

천식동물모델에서 디젤분진이 기도과민성과 개형에 미치는 효과

순천향대학교 의과대학 내과학교실¹, 순천향대학교 폐질환유전체센터

송현미·장안수¹·안미현·김영은·권지희·이신화·임태연·이영목¹·박춘식¹

Effects of Diesel Exhaust Particles on Airway Responsiveness and Remodeling in a Murine Asthma Model

Hyun-Mi Song, An-Soo Jang¹, Mi-Hyun Ahn, Young-Eun Kim, Ji-Hee Kwon, Shin-Hwa Lee, Tai-Youn Rhim, Young-Mok Lee¹ and Choon-Sik Park¹

Genome Research Center for Allergy and Respiratory Diseases, ¹Department of Internal Medicine, Asthma and Allergy Research Group, Soonchunhyang University, Bucheon Hospital, Bucheon, Korea

Background: Epidemiologic and clinical investigations have suggested a strong link between particulate air pollution and asthma. The purpose of this study was to evaluate an effects of air pollutants on a murine asthma model, focusing on diesel exhaust particles (DEP).

Method: The Balb/c mice were sensitized intra-peritoneally (i.p.) with ovalbumin (OVA) at days 0 and 14 and challenged intranasally with OVA at days 21, 22, and 23 (group I). The Balb/c mice were sensitized i.p. with OVA at day 0, 14 and challenged with 6 mg/10 mL of DEP at days 21, 22, and 23 (group II). Group III were sensitized with OVA at days 0 and 14, together with 0.6 mg/50 μ L of DEP every other day for 14 days and challenged with 150 μ g /100 μ L OVA and 6 mg/10 mL of DEP at day 21, 22, and 23. Saline sensitized-challenged mice were served as sham control. The mice were subjected to whole-body

plethysmo-graphy and then killed for bronchoalveolar lavage and histology. Cytokines were measured by ELISA. Expression of goblet cell hyperplasia and smooth muscle hyperplasia in the lung tissue was detected by immunohistochemical staining.

Result: DEP and OVA sensitized-challenge group had a significant increase in methacholine-induced AHR, compared to sham group and group I. The levels of IL-4, IL-5, and IFN- γ tended to increase in the BAL fluid in group III. Goblet cell hyperplasia and smooth muscle hypertrophy were more observed in group III than those in sham group, groups I and II.

Conclusion: This study demonstrates that DEP may aggravate airway responsiveness and remodeling in a mouse asthma model. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2006;26:70-77)

Key words: Air pollution, Asthma, Remodeling

서 론

대기오염은 천식의 증가에 관여하며, 특히 예민한 환자에서 기존의 천식을 악화시키며 기도염증을 일으킨다.¹⁻⁴⁾

폐는 표면이 40~120 m² 정도로 하루에 10,000~20,000 L의 공기를 포함한 외부의 물질을 흡입하는 것으로 알려져 있으며 폐의 방어기전은 기계적 혹은 생화학적 방법으로 외부물질을 제거한다. 대기 중에 분진의 크기는 0.05~0.2 μ m이며 디젤분진은 대개 0.2 μ m이며 90% 이상이 1 μ m 이

하이다.⁵⁾ 대기오염은 대기 중의 분진이나 가스형태로 존재하면서 인체에 영향을 미치는데,⁶⁾ 자동차 및 디젤엔진의 증가로 비생리적인 분진이 증가하고 이것이 폐에 침착하여 천식발작, 사망률, 만성 기관지염, 호흡기 감염 등을 증가시킨다.⁷⁻¹⁰⁾ 기존의 천식환자에서 대기오염의 노출은 폐기능의 감소를 가져오며 디젤분진은 기도와 혈액에 변화를 초래한다.¹¹⁾ 저자 등의 연구에서도 대기오염지역 학동기 아동에서 알레르겐 감작과 기도과민성이 높아 천식의 발생에 대기오염이 관여함을 보고하였으며, 오존노출에 의해 기도과민성과 기도염증이 증가함을 보고하였다.^{12,13)} 그리고 분진이 폐대식세포에 의해서 알레르기염증을 일으키는 것을 보고하였다.¹⁴⁾

특히 도시지역은 자동차에서 나오는 대기오염물질에 쉽게 노출되어 있는 것으로 알려져 있으나,¹⁵⁾ 디젤분진이 천식에 미치는 영향은 미약하다. 따라서 저자 등은 천식동물모델에서 디젤분진 노출이 천식에 미치는 영향을 확인하기

This work was supported by grant R01-2003-000-10041-0 From the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

책임저자 : 장안수, 경기도 부천시 원미구 중동 1174

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 우: 420-767

Tel: 032) 621-5143, Fax: 032) 621-5018

E-mail: jas877@schbc.ac.kr

접수: 2005년 2월 14일, 통과: 2005년 3월 13일

위하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 디젤분진 노출

실험동물은 체중 20~30 g의 Balb/c mouse (Charles River Laboratories Seoul, Korea)를 사용하였다. 공급처로부터 쥐를 받은 후 3일 이내에 실험을 실시하였고 실험하기까지는 순천향대학교 부천병원 동물 사육사에서 사육하였다. 대상 쥐는 3개의 그룹으로 나누어 실험하였다(Fig. 1). Group I은 난알부민 100 ug (OVA, grade IV, sigma)과 aluminum hydroxide 20 mg을 phosphated buffered saline (PBS)에 섞어 200 uL를 2주간격으로 2회 실험쥐 둔부에 피하 주사하여 감작하고 PBS 100 uL에 150 ug OVA로 자주하였다. Group II은 OVA 감작은 group I과 동일하게 하고 6 mg/m³에 해당하는 DEP를 21, 22, 23일에 자주하였다. Group III는 Balb/c mice에 생리식염수에 녹인 DEP (0.6 mg/50 uL, from Hajime Takizawa, Tokyo University, Japan)를 녹여 하루에 한 번 비강으로 이들에 한번 총 7번 감작하고 또한 OVA 2주 간격으로 감작하였으며 그리고 OVA 150 ug와 6 mg/m³에 해당하는 DEP를 21, 22, 23일에 자주하였다. 생리식염수로만 감작하고 자주한 경우를 대조군으로 하였다. 24일에 폐기능 검사를 실시하였으며 25일에 기관지폐포세척액을 시행한 후 폐조직을 얻었다(Fig. 1). 동물실험은 순천향대학교 부천병원 실험동물에 대한 연구심의위원회의 규정을 준수하여 시행하였다.

2. 폐기능 검사

동물이 자유롭게 움직일 수 있어 장시간 폐기능검사가 가능한 one chamber 체용적 변동 기록기를 이용하여 흡기시간, 호기시간, 최고흡기 순간유량, 최고호기 순간유량, 흡기

유량, 호흡횟수, 이완시간, enhanced pause 등과 같은 호흡지표들의 변화를 평가하였다. 기도폐쇄의 지표로는 enhanced pause (penh)를 이용하였다.

3. 기관지폐포세척술

Thiopental sodium 50 mg/kg을 실험 쥐에서 복강 내 주사하여 마취시킨 후 곧바로 흉곽을 절개하여 폐와 기관을 노출시켰다. 기관 상단부를 통해 PE-20 폴리에틸렌 도관을 삽입하여 고정시키고, 4°C의 생리식염수 4 mL (1 mL씩 4회)로 기관지 폐포세척술을 시행하였다. 회수된 세척액 양을 기록하고 바로 4°C, 1,500 rpm으로 10분간 원심분리 (VS-6000 CF, Vision, Korea)하여 상층액은 ELISA 측정을 위해 -70°C에 보관하였다. 남아 있는 세포 압착결정을 인산완충액 0.5 mL (pH 7.4)로 녹인 다음, 이 중 50μL를 3% acetic acid 용액 950 μL와 섞어서 hemocytometer (Naubauer chamber)를 사용하여 현미경(×100) 하에서 총 세포수를 세었다. 표본 튜브 내에 남아 있는 세포수가 mL당 10⁶개가 되도록 인산완충액으로 희석한 후 400μL를 따서 250 rpm으로 3분간 cytopspin (CF-120, SAKURA, Japan)하여 슬라이드를 만들었다. 이것을 Diff-Quick[®] 염색하여 400배 현미경 하에서 각 슬라이드의 비 상피세포 수를 500개씩 세어 세포분획을 계산하였다.

4. 조직 처리

폐조직을 얻어 4% 파라포름알데히드로 고정하고 파라핀 블록을 만든 후 3μm 두께로 절단하여 슬라이드에 포매하였으며 Hematoxylin-Eosin염색을 시행하였다.

5. 사이토카인 측정

기관지폐포세척액에서 사이토카인의 농도를 ELISA (enzyme linked immunosorbant assay)를 이용하며 측정하였다. 각각의

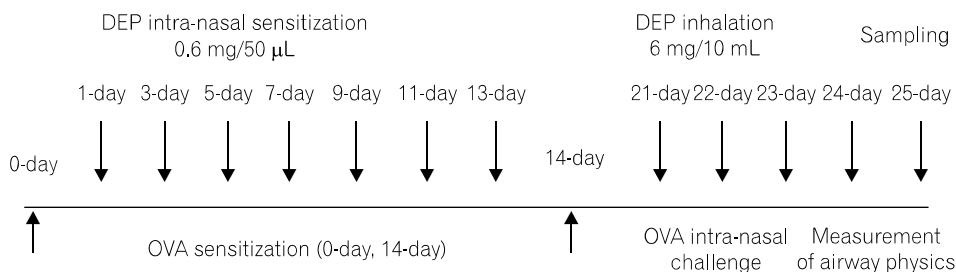


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol. The Balb/c mice were intraperitoneally (i.p.) sensitized with ovalbumin (OVA) at day 0, 14 and were intranasally challenged with OVA (group I). Group II were sensitized i.p. with OVA at day 0, 14 and were challenged intranasally with 6 mg/10 mL of DEP at day 21, 22, 23. Group III were sensitized with OVA at day 0, 14 and 0.6 mg/50 uL of DEP every other day for 14 days and were challenged with 6 mg/10 mL of DEP and 150 ug/100 uL OVA using an ultrasonic nebulizer at day 21, 22, 23. Saline sensitized-challenged mice were serve as sham control. Airway responsiveness was measured 24 hr after the last challenge in mice. Bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue were obtained 24 hr after measurement of airway hyperresponsiveness.

사이토카인 detection limit (pg/mL)는 다음과 같다(IL-4: 7.8 pg/mL, IL-5: 7.8 pg/mL, IFN- γ : 15.6 pg/mL, BD Biosciences, USA).

6. 면역조직화학염색

배상세포의 생성여부는 PAS 염색 후, 현미경에서 확인하였으며 세기관지 5개에서 배상세포와 전체 상피세포를 세어서 분획을 구하여 비교하였다. Actin smooth muscle rabbit antibody는 기도평활근의 개형을 알아보기 위해 다음과 같은 방법으로 염색하였다. 포르말린이 고정된 슬라이드는 탈포르말린과 함수과정을 거쳐 일차항체에 대한 항체(primary antibody; ZYMED, Cal, USA)에 4°C에서 overnight 반응한 후 TBS로 씻는다. 일차항체 검출을 위하여 이차항체(VECTOR ABC kit, Cal, USA)에서 30분간 반응시킨 후 완충액으로 씻고, 내재성 alkaline phosphatase를 억제하기 위하여 TBS에 10분간 세척한다. 검출제는 avidin biotin complex를 이용하여 30분간 반응하고, 발색을 위하여 DAB (ZYMED Liquid substrate kit)에 20초 반응하였다. 발색이 끝난 후 대조 염색은 hematoxylin을 이용하고 Crystal mount (Biomed)로 봉입하여 양성 반응을 관찰하였다. 염색의 전 과정은 실온에서 실시하였다. 대조염색을 위하여 일차항체를 빼고 염색하는 방법으로 음성대조염색도 함께 시행하였다.

7. 통계분석

SPSS (version 11.0)을 이용하여 Mann-Whitney U test로 실험

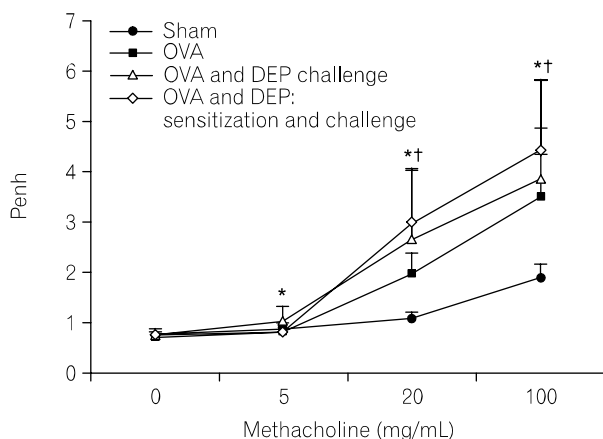


Fig. 2. Airway responsiveness to aerosolized methacholine was measured in unrestrained, conscious mice. Mice were placed in the main chamber of a barometric plethysmograph and first nebulized with saline and then with increasing doses (from 5 to 100 mg/mL) of methacholine for 3 min for each nebulization. Readings of breathing parameters were taken for 3 min after each nebulization, during which time Penh values were determined. Data represent mean $\pm$ SD from six independent experiments. * P < 0.01 compared with sham group. † P < 0.05 compared with Group I.

군간의 차이를 평가하였고, P 값이 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 디젤분진 노출에 따른 기도과민성의 변화

난알부민 감작과 챌린지 그리고 디젤분진 감작과 챌린지군(group III)에서 대조군과 난알부민 감작 및 챌린지군

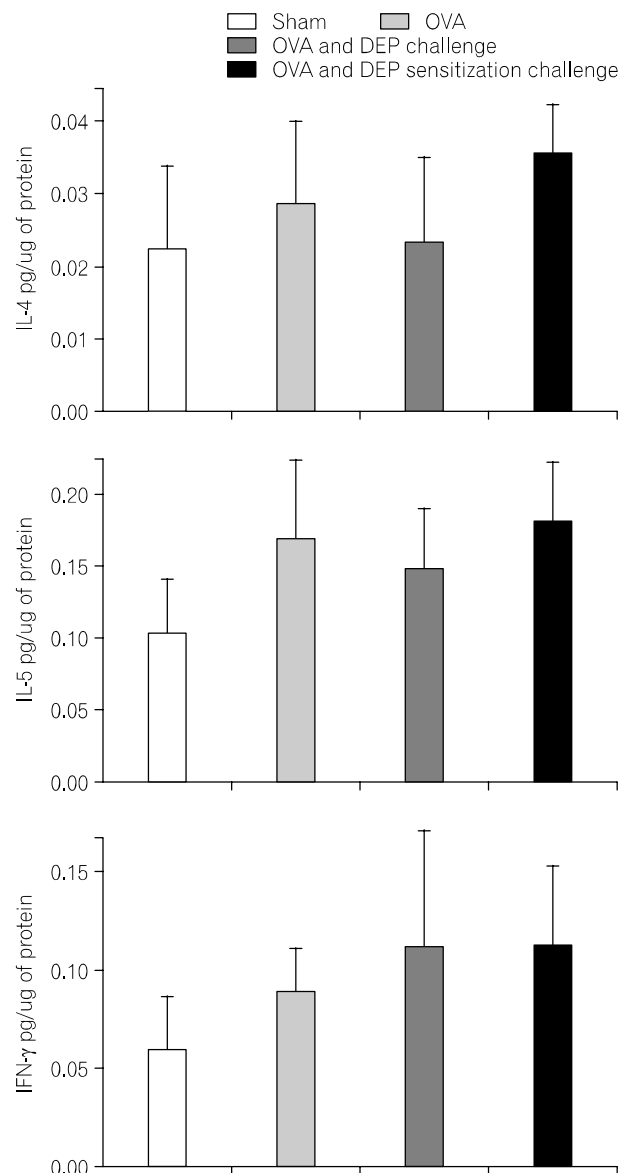


Fig. 3. Effect of DEP on IL-4, IL-5, IFN- γ levels in BAL fluids of each group. Sampling was performed 24 hours after the challenge in mice treated as described in Fig. 1 legend. Bars represent mean $\pm$ SD from six independent experiments.

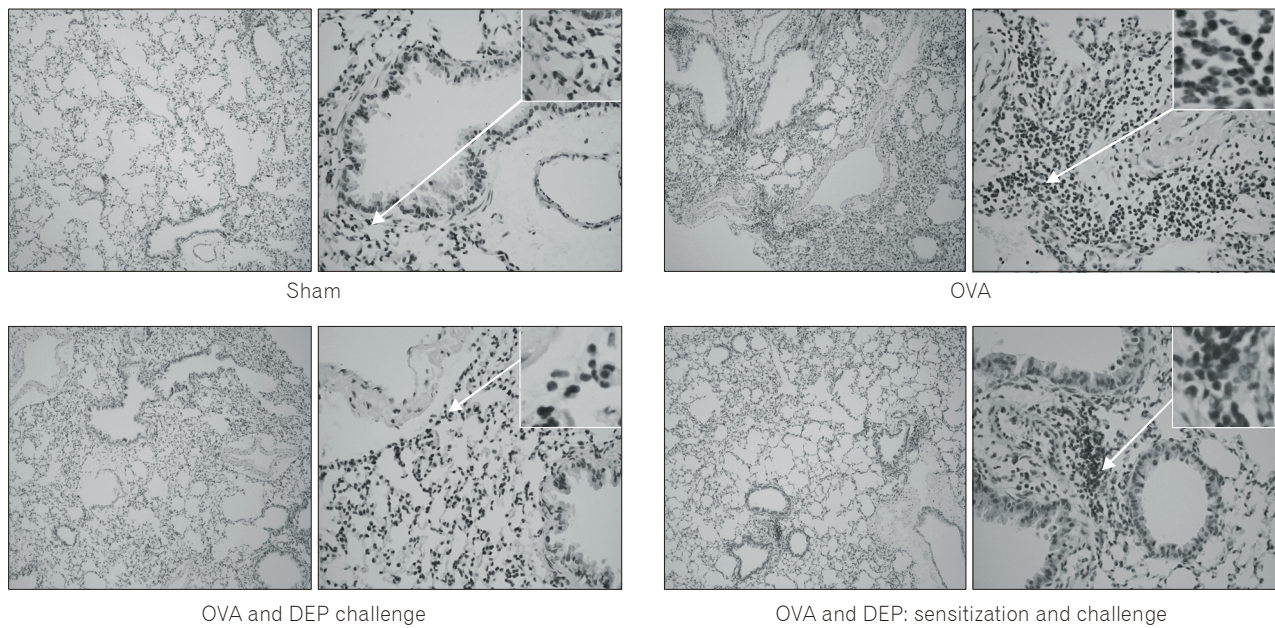


Fig. 4. The inflammatory cell infiltrations in the lungs of four study groups of mouse. Lung tissues from each group were stained with hematoxylin-eosin. Inflammatory cells have infiltrated into the alveolar interstitium and the peribronchiolar area in the group I, II, III.

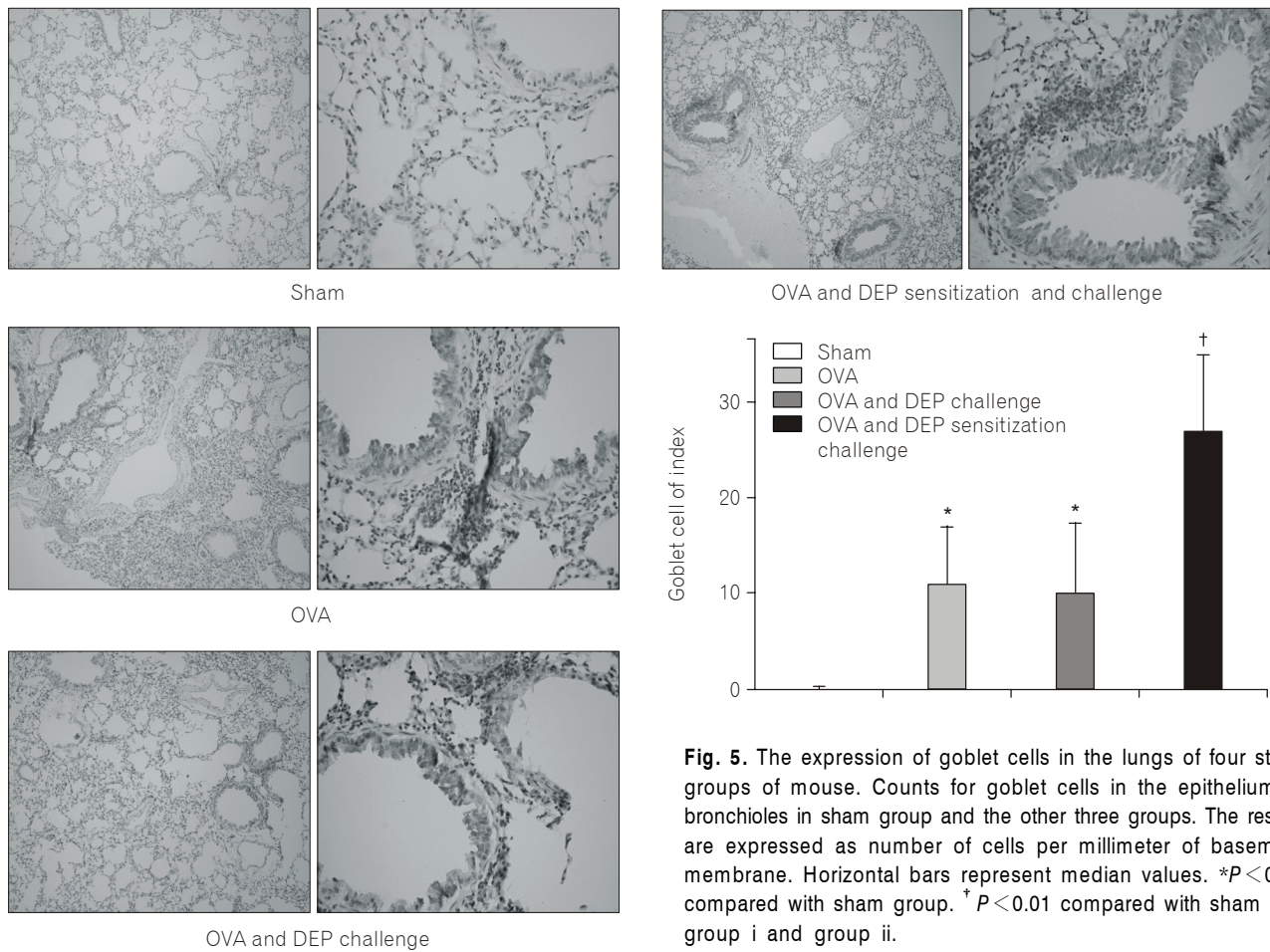


Fig. 5. The expression of goblet cells in the lungs of four study groups of mouse. Counts for goblet cells in the epithelium of bronchioles in sham group and the other three groups. The results are expressed as number of cells per millimeter of basement membrane. Horizontal bars represent median values. * $P < 0.05$ compared with sham group. [†] $P < 0.01$ compared with sham and group i and group ii.

(group I)에 비해 메타콜린 20 mg과 100 mg에서 기관지 유발 검사에서 기도과민성이 유의하게 높았다(sham vs. OVA vs. OVA and DEP challenge vs. OVA and DEP sensitization and challenge 0 mg: 0.75 ± 0.11 vs. 0.72 ± 0.02 vs. 0.72 ± 0.08 vs. 0.82 ± 0.10 Penh, 5 mg: 0.71 ± 0.03 vs. 0.89 ± 0.02 vs. 1.08 ± 0.04 vs. 0.93 ± 0.06 Penh, 20 mg: 1.20 ± 0.02 vs. 1.63 ± 0.02 vs. 3.69 ± 0.07 vs. 3.91 ± 0.30 Penh, 100 mg: 3.29 ± 1.22 vs. 4.27 ± 1.50 vs. 5.04 ± 1.95 vs. 5.04 ± 2.20 Penh, Fig. 2).

2. 기관지폐포세척액 세포분획

난알부민 감작 및 디젤분진 챌린지군(group II)과 난알부민 감작과 디젤분진 감작 및 챌린지군(group III)에서 대조군에 비해 호산구가 유의하게 높았으며($P=0.004$, $P=0.02$) 호중구는 group I에서 대조군에 비해 높았고($P=0.018$) Group III에서 높은 경향을 보였다. 림프구의 수는 차이가 없었다(호산구;

sham vs. OVA vs. OVA and DEP challenge vs. OVA and DEP sensitization and challenge; $0.0 \pm 0.0 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $5.1 \pm 2.1 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $2.0 \pm 0.7 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $4.7 \pm 1.7 \times 10^4/\text{mL}$; 호중구; sham vs. OVA vs. OVA and DEP challenge vs. OVA and DEP sensitization and challenge; $0.2 \pm 0.05 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $0.8 \pm 0.3 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $0.7 \pm 0.257 \times 10^4/\text{mL}$ vs. $2.5 \pm 2.1 \times 10^4/\text{mL}$).

3. 기관지폐포세척액 사이토카인 측정

IL-4, IL-5, IFN- γ 등의 사이토카인은 대조군에 비해 group I, II, III에서 높은 경향이었고 group I과 group II 및 group III 사이에서 차이는 없었다(Fig. 3).

4. 배상세포, 기도평활근 면역화학염색

난알부민 감작과 챌린지군(group I)과 난알부민 감작과 디젤분진 챌린지군(group II), 난알부민과 디젤분진 감작 및 챌

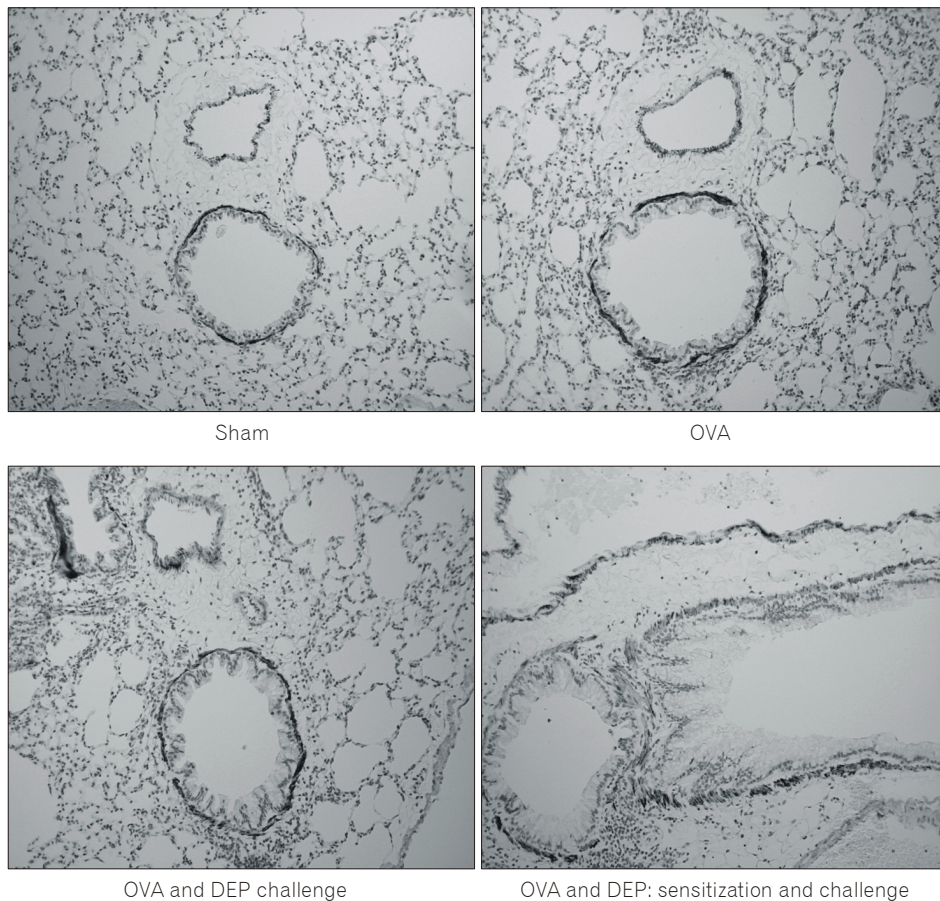


Fig. 6. The expression of smooth muscle cells in the lungs of four study groups of mouse using actin smooth muscle rabbit antibody. Lung tissues from four group mice were stained with monoclonal antibodies directed against smooth muscle specific actin protein. Inflammatory cells have infiltrated into the peribronchiolar area in the group I, II, III mice. In contrast, there was no inflammatory findings or no immunoreactivity for the smooth muscle specific actin proteins in the lung tissues of sham-treated mice.

린지군(group III)에서 대조군에 비해 폐조직에서 염증세포의 증가가 있었다(Fig. 4). 난알부민 감작과 켈린지군(group I)과 난알부민과 디젤분진 켈린지군(group II), 난알부민과 디젤분진 감작 및 켈린지군(group III)에서 대조군에 비해 배상세포의 증가가 관찰되었고 group III에서 group I과 group II에 비해 유의하게 배상세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 5). 그리고 actin-smooth muscle antibody에 의한 면역화학염색에서 난알부민과 디젤분진 켈린지군(group II), 난알부민과 디젤분진 감작 및 켈린지군(group III)에서 대조군과 난알부민 감작과 켈린지군(group I)보다 기도평활근의 증가를 확인하였다(Fig. 6).

고 찰

대기오염이 천식이 있는 환자에서 어떤 영향을 미칠 것인지에 대한 연구는 증가하고 있으나 국내 연구는 아직 적은 상태이다. 따라서 저자 등은 대기오염물질인 디젤분진을 천식동물 모형에 노출시켜 디젤분진이 천식모형모델에서 기도과민성을 증가시키며 기도 개형을 초래하는 것을 확인하였다.

산업화와 자동차 등에서 배출되는 가스는 천식, 알레르기비염 등과 같은 알레르기 질환의 증가에 관여하며 디젤엔진에서 나오는 디젤분진 중에 polyaromatic hydrocarbons, quinines, aldehydes 등^{16,17)}은 인체에 해로운 영향을^{18,19)} 미치는 것으로 알려져 있다.

세포주와 IL-5 knockout 쥐 모델에서 디젤분진이 기도과민성과 기도염증에 관여함이 알려져 있고,^{20,21)} 디젤분진을 생리적으로 흡입한 동물모델에서 저자 등은 디젤분진을 흡입시킨 결과 디젤분진 흡입 군에서 기도과민성과 기도염증 지표들이 증가함을 보고하였다.²²⁾

디젤분진에 의한 기도염증은 여러 가지 기전에 의해 설명되고 있다. 디젤분진 노출은 면역글로불린 E 및 알레르기성 기도염증을 일으키고 기도과민성을 유발한다.²³⁻²⁵⁾ 건강인이 디젤분진에 노출되면 기관지폐포세척액에서 폐대식세포, 호중구, 림프구의 증가가 관찰되며 폐조직에 호중구의 증가와 기관조직에 림프구, 비만세포, IL-8 mRNA 발현이 증가하고, 또한 모세혈관의 ICAM-1이나 VCAM-1, 백혈구세포표면의 LFA-1이 관여함이 보고되었다.²⁶⁾

천식모델에 디젤분진을 노출시키면 기관지폐포세척액에서 폐대식세포, 호산구, 호중구 및 림프구의 수가 증가하고, 특히 IgG1이 증가하며 IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-6, IL-10, RANTES, eotaxin 등의 사이토카인과 IL-13 mRNA의 발현이 증가하여 Th2 림프구 사이토카인이 활성화됨이 보고되었다.^{27,28)} 본 연구에서도 기관지폐포세척액에서 호산구, 호중

구 등이 증가하여 호중구, 호산구 등이 디젤분진 노출 후 기도염증에 관여할 수 있을 것으로 생각한다.

그리고 동물모델에 삼나무 화분에 디젤분진을 추가하면 IgE반응이 증가된다.²⁹⁾ 또한 항원과 디젤분진을 같이 주면 IgE 증가뿐 아니라 IL-4의 증가도 관찰된다.^{30,31)} 6주 동안 디젤분진을 기관지 내에 주입하였을 때 IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF의 증가를 보고하였고 기관지폐포세척액에서 폐대식세포, 호산구, 호중구, 림프구 수가 항원과 디젤분진을 함께 주었을 때 각각 노출군에 비해 증가하였다.²³⁾ 코에서도 디젤분진과 돼지풀항원을 같이 주었을 때 특이 IgE가 돼지풀만 켈린지 하였을 때 보다 16배 더 증가하였다. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 mRNA의 발현이 디젤분진과 돼지풀을 같이 켈린지 하였을 때 더 증가하였다.³²⁾ 그리고 난알부민 유발 기니피그에서 디젤분진 노출 후에 재채기, 코 분비물이 증가하고 특이 anti-OVA-IgG와 anti-OVA-IgE가 증가하였다.^{33,34)} 따라서 기존의 천식이 있는 경우에 대기오염이 천식의 증상 악화에 상승효과를 나타낼 것으로 보여져 디젤분진과 알레르기 노출에 의한 상승효과를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였으며 난알부민 천식모형모델에 비해 추가로 디젤분진을 노출시킨 군에서 기도과민성이 유의하게 증가함을 확인하였다. 이러한 결과로 디젤분진이 기존의 천식의 악화에 관여할 수 있음을 시사하는 소견으로 생각한다.

그러나 기관지폐포세척액에서 측정된 사이토카인은 천식동물모형에 디젤분진 노출이 사이토카인의 증가를 가져오지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 이것은 디젤분진의 투입경로나 양 등에 따라 차이가 있는 것으로 생각된다. 따라서 디젤분진의 양과 투입경로에 대한 다양한 연구가 추후 필요할 것으로 여겨진다.

디젤분진은 모세혈관세포나 제2형 기도상피 세포를 손상시켜서 호중구 등 세포에 의한 염증반응을 일으킨다.¹⁹⁾ 전자현미경사진에서 디젤분진은 용량과 기간 의존형으로 폐포파괴를 초래한다.³⁵⁾ 장기간 디젤분진 노출에 의해 세포내나 라이소말 효소, 단백질의 증가하고, 콜라겐 합성과 축적이 일어나 폐포벽의 두께 증가, 혈관의 증상, 세포간질의 섬유화가 일어난다.³⁶⁾ 본 연구에서 폐 조직에서의 염증세포의 증가를 확인하였으며 배상세포와 기도평활근세포의 증식이 관여됨을 알 수 있었다. 이것은 디젤분진이 기존의 천식의 악화에 관여하는데 사이토카인의 증가는 적더라도 기도의 구조적 변화에 일부 관여할 수 있음을 시사하는 소견으로 판단된다.

결 론

디젤분진은 난알부민 천식동물모델에서 기도과민성과

기도개형을 증가시킴을 확인하여 디젤분진이 천식의 악화에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systemic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574-80
- 2) Gong H Jr, Sioutas C, Linn WS. Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient particles in metropolitan Los Angeles. *Respir Rep Health Eff Inst* 2003; 118:1-36
- 3) Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀) *in vivo* and *in vitro*. *Thorax* 1996;51:1216-22
- 4) Penard-Morand C, Charpin D, Raheison C, Kopferschmitt C, Caillaud D, Lavaud F, Annesi-Maesano I. Long-term exposure to background air pollution related to respiratory and allergic health in schoolchildren. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1279-87
- 5) Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, et al. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159: 702-9
- 6) Folinsbee LJ. Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect* 1993;100:45-56
- 7) Dockery DW, Pope CA III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. *NEJM* 1993;329:1753-9
- 8) Dockery DW, Speizer FE, Stram DO, Ware JH, Spengler JD, Ferris BG. Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:587-94
- 9) Kaiser J. Showdown over clean air science. *Sci* 1997;277:466-9
- 10) Schwartz J. Air pollution and daily mortality. A review and meta analysis. *Environ Res* 1994;64:36-52
- 11) Lewis TC, Robins TG, Dvornch JT, Keeler GJ, Yip FY, Mentz GB, et al. Air pollution-associated changes in lung function among asthmatic children in Detroit. *Environ Health Perspect* 2005;113:1068-75
- 12) Jang AS, Yeum CH, Son MH. Epidemiologic evidence of a relationship between airway hyperresponsiveness and exposure to polluted air. *Allergy* 2003;58:585-8
- 13) Jang AS, Choi IS, Kim SW, Song BC, Yeum CH, Jung JY. Airway obstruction after ozone exposure in BALB/c mice using barometric plethysmography. *Kor J Int Med* 2003;18:1-5
- 14) Kang CM, Jang AS, Ahn MH, Shin JA, Kim JH, Choi YS, et al. Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:290-6
- 15) Faiz A, Delardere JA. Automotive air pollution in developing countries, outlook and control strategies. *Sci Environ* 1993;134: 325-34
- 16) Draper W. Quantification of nitro and dinitropolycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter. *Chemosphere* 1986;15:437-47
- 17) Scuetzle D, Lewtas J. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. *Anal Chem* 1986;58:1060A-70A
- 18) McClellan RO. Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1987;27:279-300
- 19) Ichinose T, Furuyama A, Sagai M. Biological effects of diesel exhaust particles. 2. Acute toxicity of DEP introduced into lung by intratracheal instillation. *Toxicol* 1995;99:153-67
- 20) Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, et al. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO- α production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:550-7
- 21) Hao M, Comier S, Wang M, Lee JJ, Nel A. Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:905-14
- 22) Shin JA, Jang AS, Ahn MH, Song HM, Kim YE, Rhim TY. Effects of diesel exhaust particles on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2005;25:117-22
- 23) Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:36-42
- 24) Steerenberg PA, Zonnenberg JA, Dormans JA, Joon PN, Wouters IM, van Bree L, et al. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) *in vitro*. *Exp Lung Res* 1998;24:85-100
- 25) Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Nakano J, Nakajima M, et al. Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1024-30
- 26) Fahy O, Hammad H, Senechal S, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B, et al. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the MAP kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:247-54
- 27) van Zijverden M, van der Pijl A, Bol M, van Pinxteren FA, de Haar C, Penninks AH, et al. Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;168:131-9
- 28) Kobayashi T. Exposure to diesel exhaust aggravates nasal allergic reaction in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:352-6
- 29) Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Takafuji S, et al. Enhancing effect of suspended particulate matter on the IgE antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989;90:1-7
- 30) Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N, Saito S. IL-4

- production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology* 1994;92:261-8
- 31) Fujimaki H, Saneyoshi K, Shiraishi F, Imai T, Endo T. Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology* 1997;116:227-33
- 32) Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances *in vivo* nasal ragweed specific IgE and shows cytokine production to a TH2-type pattern. *J Immunol* 1997;158:2406-13
- 33) Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994;94:1417-25
- 34) van Zijverden M, van der Pijl A, Bol M, van Pinxteren FA, de Haar C, Penninks AH, van Loveren H, Pieters R. Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;168:131-9
- 35) Nagai A, Kakuta Y, Ozawa Y, Uno H, Yasui S, Konno K, et al. Alveolar destruction in guinea pigs chronically exposed to diesel engine exhaust - A light microscopic and electron microscopic morphometry study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:724-30
- 36) Barnhatt MI, Chen S, Salley SO, Puro H. Ultrastructure and morphometry of guinea pigs chronically exposed to diesel engine exhaust: Six months experience. *J Appl Toxicol* 1981;1:88-103