

□ 원 저 □

## Trypsin과 chymotrypsin이 호산구 화학주성 및 활성화에 미치는 효과

한림대학교 의과대학 내과학교실

이명구, 김명빈, 김진환, 윤택중, 최정은  
김동환, 모은경, 박명재, 현인규, 정기석

= Abstract =

The effect of trypsin and chymotrypsin  
on the chemotaxis and activation of eosinophil

Myung Goo Lee, M.D., Myung Bin Kim, M.D., Jin Hwan Kim, M.D., Taek Joong Yun, M.D.,  
Jeong Eun Choi, M.D., Dong Hwan Kim, M.D., Eun Kyung Mo, M.D.,  
Myung Jae Park, M.D., In Gyu Hyun, M.D. and Ki Suck Jung, M.D.

**Background** : Eosinophilic leukocytes are prominent cellular participants in the pathogenesis of allergic disease and asthma. Chemotaxis is still a very useful method in evaluating the response of human eosinophil to novel modulators. Degranulated mast cells and activated T lymphocytes are responsible for the pathophysiology of asthma and tryptase is one of most important proteases released after activation of mast cells. The purpose of this study was to investigate the actions of trypsin and chymotrypsin on eosinophils in terms of chemotaxis and activation.

**Method** : Eosinophils were isolated by negative immunoselection from the peripheral blood of atopic donors. Chemotaxis was studied by using micro-Boyden chambers and ECP release was assayed by fluorimmunoassay.

**Results** : Eosinophil showed a chemotactic response to trypsin. Maximal chemotactic response was with 1000 $\mu$ g/ml trypsin ( $56.52 \pm 14.50$ /HPF) which was comparable to PAF. But chymotrypsin showed no significant chemotactic response to eosinophils. Trypsin at the concentration of 10, 100, 1000 $\mu$ g/ml induced secretion of ECP, which at the concentration of 10 $\mu$ g/ml represented about 2.7 times of the spontaneous rate of release. Soybean protease inhibitor reduced trypsin induced ECP release.

**Conclusion** : Trypsin can induce chemotactic response to eosinophils and activation of eosinophils that can induce secretion of ECP. On the contrary, chymotrypsin showed no direct effect on eosinophils. We propose a role of trypsin on the chemotaxis and activation of eosinophils.

**Key Words** : Trypsin, Chymotrypsin, Eosinophil, Chemotaxis

본 논문의 요지는 1995년 제 81차 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표되었음.

## 서론

기관지천식에서 호산구의 역할은 최근의 여러 연구에 의하여 잘 알려져 있다. 호산구는 major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil peroxidase(EPO) 및 eosinophil derived neurotoxin(EDN) 등과 같은 세포독성 단백을 함유하고 있고<sup>1,2)</sup> ECP와 MBP는 기관지천식 환자에서 볼 수 있는 조직병리소견과 유사한 기도상피세포의 손상을 야기함이 입증되었다<sup>3)</sup>. 기관지천식환자의 폐에는 흔히 호산구의 축적이 일어나고 이는 후기 천식반응을 일으키는 환자의 기관지 폐포세척액에서 입증되어 있다<sup>4)</sup>. 혈중 호산구증다증은 천식환자의 독특한 양상이며 몇몇 연구에서 혈중 호산구증다증의 정도와 천식의 중증도 사이에 상관관계가 있음을 발표하였다<sup>5,6)</sup>. 또한 호산구 과립단백의 혈중 농도와 천식환자의 폐의 반응도간에 상관관계가 있음이 밝혀졌다<sup>7)</sup>. 기관지천식 등의 알레르기 질환을 가진 환자의 혈액과 조직에서 증가하는 호산구가 면역학적인 병인으로 작용하고 기여하는 것은 혈액보다 조직에서 특징적인 것으로 보고하여<sup>8,9)</sup>, 많은 연구들이 알레르기 질환의 조직에서 호산구가 선택적으로 축적되는 기전을 밝히기 위하여 시행되었다. 한편 호산구 뿐만 아니라 탈과립화된 비만세포와 활성화된 T 림프구가 기관지천식의 병태생리에 관계하나 호산구만이 선택적으로 이동하는 현상에 대한 자세한 기전은 불확실하다. 기관지천식환자가 정상인에 비하여 비만세포의 분포가 다르다는 증거는 없으나, 이러한 세포들의 활성화도와 염증매개물질의 분비능이 증가되어 있음은 알려져있다<sup>10)</sup>. Tryptase는 비만세포의 활성화후 분비되는 강력한 단백분해효소 중 하나로써 호산구의 화학주성과 활성화도에 영향을 미칠 것으로 생각되고 따라서 이러한 trypsin-like 호르몬인 tryptase의 연구에 앞서 대표적인 단백분해효소인 trypsin과 chymotrypsin이 호산구의 화

학주성 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는가를 규명함이 필요하게 되었다. 현재까지 알려진 바로는 호산구의 화학주성 및 활성화를 일으키는 물질로는 platelet-activating factor(PAF)와 C5a가 가장 강력하며<sup>11)</sup> 그 외에도 interleukin-2<sup>12)</sup>, interleukin-5<sup>13)</sup>, interleukin-3 및 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor<sup>14)</sup> 등이 있다.

현재까지 in vitro에서 인간의 호산구를 대상으로 trypsin, chymotrypsin에 대한 화학주성이 보고된 적은 없다. Trypsin과 chymotrypsin이 호산구와 관련된 문헌들을 고찰해보면 Bach 등<sup>15)</sup>은 기니피크의 eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis(ECF-A)의 활성화도에 trypsin 이나 chymotrypsin이 영향을 주지 않는다고 하였고, Lewis 등<sup>16)</sup>은 인간의 백혈병성 호염구에서 trypsin에 의하여 비활성화 되지 않는 ECF-A가 유리된다고 보고하였다. Tai와 Spry<sup>17)</sup>는 인간의 혈액 내 호산구의 IgG antibody-coated erythrocyte(EA)에 대한 결합능이 trypsin에 의하여 증가되는데 이는 trypsin이 호산구 막에 변화를 야기하여 증가된 결합능이 호산구가 조직 내에서 염증반응에 더욱 효율적으로 참여하도록 하는 것으로 설명하였다. Trypsin의 호산구 화학주성에 관한 몇몇 동물실험이 있으며 서로 상반된 결과를 제시하고 있다. 기니피크 피부에 Schistosoma mansoni larvae의 추출물을 주입하여 염증반응을 일으켰을 때 soybean trypsin inhibitor (SBTI)를 같이 주입한 군에서 염증반응이 약화되었는데<sup>18)</sup> 이는 trypsin이 염증반응을 촉진시키는 간접적인 증거가 됨을 보여주고 있다. 또한 rat Calcitonin Gene-Related Peptide-1(rCGRP-1)은 호산구에 대해 강한 화학주성을 가지는데 trypsin 처리후 생성물은 무손상의 펩티드보다 강한 화학주성을 가짐이 보고되었다<sup>19)</sup>. 이는 trypsin이 간접적인 역할을 하여 화학주성을 증가시킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 또한 반대되는 결과의 연구도

있는데 Ishida와 Yoshimura<sup>20)</sup>는 Angiostronylus cantonensis 어린성충의 추출물에 의해 파생된 ECF(ECF-YA)에 대한 쥐와 기니픽 호산구의 반응도연구에서 기니픽의 호산구를 trypsin으로 처리하였을 때 ECF-YA에 대한 화학주성이 현저하게 감소되었다고 하였고 이결과 기니픽 호산구는 ECF-YA와 작용하는 수용체가 있고 이 수용체는 단백질 혹은 당펩티드 분자일 가능성을 보고하였다.

Freden 등<sup>21)</sup>은 chymotrypsin-like cationic protein이 호중구와 연관되어서, 조직손상을 야기하는 ECP와 낮은 상관관계를 나타냄을 보고하였는데 반면 chymotrypsin-like protease의 억제제가 활성화된 인간의 호산구에서 유리되는 eosinophil peroxidase(EPO)를 억제함으로써, 호산구에서 chymotrypsin-like protease에 의한 단백분해 활성화가 과립으로부터 유리되는 수용체 매개성 EPO 유리과정에 어떠한 역할을 할 것이라는 보고도 있다<sup>22)</sup>. 지금까지의 연구들을 종합하면 in vitro에서 trypsin이 직접적으로 인간의 호산구의 화학주성 및 활성화에 미치는 효과에 대한 연구가 없을 뿐만 아니라 몇몇 동물실험에서는 서로 상반된 결과를 제시하고 있다. Chymotrypsin은 인간의 호산구를 대상으로 하였지만 호산구의 활성화 측면에서만 연구되었고 또한 상반된 결과를 보여주고 있다. 따라서 본연구의 목적은 단백질분해효소의 대표격인 trypsin과 chymotrypsin이 호산구의 화학주성과 활성화에 어떤 역할을 하는지 알고자 함에 있다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

알레르기 기관지천식을 가진 6명의 아토피 환자로 말초혈액 호산구가  $0.4 \times 10^9/L$  이상이고 피부단자검사서 집먼지 진드기, 고양이 인설, 풀 등을 포함하는 2가지이상의 흡입

알레르겐항원에 5mm이상 양성반응을 보이고 국소요법으로만 치료중인 안정된 상태의 환자를 대상으로 하였다.

### 2. 호산구 분리

호산구는 혼합된 과립구로부터 호중구를 제거하는 면역자기방법(negative immunomagnetic selection)으로 분리하였다<sup>23)</sup>. 50ml 주사기에 헤파린 5000단위를 넣고 혈액 50ml를 채취하며 2회 반복하였다. 6개의 Falcon 튜브로 나누어 즉시 phosphate buffered saline (PBS)/2% fetal calf serum(FCS)에 1:1로 희석시키고(15ml 혈액+15ml PBS/2% FCS) 긴 pasteur pipette을 꽂고 colloidal polyvinylpyrrolidone-coated silica(Percoll, isotonic density of 1.082g/ml, pH 7.4)을 흘려서 층을 이루게하였다. 이때 용적은 혈액+PBS/2% FCS:Percoll이 2:1이 되게하였고 1500rpm, 30분간, 20℃ 원심분리후 상청액과 단백세포층을 흡인하여 버렸다. 각 6개의 pellet은 모두 새로운 50cc Falcon tube 6개에 옮겨 담고 세포 pellet의 5배 용량의 lysis buffer (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA로 구성)를 각 튜브에 넣고 15분간 얼음통에 두고 가끔 흔들어준 후 꺼내서 1800rpm, 4℃, 10분간 원심분리 시켰다. 각 세포 pellet은 얼음통에 준비해둔 PBS/2% FCS 0.5ml을 넣어 용해하였고 이때 튜브는 하나로 만들었다. Mouse anti-human CD16 antibody(Eurogenetics, Middlesex, UK)를  $3-5 \times 10^7$  세포당 10 $\mu$ l의 비율로 가하고 30분간 얼음통에 두었다. 찬 PBS/2% FCS를 25ml가 되도록 붓고 그냥 2000rpm, 4℃, 10분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 0.5ml PBS/2% FCS를 pellet에 가해서 용해한 후 rat anti-mouse IgG antibody-microbead (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 가하고 얼음통에 20분간 두었다. 이때부터 magnetic cell sorting(MACS) col-

umn을 냉각시켰다. 즉 21게이지 바늘을 column 끝에 꽂고 점자로 끝을 잘라낸 후 얼음에 두었던 PBS/2% FCS를 위로 올렸다가 아래로 흘렸다. 차게된 column에 세포 현탁액을 위에서 부어 넣고 25ml 짜리 통에 약 20ml가 될 때 까지 받아내었다. 이때까지 column 위가 마르지 않게 계속 찬 PBS/2% FCS를 위에서 흘려주었다. 여기서 모인 것이 호산구와 일부 림프구가 되며 이 20ml 2000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 1ml Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)에 풀고 세포를 계수하였다.

### 3. 호산구 화학주성

화학주성은 8 $\mu$ m 소공을 가진 polycarbonate filter를 사용한 변형된 multi-well micro-Boyden chamber로 정량하였다. 음성대조군으로 완충액을, 양성대조군으로 PAF( $10^{-7}$ M)을 사용하였다. 먼저 chemoattractant(trypsin, chymotrypsin, 음성대조군, 양성대조군)을 아래에 넣고 filter를 덮은후 MACS로 분리된 호산구를 계수하여 HBSS+Ca/Mg+phenol red+5% FCS+HEPES 완충액에  $1 \times 10^6$ /ml가 되도록 만들어진 호산구 현탁액을 부었다. Trypsin의 농도는 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000 $\mu$ g/ml로 하였고 chymotrypsin은 3.2, 6.4, 12, 25, 50, 100 $\mu$ g/ml로 하였다. 37℃에서 1시간동안 보온한 후 뒤집어서 나사를 풀고 HBSS 혹은 등장성 용액에 세척하였다. Filter 양 쪽을 집게로 잡고 이동하지 않은 세포면 쪽은 2-3회 반복하여 긁어내고 공기에서 건조시켰다. 메탄올로 고정하고 건조시켰다가 filter를 Hema-Gurr(Poole, UK)로 염색한 후 광학현미경으로 계수하였다. 10개의 고배율시야에서 호산구를 계수하였으며 2회 반복하였다. 결과는 고배율시야당 호산구의 수(eosinophils/HPF)로 나타내었다.

### 4. ECP 유리 정량

여러 농도(10, 100, 1000 $\mu$ g/ml)의 trypsin과 정제된 호산구를 섞은 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 보온기에서 30분간 보온하였다. 보온 후 반응을 억제하기 위하여 5분간 얼음에 둔 후 원심분리를 하고 상청액을 회수하여 -20℃ 냉장고에 정량시까지 보관하였다. 상청액의 ECP의 정량은 Pharmacia CAP system(Kabi pharmacia, Uppsala, Sweden)의 fluoroimmunoassay를 이용하였다. ImmunoCAP와 공유결합한 Anti-ECP을 상청액 50ml와 30분간 실온에서 보온 후 ECP에 대한 enzyme labelled antibody를 첨가하여 ECP-enzyme-anti-ECP 복합체를 형성하게하여 150분간 실온에서 보온하였다. 결합되지 못한 enzyme-anti-ECP는 세척하고 결합된 복합체는 developing solution 50ml와 10분간 보온하였다. stopping solution을 첨가하여 반응을 끝내고 용액의 형광을 fluorocounter를 사용하여 측정하였다. 또한 100, 1000 $\mu$ g/ml 농도의 soybean trypsin inhibitor로 각각 trypsin(1000 $\mu$ g/ml)을 전처리한 후 실험을 반복하였다.

### 5. 분석방법

결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고 화학주성을 일으켜 이동한 호산구수 혹은 활성화로 유리된 ECP의 농도를 의미한다. 집단간 측정치의 유의차 검증은 비모수적 방법(nonparametric method)인 Wilcoxon signed-rank test를 사용하여 분석하였으며 유의수준은 5% 이하로 하였다.

## 결 과

### 1. 호산구의 trypsin에 대한 화학주성

6명의 아토피환자에서 trypsin에 의하여 이동한 호산구수는 (Figure 1)과 같았다.

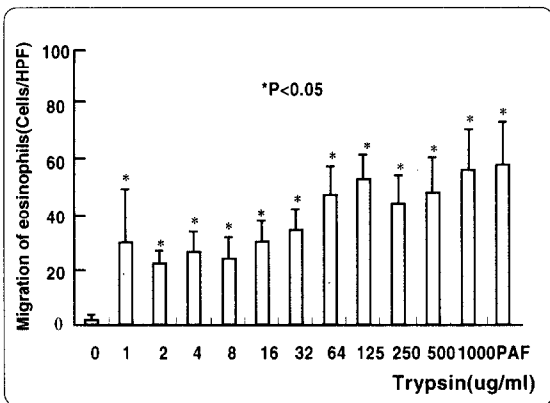


Fig. 1 The effect of trypsin on the migration of eosinophils. Trypsin showed significant chemotactic response to eosinophil

Trypsin 1 $\mu$ g/ml부터 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의한 호산구의 화학주성이 관찰되었고 최대의 반응이 1000 $\mu$ g/ml에서 56.52  $\pm$  14.50/HPF로 양성대조군인 PAF에 필적하였다.

## 2. 호산구의 chymotrypsin에 대한 화학주성

Chymotrypsin 3.2-100 $\mu$ g/ml의 범위에서 화학주성이 관찰되지 않았다(Figure 2).

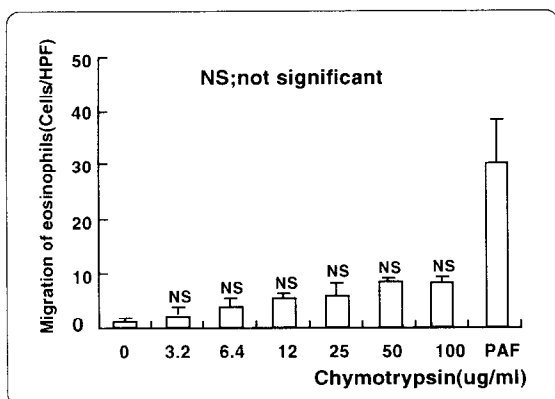


Fig. 2 The effect of chymotrypsin on the migration of eosinophils. Chymotrypsin showed no significant chemotactic response to eosinophil

## 3. ECP 유리

Trypsin으로 처리한 호산구의 ECP 분비능은(Figure 3)와 같았다. Trypsin 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1000 $\mu$ g/ml에서의 ECP 농도는 음성대조군에 비하여 각각 2.7배, 3.7배, 6배 높았다.

Soybean trypsin inhibitor(SBTI)로 전처리하였을 때 ECP의 분비능이 감소되었으며 SBTI 1000 $\mu$ g/ml의 농도에서는 ECP 분비능이 음성대조군과 유의한 차이가 없었다.

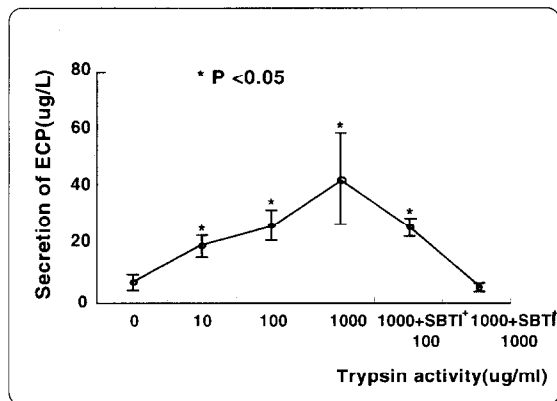


Fig. 3 ECP release from eosinophil after incubation with trypsin. Trypsin induced secretion of ECP from eosinophils, which was reduced by soybean protease inhibitor.

+SBTI; soybean trypsin inhibitor

## 고 찰

호산구는 호중구보다 오래 생존하며 조직 내에서는 수주간 생존할 수 있으며<sup>1)</sup>, 대식세포처럼 말기 효과기세포로서 뿐만 아니라 림프구를 자극하고<sup>24,25)</sup> 림프구에서 파생된 cytokine에 반응하고 조직 내 다른 세포들과 협동적으로 작용하는 등의 다양한 기능을 가진다. 이러한 다양한 기능을 더욱 이해하기 위해서는 골수에서 호산구생성에 관여하는 cytokine의 작용기전과 호산구가 국소적으로 동원되고 축적되는 기전 및 조직 내에서의 호산구의 효과기세포로서 역할과 공동적 협력

의 기능을 조절하고 수행하는 기전에 대한 연구가 필수적이다.

순환하는 혈액에서는 소수인 호산구가 조직에서 다량 축적되는 기전은 아직까지 불확실하며 cytokine으로 자극된 인간의 내피세포에서 호산구의 유착은 CD18-의존적 기전과 endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM)과 vascular cell adhesion molecule (VCAM)에 의한 CD18-비의존적 기전이 있다<sup>26)</sup>. 많은 수의 호산구의 화학주성을 야기하는 물질이 발표되었지만 현재까지는 PAF와 C5a가 가장 효과적인 것으로 알려져 있어<sup>11)</sup> PAF가 화학주성의 연구에 양성대조군으로 이용되어왔고 본연구에서도 PAF를 양성대조군으로 사용하였는데 놀랍게도 trypsin이 1000 $\mu$ g/ml의 농도에서 PAF와 동등한 수준의 화학주성을 보여주고 있었다. 이외에도 Interleukin-3(IL-3), GM-CSF<sup>14)</sup>, IL-5<sup>13)</sup>, lymphocyte chemoattractant factor<sup>27)</sup>, IL-2<sup>12)</sup> 등이 호산구의 화학주성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 화학주성이 대부분 in vitro 현상이고 in vivo 현상과는 일치하지 않는다는 보고가 있지만<sup>28),29)</sup> 화학주성의 연구는 여전히 새로운 변조성분(modulator)에 대한 호산구의 반응을 평가하는데 in vivo 실험에 앞서 유용한 방법론으로 쓰이고 있다.

최근의 연구들은 비만세포의 tryptase와 ECP가 알레르겐에 감작된 기도에서 분비되고 객담과 기관지폐포 세척액에서 검출됨을 증명하였다<sup>30,31,32)</sup>. 이는 tryptase가 호산구의 화학주성과 활성화에 영향을 미칠 것이란 가설을 가능하게 하였고 비슷한 구조를 가진 trypsin과 chymotrypsin에 대한 연구가 필요하게 되었다. 본 연구에서는 아토피환자들의 호산구로 trypsin과 chymotrypsin에 대한 직접적인 화학주성을 대상으로 하였는데 아직까지 비교검토할 문헌은 없는 실정이다. 본 연구의 결과에서 trypsin과 chymotrypsin이 서로 다른 결과를 보였던 것에 관해서는 더욱 연구가 필요할 것으로 생각된다.

호산구 활성화의 지표로서 ECP를 정량한 이유는 매우 인간의 호산구에 특이적이기 때문이며 ECP는 세포독성작용과 T-세포의 증식억제, 기도내 점액분비 자극, 헤파린 길항제로서 비세포독성 작용이 있다<sup>33)</sup>. Trypsin에 대한 호산구의 ECP 분비반응은 trypsin의 농도가 높아짐에 따라 증가되었고 soybean trypsin inhibitor(SBTI)로 전처리 하였을 때 SBTI의 농도(100 $\mu$ g/ml, 1000 $\mu$ g/ml)에 따라 호산구의 ECP 분비능이 감소되어 용량-의존적일 가능성을 시사하였다. 결론적으로 trypsin은 호산구의 화학주성 뿐 아니라 ECP 유리능력을 가짐을 강력히 제시할 수 있다. 한편 호산구 화학주성에 대한 칼슘 조절이 제기되었고<sup>34)</sup> trypsin의 작용기전에 대해서 세포신호 전달체계를 포함한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경 :** 기관지천식 등의 알레르기 질환의 병인에 호산구는 중요한 역할을 하며 화학주성의 연구는 새로운 변조성분에 대한 호산구의 반응을 평가하는데 in vivo 실험에 앞서 유용한 방법론으로 쓰이고 있다. 탈과립화된 비만세포와 활성화된 T 림프구가 기관지천식의 병태생리에 관계하며 tryptase는 비만세포의 활성화후 분비되는 단백분해효소 중 하나로서 호산구의 화학주성과 활성화에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 본 연구의 목적은 단백분해효소의 대표적인 trypsin과 chymotrypsin이 호산구의 화학주성과 활성화에 어떤 역할을 하는지 알고자 함에 있다.

**방법 :** 호산구의 분리는 혼합된 과립구로부터 호중구를 제거하는 면역자기방법으로 하였고 화학주성은 multi-well micro-Boyden chamber로 정량하였으며 ECP 유리정량은 fluoroimmunoassay를 이용하였다.

**결과** : 호산구는 trypsin에 화학주성을 보였고 최대의 반응이 1000 $\mu$ g/ml에서 56.52 $\pm$ 14.50/HPF로 양성대조군인 PAF에 필적하였다. 반면 chymotrypsin에 대해서는 화학주성을 보이지 않았다. Trypsin으로 처리한 호산구의 ECP 분비능은 trypsin 10, 100, 1000 $\mu$ g/ml 농도에서 음성대조군에 비하여 각각 2.7, 3.7, 6배 높았다. Soybean trypsin inhibitor로 전처리하였을 때 ECP의 분비능은 감소되었으며 1000 $\mu$ g/ml 농도에서 음성대조군과 유의한 차이가 없었다.

**결론** : trypsin은 호산구에 화학주성을 일으킬 수 있으며 호산구를 활성화하여 호산구 과립단백의 하나인 ECP를 분비하게 한다고 사료된다. 반면 chymotrypsin은 호산구에 대한 직접적인 작용은 없는 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

- 1) Spry CJF: Eosinophils: a comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. p 45, Oxford New York Tokyo, Oxford University, 1988
- 2) Venge P, Peterson CGB: Eosinophil biochemistry and killing mechanisms. In: Morley J, Colditz I, Eosinophils in asthma. p 163, New York London, Academic, 1989
- 3) Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM: The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity [Aspen Allergy Conference]. J Allergy Clin Immunol **81**: 776, 1988
- 4) De Monchy JGR, Kauffman HF, Venge P: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen induced late asthmatic reactions. Am Rev Respir Dis **131**: 373, 1985
- 5) Durham SR, Kay AB: Eosinophils bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. Clin Allergy **15**: 411, 1985
- 6) Taylor KJ, Luksza AR: Peripheral blood eosinophil counts and bronchial responsiveness. Thorax **42**: 452, 1987
- 7) Venge P, Dahl R, Peterson CGB: Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effect of anti-asthmatic medication. Int Arch Allergy Appl Immunol **87**: 306, 1988
- 8) Azzawi M, Bradley B, Jeffrey PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB: Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. Am Rev Respir Dis **142**: 1407, 1990
- 9) Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST: Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. Am Rev Respir Dis **139**: 806, 1989
- 10) Reddington AE, Howarth PH: Mast cells cytokines and asthma. Can Respir J **1**: 1, 1994
- 11) Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB: Platelet activating factor A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. J Clin Invest **78**: 1701, 1986
- 12) Rean TH, Silberstein DS, Kornfeld H, Weller PF: Human eosinophils express functional interleukin-2 receptors. J Clin Invest **88**: 825, 1991b
- 13) Sanderson CJ, Campbell HD, Young IG: Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin-5) and its effects on human and mouse B cells. Immunol Rev **102**: 29, 1988
- 14) Warringa RA, Koderman L, Kok PT, Kreukniet J, Bruijnzeel PL: Modulation and introduction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and interleukin-3. Blood **77**: 2694, 1991
- 15) Bach MK, Jones DG, Kay AB: The effect of enzymes digestions on the activity of eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis(ECF-A). Imm-

- unology **28**(4): 773, 1975
- 16) Lewis RA, Goetzl EJ, Wasserman SI, Valone FH, Rubin RH, Austen KF: The release of four mediators of immediate hypersensitivity from human leukemic basophils. *J Immunol* **114**(1Pt 1): 87, 1975
  - 17) Tai PC, Spry CJ: Enzymes altering the binding capacity of human eosinophils for IgG antibody-coated erythrocyte(EA). *Cli Exp Immunol* **40**(1): 206, 1980
  - 18) Teixeira MM, Doenhoff MJ, McNeice C, Williams TJ, Hellewell PG: Mechanisms of the inflammatory response induced by extracts of *Schistosoma mansoni* larvae in guinea pig skin. *J Immunol* **15**: 5525, 1993
  - 19) Manley HC, Haynes LW: Eosinophil chemotactic response to rat CGRP-1 is increased after exposure to trypsin or guinea-pig lung particulate fraction. *Neuropeptide* **13**(1): 29, 1989
  - 20) Ishida K, Yoshimura K: Differences in responses of rat- and guinea-pig-eosinophils to eosinophil chemotactic factors derived from *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasite Immunol* **12**(3): 269, 1990
  - 21) Fredens K, Dybdahl H, Dahl R, Baandrup U: Extracellular deposit of the cationic proteins ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage: *APMIS* **96**(8): 711, 1988
  - 22) Matsunaga Y, Kido H, Kawaji K, Kamoshita K, Katunuma N, Ogura T: Inhibitors of chymotrypsin-like proteases inhibit eosinophil peroxidase release from activated human eosinophils. *Arch Biochem Biophys* **312**: 67, 1994
  - 23) Hansel TT, De Vries IJM, Iff T, Rhis S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C: An improved immunologic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* **145**: 105, 1991
  - 24) Luccy DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller A, Weller PF: Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120. *J Exp Med* **169**: 327, 1989
  - 25) Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Ber-nado J, Center DM: Lymphokine activation of T4<sup>+</sup> T lymphocyte and monocytes. *J Immunol* **138**: 3817, 1987
  - 26) Weller PF, Rand TH, Goetz SE, Chi-Rosso G, Lobb RJ: Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to VCAM-1 and ELAM-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7430, 1991b
  - 27) Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF: CD4-mediated stimulation of human eosinophil: Lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* **173**: 1521, 1991a
  - 28) Henocq E, Vaargatig: Accumulation of eosinophils in response to intracutaneous PAF-acether and allergens in man. *Lancet* **2**: 1378, 1986
  - 29) Wardlaw AJ, Chung KF, Moqbel R, McDonald AJ, Harnell A, McCusker M, Collins JV, Barnes PT, Kay AB: Effects of inhaled PAF in humans on circulating and bronchoalveolar lavage fluid neutrophils. *Am Rev Respir Dis* **141**: 386, 1989
  - 30) Wenzel SE, Fowler AA, Schwartz LB: Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge In vitro release of histamine and tryptase in atopic subjects with or without asthma. *Am Rev Respir Dis* **137**: 1002, 1988
  - 31) Salmonsson P, Gronneberg R, Gilljam H: Bronchial exudation of bulk plasma at allergen challenge in allergic asthma. *Am Rev Respir Dis* **146**: 1535, 1992
  - 32) Virchow J-C, Holsher U, Virchow C: Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* **146**: 604, 1992
  - 33) Venge P: Immunopharmacology of eosinophils: Chapter 4 Human eosinophil granule proteins: structure function and release. 1st ed. p 43, Academic Press, 1993
  - 34) Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS: Chemotaxis of newt eosinophil: calcium regulation of chemotactic response. *Am J Physiol* **265** (6 Pt 1): C1527, 1993