography에서의 전체 용출양상(total elution profile) 분석을 통해서 확인함으로써, 이러한 물질들이 뮤신의 유리를 특이적으로 억제하는지를 규명하고자 하였다. Gel filtration chromatography에서는 resin에 loading되는 혼합물중의 구성 성분들을 그 분자의 크기별로 분리한다. 따라서, 특정 혼합물을 loading한 후 void volume로부터 total volume까지, 즉 그 혼합물중 가장 큰 크기의 물질부터, 가장 작은 크기의 물질까지 용출시켜, 그 각각의 분획들을 수거하여 물질을 정량할 수 있다(Cheng *et al.*, 1981). 일차배양된 HTSE세포에 3H-glucosamine을 이용, 배양세포가 생산하는 뮤신 및 여타의 당단백질에, 방사선 표지한 후, 일정 기간 동안 세포를 배양하면, 3H-표지 당단백질들이 배양액중으로 유리된다(Kim *et al.*, 1985). 이때, 이 배양액을 Sepharose CL-4B column에 loading 하면, 3H-표지 당단백질중 분자량 수백만 dalton에 해당하는 거대분자인 뮤신으로부터, 가장 크기가 작은 3H-glucosamine까지 용출되는 특정한 용출양상(elution profile)이 나타날 것이다. 만약, 대조 배양액의 전체 용출양상을 기준으로, 폴리양이온성 펩티드를 처리했을 때 전체 용출양상(total elution profile)의 특정부분에 변화가 생겼다면, 그 변화는 특정 분자량의 3H-당단백질 유리량의 변화를 의미하는 것이다. PLL 78,000 1 μ M 처리시, PLL은 void volume, 즉, 주로

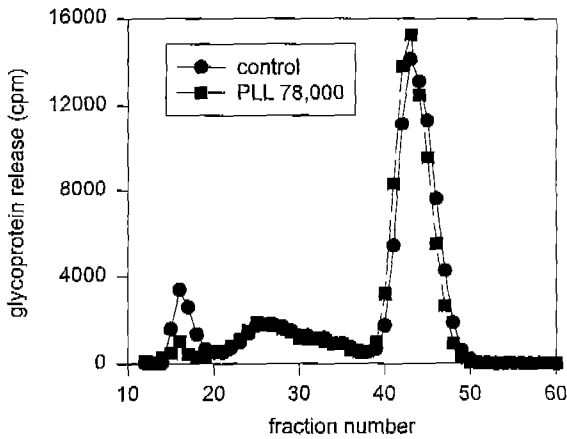


Fig. 4. Effect of PLL 78,000 on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of $1\ \mu\text{M}$ of PLL 78,000 and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed.

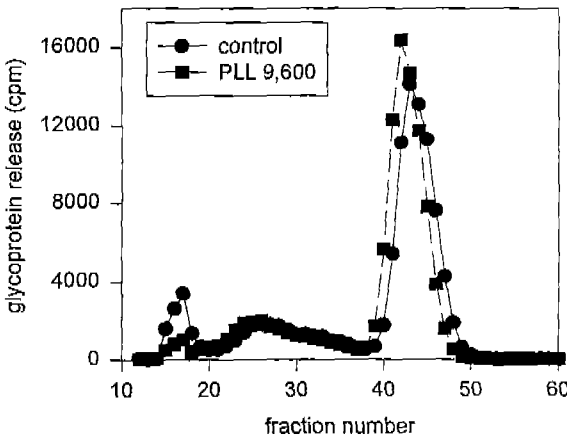


Fig. 5. Effect of PLL 9,600 on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of $10\ \mu\text{M}$ of PLL 9,600 and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed.

뮤신의 유리를 억제하며, included volume이나 total volume, 즉, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 유리에는 유의성있는 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 또한, PLL 9,600 $10\ \mu\text{M}$ 처리시에도, 주로 뮤신의 유리를 억제하며, 뮤신보다 분자량이 작은 여타의 당단백질들의 유리에는 유의성 있는 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 5), PLA 8,900 $10\ \mu\text{M}$ 처리시에도, PLL 9,600의 경우와 유사한 현상이 관찰되었다 (Fig. 6). 이러한 실험 결과로 볼 때, 폴리양이온성 펩티드는 주로 뮤신과 같

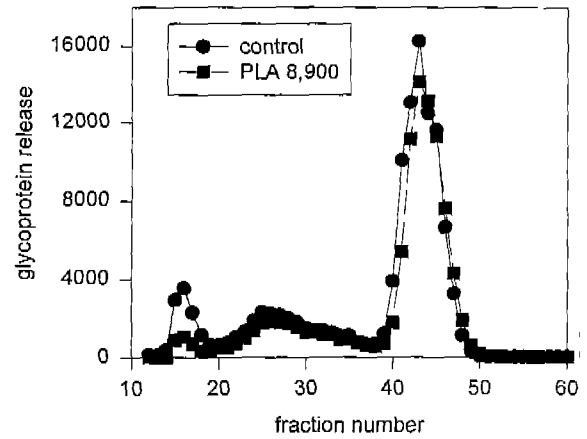


Fig. 6. Effect of PLA 8,900 on total elution profile of treatment sample through Sepharose CL-4B column. Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and chased for 30 min in the presence of $10\ \mu\text{M}$ of PLA 8,900 and total elution profiles of control spent media and treatment sample through Sepharose CL-4B column were analysed.

은 거대 당단백질의 유리를 억제하며, 그보다 분자량이 작고 구조도 다른 당단백질들의 유리에는 유의성 있는 영향이 없음을 시사하는 것이다. 이는 폴리양이온성 펩티드가 뮤신의 유리만을 특이적으로 억제하며, 따라서 다수의 호흡기 질환에서 관찰되는 병리현상인 점액 과다분비의 조절물질로서 이용될 가능성을 시사하는 실험결과라고 볼 수 있는 것이다. 현재, 본 연구자 등은 배상세포 내부에 존재하는 뮤신 함유 과립의 exocytosis 과정에 대한 폴리양이온성 물질의 영향에 주안점을 두고, 폴리양이온성 펩티드가 뮤신과 같은 거대 당단백질의 유리만을 특이적으로 억제하는 현상의 기전을 연구중이다.

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.
 Cheng, P. W., Sherman, J. M., Boat, T. E. and Bruce, M. (1981) Quantitation of radiolabeled mucous glycoproteins secreted by tracheal explants. *Anal. Biochem.* **117**, 301-306.
 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.
- 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. pp. 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.
- 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.
- 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 Biennenstock, J. (1983). Respiratory tract defense mechanism, In, textbook of pulmonary disease, Baum, G. L. and Wolinsky, E.(eds) 3rd ed., Little Brown and Company.
- 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 broncho-alveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 62-69.
- 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.