

백서에서 디젤분진이 기도염증과 과민성에 미치는 영향

순천향대학교 의과대학 내과학교실¹, 순천향대학교 폐질환유전체센터²

신정아²·장안수¹·안미현²·송현미²·김영은²·임태연²·이준혁¹·박성우¹·박춘식^{1,2}

Effects of Diesel Exhaust Particles on Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Murine Model

Jeong-Ah Shin², An-Soo Jang¹, Mi-Hyun Ahn², Hyun-Mi Song², Young-Eun Kim², Tai-Youn Rhim², June-Hyuk Lee¹, Sung Woo Park¹ and Choon-Sik Park^{1,2}

¹Division of Allergy and Respiratory Diseases, ²Asthma and Allergy Research Group, Soonchunhyang University, Bucheon Hospital, Korea

Background: Epidemiologic studies show that increases in diesel exhaust particles (DEP) can aggravate acute asthma. However, there were a few asthma models in mice exposed to DEP. Nitric oxide (NO) may contribute to airway inflammation and hyperresponsiveness (AHR).

Objective: We have determined the effects of DEP on AHR and inflammation using a mouse model. We have also investigated the effects of DEP on the production of NO in vivo and in vitro.

Method: The mice were intra-nasally sensitized with 0.6 mg/mL of DEP for 5 days and were challenged with 6 mg/m³ of DEP by inhalation route for 3 days. The mice were subjected to whole-body plethysmography and killed for performance of bronchoalveolar lavage and histology. Murine macrophage cell line, Raw 264.7 cells were exposed to 50 µg/mL of DEP and nitrate levels in the culture super-

natants were measured with the Griess reagent. Expression of NO synthase was detected by RT-PCR.

Result: DEP induced a significant increase in methacholine-induced AHR. The levels of IL-4 and eotaxin increased in the BAL fluid in mice exposed to DEP. DEP stimulated nitrite production in the BAL fluid. Nitrite increased in Raw 264.7 cells exposed to DEP. DEP stimulated the expression of iNOS in lung tissue in mice exposed to DEP. Alveolar macrophage was expressed iNOS mRNA 24 h and 48 h after stimulation with DEP in vitro with peak time in 48 h post-stimulation.

Conclusion: It is suggested that DEP may induce AHR and produce NO, and that NO may be an important role in airway inflammation by DEP. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2005;25:117-22)

Key words: Air pollution, Asthma, Nitric oxide

서 론

과거 20년간 알레르기 질환이 증가된 원인으로는 밀폐된 서양식 집안 구조, 집안 알레르겐 및 대기오염의 증가 등이 거론되고 있다. 천식은 1995년 소아를 대상으로 한 전국조사에서 15.5%로 증가하였으며, 천식에 의한 사망률도 증가되고 있는 추세이다.¹⁾ 천식의 증가 및 사망과 대기오염과의 관련성이 최근 제시되고 있다. 저자들의 연구에서도 대기

오염지역 학동기 아동에서 알레르겐 감각과 기도과민성이 높아 천식의 발생에 대기오염이 관여함을 보고하였으며, 오존노출에 의해 기도과민성과 기도염증이 증가함을 보고하였다.^{2,3)} 대기오염은 대기 중의 분진이나 가스형태로 존재하면서 인체에 영향을 미치는데,⁴⁾ 근래에는 자동차 및 디젤엔진의 증가로 비생리적인 분진이 증가하고 이것이 폐에 침착하여 천식발작, 사망률, 만성기관지염, 호흡기감염 등을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁸⁾

NO (nitric oxide)는 천식에서 IFN-γ를 분비하는 Th1 림프구를 억제함으로써 상대적으로 IL-5를 분비하는 Th2 림프구를 활성화시켜 알레르기 염증반응을 증가시킨다.⁹⁾ 산화질소산물은 천식환자 객담에서 증가되어 있고 천식의 중증도와 관계가 있어 천식환자의 기도염증을 평가하는 데 유용한 지표이고, 객담 NO산물이 혈청 NO산물보다 기도염증의 지표로 더 유용함이 보고하였다.¹⁰⁾ NO의 증가는

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 4월 8일, 통과: 2005년 6월 18일

inducible NOS의 유도를 반영하고¹¹⁾ 이것은 nuclear factor kappa B (NF- κ B) gene 전사를 통해 이루어지는 것이 보고되었다.¹²⁾ 인구의 47%가 도시지역에 주거하며 자동차에서 나오는 대기오염물질에 노출되어 있는 것으로 알려져 있으나,¹³⁾ 디젤분진이 천식에 미치는 국내 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 저자들은 백서에 디젤분진을 코로 감작시키고 생리적인 방법으로 디젤분진을 흡입시켜 기도염증과 과민성에 미치는 영향을 파악하고, 디젤분진 노출 후 초기 반응 세포인 폐포대식구에 디젤분진을 노출하여 산화질소의 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 디젤분진 노출

실험동물은 체중 20~30g의 BALB/c mouse (Charles River Laboratories Seoul, Korea)를 사용하였고, 공급처로부터 쥐를 받은 후 3일 이내에 실험을 실시하였고 실험하기까지는 순천향대학교 부천병원 동물 사육사에서 사육하였다. Balb/c mice에 생리식염수에 녹인 DEP (0.6 mg/mL, from Hajime Takizawa, Tokyo University, Japan)를 녹여 하루에 한 번 비강으로 5번 투여한 후 6 mg/m³에 해당하는 DEP를 6, 7, 8일에 흡입시켜 동물모델을 만들고 9일에 폐기능 검사 10일에 기관지폐포세척액을 시행한 후 폐조직을 얻었다(Fig. 1). 대조군은 생리식염수로만 감작하고 챌린지 하였다. 동물실험은 순천향대학교 부천병원 실험동물에 대한 연구심의위원회 규정을 준수하여 시행하였다.

폐포대식구 세포주인 Raw 264.7 (Mus musculus macrophage, ATCC number: TIB-71, 한국세포주은행)를 6~7세대 배양 후 5×10^5 /mL를 6 well plate에서 DEP 50 μ g/mL로 자극하고 4, 8, 12, 24, 48, 72시간에 세포 상층액을 얻었다.

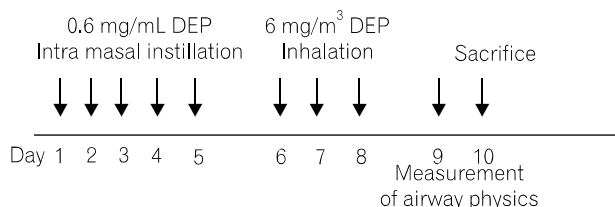


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol. Mice were sensitized for 5 days by subcutaneous injection of DEP. On day 6, 7, and 8 after the sensitization, the mice were challenged for 30 minutes with a DEP in saline (or with saline as a control) using an ultrasonic nebulizer. Airway responsiveness 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.

2. 폐기능검사

동물이 자유롭게 움직일 수 있어 장시간 폐기능검사가 가능한 one chamber 체용적 변동 기록기를 이용하여 흡기시간, 호기시간, 최고흡기 순간유량, 최고호기 순간유량, 흡기유량, 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 폐포 세척술을 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 50 μ L를 3% acetic acid용액 950 μ L와 섞어서 hemocytometer (Naubauer chamber)를 사용하여 현미경($\times 100$) 하에서 총 세포수를 세었다. 표본 튜브 내에 남아 있는 세포수가 mL당 10^6 개가 되도록 인산완충액으로 희석한 후 400 μ L를 따서 250 rpm으로 3분간 cytopspin (CF-120, SAKURA, Japan)하여 슬라이드를 만들었다. 이것을 Diff-Quick[®] 염색하여 400배 현미경 하에서 각 슬라이드의 비상피세포 수를 500개씩 세어 세포분획을 계산하였다.

4. 조직 처리

폐조직을 얻어 4% 파라포름알데히드로 고정하고 파라핀 블록을 만든 후 3 μ m 두께로 절단하여 Probe On Plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 포매하였으며 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하였다.

5. Nitrite와 nitrate 측정

NO의 안정적 대사 산물인 nitrite (NO₂⁻)와 nitrate (NO₃⁻)를 측정하였다. Nitrite 측정은 Greenberg 등¹⁴⁾에 의한 Griess 반응을 이용하여 흡광도 540 nm에서 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 100 μ L 기관지폐포세척액 및 세포배양 상층액을 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene dihydrochloride/2.5% phosphoric acid, R&D systems Inc.)과 동량으로 37°C에서 반응하여 측정하였으며 표준대조로 sodium nitrite (R&D systems Inc.)를 사용하였다. Nitrate는 100 μ L의 기관지폐포세척액 및 세포배양 상층액을 200 mM ammonium formate (including 100 mM HEPES, Sigma Chemical Co.) 100 μ L

에 반응시키고 100 μ L의 nitrate reductase로 37°C에서 30분 동안 배양한 후 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. Nitrite와 nitrate의 detection limit는 각각 0.22 mol/L와 0.54 mol/L이었다.

6. Inducible NO synthase의 RT-PCR

총 RNA는 TRI REAGENT (Guanidium thiocyanate-phenol mixture, Montgomery Rd., Ohio, USA)와 chloroform으로 분리하였다. RNA는 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, 1 μ L의 oligo (dT) (500 μ g/mL)와 1 μ L의 SuperScript II (200 unit/ μ L, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 42°C, 50분 동안 reverse transcription 한 후 70°C, 15분 동안 heat inactivation 하였다. Reverse transcription 후 PCR을 위해 사용된 oligonucleotide primer는 사람 iNOS (forward primer: 5'-GCA TGG AAC AGT ATA AGG CAA ACA-3', backward primer: 5'-GTT TCT GGT CGA TGT CAT GAG CAA-3')이며, 대조유전자로는 β -actin (Clontech Laboratories Inc., USA)을 사용하였다. iNOS 증폭은 94°C에서 1분 동안 변성하고 55°C에서 1분간 annealing, 72°C, 10분 동안 확장하고 35 cycles 증폭하였다. Amplified PCR products는 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

7. 사이토카인 측정

기관지폐포세척액 및 디젤분진 노출 배양세포 상층액에서 사이토카인의 농도를 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)를 이용하여 측정하였다. 각각의 사이토카인 detection limit (pg/mL)는 다음과 같다(IL-4: 7.8 pg/mL, IL-5: 7.8 pg/mL, IL-6: 4.7 pg/mL, IL-13: 15 pg/mL, IFN- γ : 4.7 pg/mL, eotaxin-1: 6.3 pg/mL, BD Biosciences, USA).

8. 통계분석

SPSS (version 11.0)을 이용하여 Mann-Whitney U test로 실험 군간의 차이를 평가하였고, *P*값이 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 디젤분진 노출 기도과민성의 변화

디젤분진 노출군에서 대조군에 비해 유의하게 메타콜린 기관지 유발검사에서 기도과민성이 유의하게 높았다(sham vs. DEP 0 mg: 1.047 $\pm$ 0.229 Penh vs. 1.094 $\pm$ 0.311 Penh, 5 mg: 1.195 $\pm$ 0.266 Penh vs. 1.390 $\pm$ 0.448 Penh, 20 mg: 1.750 $\pm$ 0.627 Penh vs. 2.258 $\pm$ 0.681 Penh, 100 mg: 2.547 $\pm$ 1.100 Penh vs. 3.258 $\pm$ 1.810 Penh, *P*<0.05, Fig. 2).

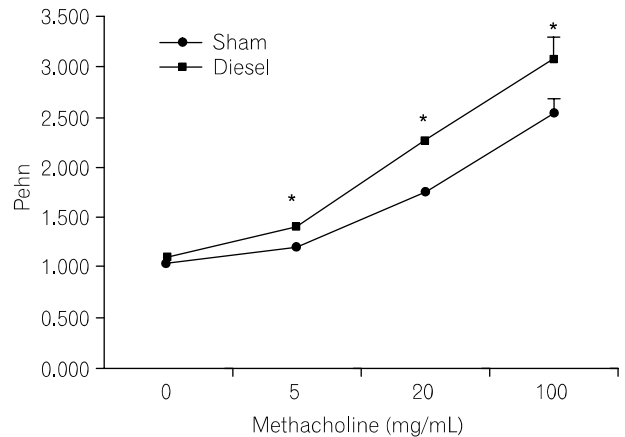


Fig. 2. Airway responsiveness to aerosolized methacholine was measured in unrestrained, conscious mice. Mice were placed in the main chamber of a barometric plethysmograph and nebulized first with saline and then with increasing doses (from 5 to 100 mg/mL) of methacholine for 3 min for each nebulization. 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*<0.05.

2. 기관지폐포세척액 세포분획

디젤분진 노출군에서 대조군에 비해 총세포수는 높은 경향이었으며(5.2 $\pm$ 1.45 $\times$ 10⁴/mL vs. 7.5 $\pm$ 1.32 $\times$ 10⁴/mL), 폐포대식구(4.49 $\pm$ 2.63 $\times$ 10⁴/mL vs. 5.94 $\pm$ 2.36 $\times$ 10⁴/mL), 호중구(0.015 $\pm$ 0.02 $\times$ 10⁴/mL vs. 0.05 $\pm$ 0.057 $\times$ 10⁴/mL), 림프구(0.07 $\pm$ 0.094 $\times$ 10⁴/mL vs. 0.125 $\pm$ 0.091 $\times$ 10⁴/mL)의 수도 높은 경향을 보였다.

3. 기관지폐포세척액 사이토카인 측정

IL-4와 IL-6, eotaxin은 대조군에 비해 디젤분진 노출군에서 유의하게 높았다(sham vs. DEP IL-4: 18.85 $\pm$ 7.29 pg/mL vs. 26.3 $\pm$ 6.75 pg/mL, IL-6: 4.7 $\pm$ 1.8 pg/mL vs. 9.2 $\pm$ 2.5 pg/mL, eotaxin: 38.2 $\pm$ 8.2 pg/mL vs. 68.3 $\pm$ 7.09 pg/mL, *P*<0.05, Fig. 3). 그러나 IL-5, IL-13, IFN- γ 는 양 군 간에 차이가 없었다(sham vs. DEP; IL-5: 14.2 $\pm$ 3.5 pg/mL vs. 18.2 $\pm$ 3.5 pg/mL, IL-13: 31.2 $\pm$ 3.7 pg/mL vs. 41.5 $\pm$ 10.3 pg/mL, IFN- γ : 17.4 $\pm$ 5.3 pg/mL vs. 18.5 $\pm$ 6.1 pg/mL). Nitrate는 양 군간에 차이가 없었으나 nitrite는 디젤분진 노출 군 기관지폐포세척액에서 유의하게 높았다(sham vs. DEP; 3.82 $\pm$ 0.32 mol/L vs. 4.05 $\pm$ 0.41 mole/L, *P*<0.05, Fig. 3B).

4. 폐조직의 변화

디젤분진 노출군과 대조군에서 기도의 구조에 변화는 관

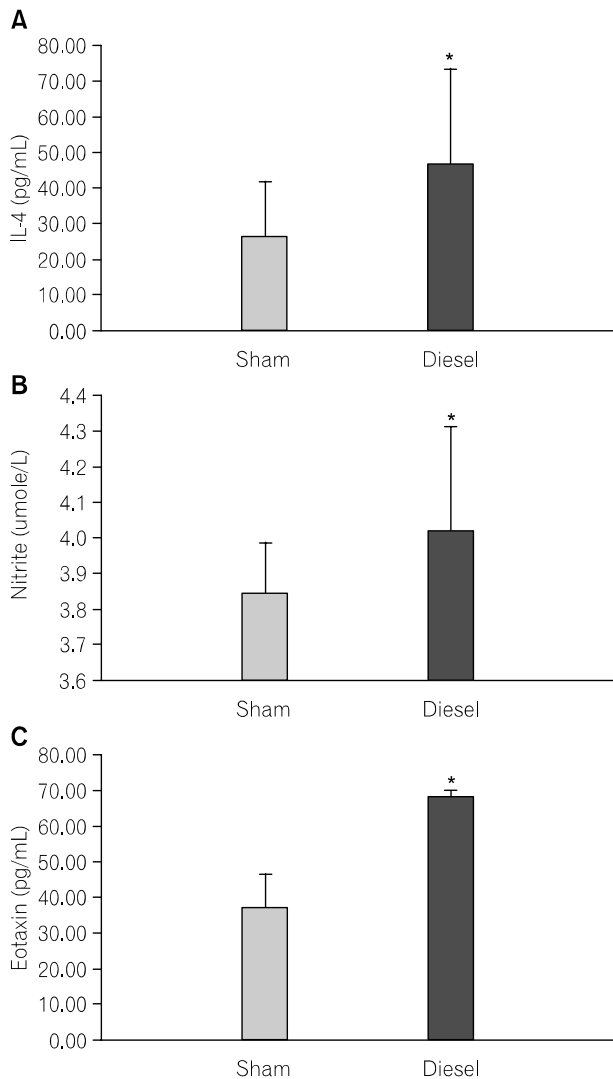


Fig. 3. Effect of DEP on IL-4, nitrite, and eotaxin levels in BAL fluids of DEP-sensitized and -challenged mice. Enzyme immunoassay of IL-4 (A), nitrite (B), and eotaxin (C). Sampling was performed 24 hours after the challenge in mice treated as described in Figure 1 legend. Bars represent mean ± SD from six independent experiments. * $P < 0.05$.

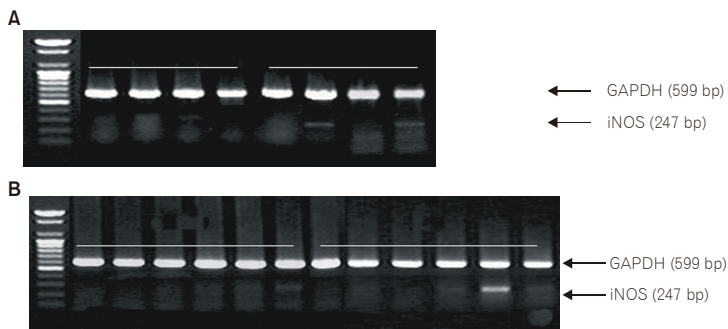


Fig. 5. RT-PCR analysis of iNOS mRNA in DEP exposed lung extract (A) and in murine alveolar macrophages (Raw 264.7 cells) exposed to DEP 50 ug/mL for 72 hours.

찰되지 않았고, 배상세포과형성은 관찰되지 않았다.

5. 폐조직과 폐포대식구 세포주에서 디젤분진 노출 후 nitrite와 iNOS의 발현

폐포대식구 세포주인 Raw264.7세포를 6~7계대 배양한 다음 5×10^5 /mL개의 세포를 6 well plate에서 72시간 동안 DEP 50 μ g/mL로 자극하고 4, 8, 12, 24, 48, 72시간에 후에 세포 상층액에서 측정된 nitrate의 농도는 디젤분진 노출군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 4). 폐조직에서 iNOS 발현을 RT-PCR로 확인하였을 때, 디젤분진 노출군 폐조직에서 iNOS의 발현이 증가하였고 Raw264.7세포주에서 디젤분진 자극 후 48, 72시간에 iNOS가 발현됨을 확인하였다(Fig. 5).

고찰

국내에서도 자동차 수가 증가하면서 대기오염이 환경 및 인체에 미치는 영향이 날로 증대되고 있지만 환경분진이 기도염증에 미치는 연구는 미미한 상태이며, 특히 디젤분

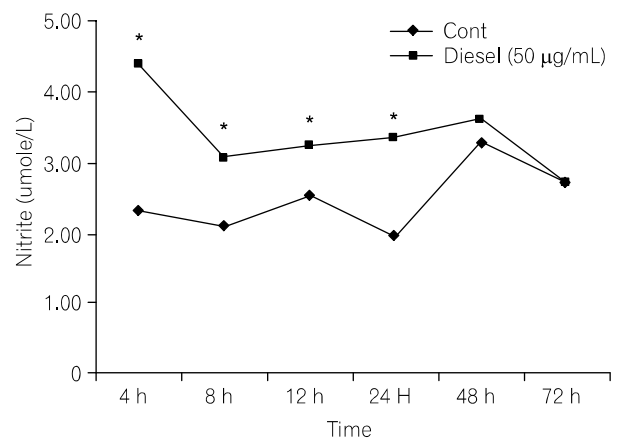


Fig. 4. Nitrite production by murine alveolar macrophages (Raw 264.7 cells) exposed to DEP 50 ug/mL. * $P < 0.05$.

진이 기도과민성과 기도염증에 미치는 국내보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 저자들은 대기오염물질 중에 하나인 디젤분진을 이용한 동물실험에서 디젤분진이 기도염증지표와 기도과민성을 증가시키며, 이러한 염증 메커니즘에 산화질소가 관여함을 확인하였다.

자동차의 증가와 배출가스는 천식, 알레르기비염 등과 같은 알레르기 질환의 증가에 관여하며 디젤엔진에서 나오는 디젤분진 중에 polyaromatic hydrocarbons, quinines, aldehydes 등은^{15,16)} 인체에 위해한 영향을^{17,18)} 미치는 것으로 알려져 있다. 도시의 대기 중에 분진의 크기는 대개 0.05~0.2 μ m이며 디젤분진은 대개 0.2 μ m 정도이고 90% 이상이 1 μ m 이하이다.¹⁹⁾

디젤분진에 대한 연구는 주로 세포 주에서 디젤분진에 대한 반응을 보는 연구가 대부분이며 IL-5 knockout 쥐 모델에서 디젤분진이 기도과민성과 기도염증에 관여한다는 보고가 있지만,²⁰⁾ 디젤분진을 직접 생리적으로 흡입한 동물모델은 드문 실정이다. 이에 저자들은 쥐를 이용하여 디젤분진을 흡입시킨 결과 대조군에 비해 디젤분진 흡입군에서 기도과민성과 기도염증 지표들이 증가함을 확인하였다.

디젤분진에 의한 기도염증은 여러 가지 기전에 의해 설명되고 있다. 많은 연구에서 디젤분진 노출은 면역글로불린 E 및 알레르기성 기도염증을 일으키고 기도과민성을 유발시킨다는 것이 알려져 있다.²¹⁻²³⁾ 또한 천식모델에서 디젤분진을 같이 노출시키면 기관지폐포세척액에서 폐포대식구, 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 활성화됨을 보고되었다.^{24,25)} 본 연구에서도 기존의 연구에서와 같이 디젤분진 노출 쥐의 기관지폐포세척액에서 IL-4 등이 증가되어 디젤분진이 Th2 림프구 사이토카인의 활성화를 통하여 기도염증을 일으킬 가능성이 있음을 알 수 있었다.

디젤분진은 모세혈관세포나 제2형 기도상피 세포를 손상시켜서 폐부종, 호중구 등 세포에 의한 염증반응을 일으킨다.¹⁸⁾ 전자현미경사진에서 디젤분진은 용량과 기간 의존형으로 폐포파괴를 초래한다.²⁶⁾ 장기간 디젤분진 노출에 의해 세포내나 라이소말 효소, 단백질의 증가하고, 콜라겐 합성과 축적이 일어나 폐포벽의 두께 증가, 혈관의 증상, 세포간질의 섬유화가 일어난다.²⁷⁾ 본 연구에서 폐 조직에서의 염증 세포 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 저자들의 연구에서는 디젤분진을 직접 기관에 투입하지 않고 생리적으로 흡입하는 방법을 사용하였고 노출 기간이 짧았던 사실과 관련이 있으리라 생각한다. 따라서 장기적인 디젤분진 노출에 따른 기도조직의 변화는 앞으로 추적되어야 할 것

으로 생각한다.

건강인이 디젤분진에 노출되면 기관지폐포세척액에서 폐포대식구, 호중구, 림프구의 증가가 관찰되었으며 폐조직에 호중구의 증가와 기관조직에 림프구, 비만세포, IL-8 mRNA 발현의 증가가 있고, 이것은 모세혈관의 ICAM-1이나 VCAM-1, 백혈구세포표면의 LFA-1이 관여함이 보고되었다.²⁸⁾ 천식환자에서 디젤분진과 항원을 동시에 노출시킬 때, 케모카인의 증가가 나타나며 이것은 MAP kinase 통로를 통해서 일어난다.¹⁹⁾ 본 연구에서도 기관지폐포세척액에서 호중구, 림프구 등이 증가하는 경향을 보여 호중구, 림프구 등이 기도염증에 관여할 수 있을 것으로 생각된다. Fahy 등²⁸⁾의 결과와 저자들의 결과의 차이는 사람의 단핵구에 디젤분진 노출과 쥐의 기도로 들어간 디젤분진의 반응에 차이가 있을 개연성이 있는 것으로 여겨진다. 또한 기존의 천식이 있는 경우에 대기오염이 천식의 증상 악화에 상승효과를 나타낼 것으로 보여져 디젤분진과 알레르겐 노출에 의한 상승효과에 대한 연구가 요구되며, 동시에 이러한 기전의 메커니즘에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

NO는 IFN- γ 를 분비하는 Th1 림프구를 억제함으로써 상대적으로 IL-5를 분비하는 Th2 림프구의 활성화시켜 알레르기 염증반응을 증가시킨다.^{29,30)} 저자들^{10,32)}의 연구에서도 산화질소가 천식에 관여함을 보고하였고, 집먼지진드기를 폐포대식구에 노출 시 산화질소가 증가되어 알레르겐 자극에 의한 알레르기 염증에 산화질소가 증가됨이 보고되어 iNOS가 관여함이 알려져 있다.³¹⁾ 본 연구에서도 디젤분진 노출 쥐 기관지폐포세척액에서 nitrite가 증가하고 폐조직과 폐포대식구에서 iNOS의 증가를 확인하여 산화질소가 디젤분진 노출 기도염증과 과민성에 관여할 것으로 추측된다.

결론

대기오염 물질 중의 하나인 디젤분진이 동물모델에서 기도염증과 기도과민성을 증가시키는 확인하여 디젤분진이 천식의 발생에 관여하고 이러한 기도염증과 과민성에 산화질소가 관여할 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- 1) Lee SI. The prevalence of asthma in Korean children adulthood, and ISAAC activity. Korean Allergy 1996;16:172
- 2) Jang AS, Yeum CH, Son MH. Epidemiologic evidence of a relationship between airwayhyperresponsiveness and exposure to polluted air. Allergy 2003;58:585-8
- 3) Jang AS, Choi IS, Kim SW, Song BC, Yeum CH, Jung JY. Airway obstruction after ozone exposure in BALB/c mice using

- barametric plethysmography. *Kor J Int Med* 2003;18:1-5
- 4) Folinsbee LJ. Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect* 1993;100:45-56
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Kaiser J. Showdown over clean air science. *Sci* 1997;277:466-9
- 8) Schwartz J. Air pollution and daily mortality. A review and meta analysis. *Environ Res* 1994;64:36-52
- 9) Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 1995;27:389-93
- 10) Jang AS, Choi IS, Lee S, Seo JP, Yang SW, Park KO, et al. Nitric oxide metabolites in induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1136-42
- 11) Liu SF, Haddad E-B, Adcock I, Salmon M, Koto H, Gibbey T, et al. Inducible nitric oxide synthase after sensitization and allergen challenge of Brown Norway rat lung. *Br J Pharmacol* 1997;121:1241-46
- 12) Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;177:1779-84
- 13) Faiz A, Delardere JA. Automotive air pollution in developing countries, outlook and control strategies. *Sci Environ* 1993;134:325-34
- 14) Greenberg SS, Xie J, Spitzer JJ, Wang J, Lancaster J, Grisham MB, et al. Nitro containing L-arginine analogs interfere with assays for nitrate and nitrite. *Life Sci* 1995;57:1949-61
- 15) Draper W. Quantification of nitro and dinitro polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particulate matter. *Chemosphere* 1986;15:437-47
- 16) Scuetzle D, Lewtas J. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. *Anal Chem* 1986;58:1060A-70A
- 17) McClellan RO. Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1987;27:279-300
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) Kobayashi T. Exposure to diesel exhaust aggravates nasal allergic reaction in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:352-6
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996;51:218-20
- 30) Haczku A, Macary P, Haddad EB, Huang TJ, Kemeny DM, Moqbel R, et al. Expression of Th-2 cytokines interleukin-4 and -5 and of Th-1 cytokine interferon-gamma in ovalbumin-exposed sensitized Brown-Norway rats. *Immunology* 1996;88:247-51
- 31) Peake HL, Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS. Nitric oxide production by alveolar macrophages in response to house dust mite fecal pellets and the mite allergens, Der p 1 and Der p 2. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:531-7
- 32) Jang AS, Choi IS, Lee JU, Park SW, Lee JH, Park CS. Changes in the expression of NO synthase isoforms after ozone: the effects of allergen exposure. *Respir Res* 2004;5:1-5