

## 기도 상피세포의 저온 자극 후 재가온이 점액 유전자와 Interleukin 8의 변화에 미치는 영향

관동대학교 의과대학 소아과학교실, 인제대학교 의과대학 소아과학교실\*  
국민건강보험공단 일산병원 소아과<sup>†</sup>, 연세대학교 의과대학 소아과학교실 알레르기 연구소<sup>‡</sup>  
두뇌한국21 의과학사업단<sup>§</sup>

김철홍 · 김우경\* · 장광천<sup>†</sup> · 손명현<sup>‡,§</sup> · 이경은<sup>‡,§</sup> · 김규언<sup>‡,§</sup>

=Abstract=

### Effect of Cooling and Rewarming on Muc Gene and Interleukin 8 Expression in Respiratory Epithelial Cells

Cheol-Hong Kim, M.D., Woo-Kyung Kim, M.D.\* , Kwang-Cheon Jang, M.D.<sup>†</sup>,  
Myung-Hyun Sohn, M.D.<sup>‡,§</sup>, Kyung-Eun Lee, M.Sc.<sup>‡,§</sup> and Kyu-Earn Kim, M.D.<sup>‡,§</sup>

*Department of Pediatrics, College of Medicine, Kwandong University*

*Department of Pediatrics\*, College of Medicine, Inje University*

*Department of Pediatrics<sup>†</sup>, NHIC Ilsan Hospital, Department of Pediatrics<sup>‡</sup> and Institute of Allergy,  
College of Medicine, Yonsei University BK21 Project for Medical Science<sup>§</sup>, Korea*

**Purpose :** Cooling and rewarming have been described to contribute to the pathogenesis of exercise induced asthma. However, little is known about the cellular response to cooling and rewarming of respiratory epithelial cells. Hypersecretion of mucus and allergic inflammation are important pathologic finding of patients who suffered from asthma. We investigated whether cooling and rewarming of respiratory epithelial cells induce mucin gene(MUC5AC, MUC5B) expression and IL-8 production.

**Methods :** NCI-H292(human lung mucoepidermoid carcinoma cell line) cells were cultured in 6 well plates. Experimental groups were preserved at 1°C, 4°C, 18°C and control groups at 37°C for 2 hours. And then both group were kept at 37°C. MUC5AC, MUC5B and IL-8 mRNA expressions were examined by RT-PCR. IL-8 concentration in the cell culture medium after rewarming was measured by ELISA.

**Results :** Cooling and cooling-rewarming stimuli did not increase MUC5AC and MUC5B expression. IL-8 concentration was remarkably decreased in experimental groups after cooling and then markedly increased during first 6 hours. IL-8 concentration of 1°C, 4°C groups were significantly increased compared to control group at 6 hour, of 18°C group at 12 hour and then persisted until 24 hour.

**Conclusion :** Cooling and rewarming stimuli to respiratory epithelial cells did not increase MUC gene expression. However, increased IL-8 production provides evidence of cooling and rewarming induced airway inflammation. Further investigation will be needed to support this result.

**Key Words :** Cooling and rewarming, Interleukin 8, MUC5AC, MUC5B

접수 : 2004년 11월 8일, 승인 : 2004년 12월 10일

이 논문은 2000년도 연세대학교 학술연구비(6-2000-0110)의 지원에 의하여 이루어진 것임

책임저자 : 김규언 서울시 강남구 도곡동 146-92 연세대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 02)3497 3350 Fax : 02)3461 9473 E-mail : kekim@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

기도 온도의 저하 후에 다시 재가온 되는 현상은 운동 유발성 천식의 중요한 기전중의 하나로 생각되어 왔다. 운동 시 과호흡으로 기도 온도의 저하가 초래되고 이후에 기도가 재 가온되면서 혈관의 반응성 울혈과 기도 부종으로 인해 기관지가 좁아진다는 가설이다.<sup>1)</sup> 그러나 이 가설은 기관지 혈관 반응이나 혈액 순환에 미치는 영향을 설명할 수 있었으나 염증성 매개물질에 의한 기관지 염증을 설명하기는 어려운 점이 있었다.<sup>2)</sup> 그러나 최근에 기관지 상피세포를 이용한 저온자극 후 재가온시 IL-8의 증가가 관찰되었다.<sup>3)</sup> 상피세포에서 생성되는 IL-8은 중성구에 대한 강력한 화학주성효과를 나타내고 또한 일부 T 세포와 활성화된 호산구에 대해서도 화학주성을 가져<sup>4)</sup> 기관지 천식의 염증반응에 중요한 역할을 하고<sup>5, 6)</sup> 급성 천식발작에서 증가하고 증상 완화에 감소하는 양상을 보여준다.<sup>7)</sup>

기관지의 염증소견과 점액의 과분비는 천식의 중요한 병리학적 요소로서 점액은 상피세포, 배세포, 점막하 분비선 등에서 형성되어 점막의 보호, 수분공급, 이물질의 제거 등의 중요한 역할을 하지만 천식 등의 만성 호흡기 질환에서는 과분비가 되고 기도폐색이나 치명적 호흡곤란의 증상의 발현에 중요한 역할을 한다.<sup>8-10)</sup> 점액유전자는 현재 17개가 밝혀져 있으며(MUC1-4, 5A, 5B, 6-13, 15-18) 그 중에서 MUC5AC와 MUC5B가 정상인과 천식환자의 기도에서 가장 중요한 점액유전자이며,<sup>11 15)</sup> Th2 사이토카인, 세균 및 바이러스, 흡연 등에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있으나<sup>16)</sup> 기도의 저온자극 후 재가온이 점액유전자의 발현에 미치는 영향은 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 기도상피세포에 저온 자극을 가한 후 재가온 하면서 점액 유전자와 IL-8의 변화와 다양한 온도의 저온 자극에 따른 변

화의 정도를 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 기관지 상피세포 배양

인체 기관지 상피세포주인 NCI-H292 세포를 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다. 세포배양액은 RPMI 1640에 비동화시킨 우태혈청(10%) 과 penicillin(100 U/mL), Streptomycin(100 µg/mL)를 첨가한 용액을 사용하여 37°C, 5%CO<sub>2</sub>하에서 배양하고, 실험을 위하여 6 well plate에 평판하였다. 세포 융합율이 95% 이상 되었을 때 0.2% 우태혈청을 첨가한 RPMI 1640용액으로 교체한 후 24시간 동안 배양하였다.

### 2. 저온 자극과 재가온

실험 전 배지를 교체하고 실험군은 1°C, 4°C, 18°C에, 대조군은 37°C에 2시간동안 놓아둔 후 저온 자극에 대한 효과를 관찰하기위해 배양상층액과 세포를 채취한 후, 37°C로 가온 된 배지로 교체하고 실험군과 대조군을 37°C, 5%CO<sub>2</sub>하에서 계속 배양하면서 1시간, 6시간, 12시간, 24시간에 각각 배양 상층액을 채취하여 -70°C에 보관하여 IL-8 농도 측정하고, 1시간, 6시간 12시간, 24시간에 세포를 채취하여 RNA 추출에 사용하였다.

### 3. 점액소 mRNA 발현을 위한 RT-PCR

Total RNA를 TRIzol(GIBCO BRL)을 이용하여 추출하였고, cDNA는 reverse transcriptase(Perkin Elmer, Roche, Branchburg, NJ)와 random hexamers(Perkin Elmer, Roche, Branchburg, NJ)를 이용하여 합성하였다. PCR을 위한 oligonucleotide primers 는 MUC5AC (5' primer CGACAACACTTCTGCGGTGC; 3' primer GCACTCATCCTTCCTGTGCGTT), MUC5B(5' primer ACTCCAGAGACTGTCC

ACAC; 3' primer TACCACTGGTCTGTGTGCTA)를 사용하였고 대조유전자로  $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ M, 5' primer CTCGCGCTACTCTCTTTCTGG; 3' primer GCTTACATGTCTCGATCCCCTAA)을 이용하였다.

#### 4. IL-8 농도 측정

실험군과 대조군에서 얻은 배양 상층액으로 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kits(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)를 이용하여 IL-8의 농도를 측정하였다. ELISA kit의 측정 가능 최저 농도는 25.6 pg/mL이었다.

#### 5. 통계 분석

결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군간의 비교는 분산분석법(ANOVA)으로 하였으며  $P<0.05$ 를 유의한 수준으로 판단하였다.

### 결 과

#### 1. MUC 5AC 와 5B 유전자의 발현

##### 1) 저온 자극의 영향

1°C, 4°C, 18°C로 저온 자극한 후 채취한 세포에서 MUC5AC와 MUC5B 유전자 발현의 변화가 관찰되지 않았다.(Fig. 1)

##### 2) 저온 자극후 재가온의 영향

1°C, 4°C, 18°C로 저온 자극한 다음 37°C로 재가온 후 1시간, 6시간, 12시간, 24시간이 경과한 후에도 대조군과 비교하여 MUC5AC와 MUC5B

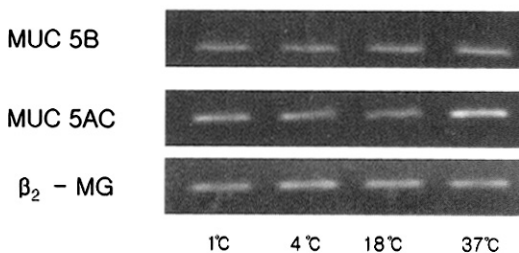


Fig. 1. Effect of cooling on expression of MUC5AC and MUC5B in NCI-H292 cells.  $\beta_2$ -MG,  $\beta_2$ -microglobulin.

유전자 발현의 증거는 없었다. 그림은 4°C 노출 후 재가온한 세포에서의 유전자 발현 양상이다.(Fig. 2)

#### 2. IL-8 의 변화

##### 1) 저온 자극의 영향

1°C, 4°C, 18°C의 저온 자극 후 배양상층액에서 측정된 IL-8의 농도는 각각  $45.4\pm 14.8$  pg/mL,  $47.4\pm 25.0$  pg/mL,  $126.8\pm 18.2$  pg/mL 이었고, 대조군은  $595.5\pm 126.0$  pg/mL이었으며 1°C, 4°C, 18°C의 저온 자극 후 대조군에 비해 현저히 감소하는 양상을 보였다( $P<0.05$ ). 그러나 1°C, 4°C, 18°C군 간의 유의한 차이는 없었다.(Fig. 3)

##### 2) 저온 자극후 재가온의 영향

1°C, 4°C, 18°C의 저온 자극 후 재가온 후 1시

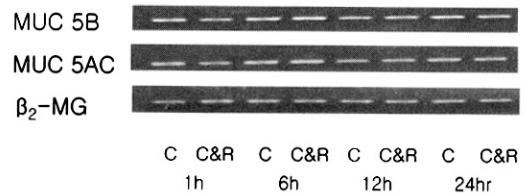


Fig. 2. Effect of cooling(4°C) and rewarming on expression of MUC5AC and MUC5B in NCI-H292 cells.  $\beta_2$ -MG,  $\beta_2$ -microglobulin; C, control; C&R, cooling and rewarming.

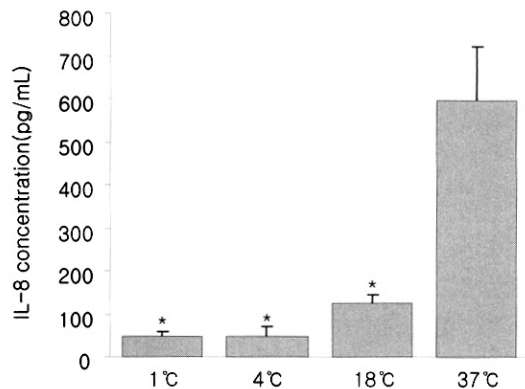


Fig. 3. Effect of cooling on IL-8 concentration in the medium of NCI-H292. Results are expressed as the mean±SD of six experiments. \* $P<0.05$  vs. control(37°C).

간에 배양상층액에서 측정된 IL-8의 농도는 각각  $91.6 \pm 48.4$  pg/mL,  $52.9 \pm 37.8$  pg/mL,  $230.3 \pm 78.7$  pg/mL 이었고 대조군은  $449.1 \pm 62.8$  pg/mL로 대조군보다 현저한 감소가 지속 되었으나 6시간 경과 후에는 1°C, 4°C, 18°C, 대조군에서 각각  $1136.6 \pm 95.2$  pg/mL,  $1066.9 \pm 89.8$  pg/mL,  $988.3 \pm 244.4$  pg/mL,  $755.4 \pm 43.5$  pg/mL으로 1°C, 4°C, 18°C군에서 대조군보다 증가하였고 이후에는 서서히 증가하여 24시간 후에는 1°C, 4°C, 18°C, 대조군에서 각각  $1474.3 \pm 115.4$  pg/mL,  $1244.8 \pm 231.9$  pg/mL,  $1203.2 \pm 161.5$  pg/mL,  $809.3 \pm 80.9$  pg/mL로 증가하는 양상을 보였다. 1°C, 4°C군은 6시간 후부터, 18°C군은 12시간부터 대조군에 비해 유의하게 증가하는 양상을 보여 주었다( $P < 0.05$ ) 저온 자극의 온도의 낮아수록 IL-8이 재가온시 더 증가하는 양상을 보였으나, 유의한 차이는 없었다.(Fig. 4)

## 고 찰

기도 표면의 점액은 수분, 전해질, 폐 분비물, 혈장 성분, 점액소로 이루어지는데, 점액소는 점액 유전자(MUC gene)와 glycosyltransferase 유전자 각각의 산물인 단백질 backbone과 O-

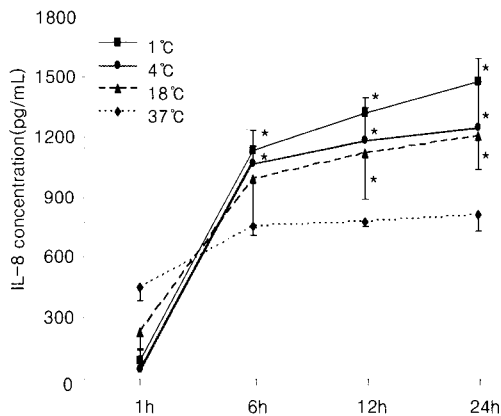


Fig. 4. Time course of IL-8 concentration in the medium after rewarming. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of six experiments. \* $P < 0.05$  vs. control(37°C).

glycosides로 구성된 glycoconjugates이며, 점액의 가장 중요한 구성요소이다. 점액은 이러한 유전자들이 조절되어 점액이 형성되고 과립에 저장된 후에 분비된다.<sup>17)</sup> 천식을 포함한 대부분의 염증성 호흡기 질환에서 점액의 분비가 현저히 증가하며 천식의 악화에도 관련이 있으며,<sup>18)</sup> 경한 천식에서도 기관지 상피세포에서 점액의 증가가 관찰되며<sup>11)</sup> 이것은 점액 유전자의 발현 증가와 밀접한 관련이 있다.<sup>16)</sup> 따라서 점액 유전자 발현을 자극하는 인자를 밝히고 조절하는 기전을 이해하는 것은 호흡기 질환의 병인과 임상적 양상을 이해하는데 매우 중요하다. 기도의 중요한 점액 유전자인 MUC5AC 또는 MUC5B는 알레르겐으로 처리한 쥐의 폐에서 발현이 증가되고,<sup>19)</sup> Th2 사이토카인인 IL-4,<sup>20)</sup> IL-13,<sup>21, 22)</sup> IL-9<sup>23, 24)</sup> 등에 의해 증가하며 reactive oxygen species,<sup>25)</sup> lipopolysaccharide,<sup>26)</sup> retinoic acid,<sup>27)</sup> epidermal growth factor와 transforming growth factor- $\alpha$ <sup>28)</sup> 등에 의해서도 발현이 증가하며, 점액유전자 전사의 활성화는 자극에 따라 다양한 경로로 이루어지지만 protein tyrosine kinase c-Src, MAP kinase kinase MEK 1/2, NF- $\kappa$ B가 세포내 신호 체계에 중요하다고 알려져 있다.<sup>18)</sup> 본 연구에서는 저온 노출의 영향을 보기위해 기관지 상피세포를 저온에 노출시킨 후 MUC5AC와 MUC5B의 변화를 관찰하였고 다시 재가온이 된 상황에서 시간 경과에 따른 변화를 관찰하였다. 기관지 상피세포를 1°C, 4°C, 18°C에 각각 2시간 동안 노출시킨 후에 점액 유전자의 발현 증가를 볼 수 없었으며 다시 재가온 하면서 6, 24시간 후에도 의미 있는 변화를 관찰하지는 못했다. 저자들은 예비실험에서 30분, 60분 동안의 저온 자극을 둔 후 시행한 실험에서도 변화를 관찰하지 못했다. 본 연구에서 저온 자극의 정도와 시간이 적절하지 못했을 가능성도 있지만 본 연구의 결과로는 저온 자극 후 재가온이 MUC5AC와 MUC5B의 발현에 큰 영향을 주는 것 같지는 않다.

IL-8은 단핵구, 대식세포, 비만세포, 섬유모세포, 중성구, 내피세포와 기관지 상피세포 등에서 분비되어 특히 중성구에 강한 화학주성을 보이는 매개 물질이다. IL-8은 천식환자의 기관지상피세포에서 생성이 증가되고,<sup>29)</sup> tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , platelet activating factor 등에 의해서 기관지 상피세포에서 발현이 증가되며<sup>30)</sup> 기도의 염증반응에 중요한 역할을 한다. 특히 운동 유발성 천식의 후기반응에서 기도 분비물에 중성구와 호산구들이 관찰되어<sup>31)</sup> IL-8은 후기반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. Gon 등<sup>3)</sup>은 NCI-H292세포를 1°C에 1시간동안 놓아둔 후 37°C로 가온된 배지와 환경에서 계속 배양하면서 시행한 실험에서 24시간 후 IL-8가 대조군에 비해 유의하게 증가함을 보여 주고 있으며, 저온에 노출되는 기간이 30분과 90분인 경우 IL-8의 증가가 없었다고 하였으며, 저온에 노출되는 시간이 중요하다고 하였다. 그러나 본 저자들은 2시간 동안 노출시켜 시행한 실험에서 IL-8의 증가를 관찰 할 수 있었고, Hashimoto 등<sup>32)</sup>도 2시간동안 1°C에 노출한 다음 재가온 후에 IL-8의 증가를 보고하였다. 이들은 NCI-H292 세포를 고장성 용액에 노출시킨 후와 저온 후 재가온 시킨 후에 각각 IL-8과 RANTES의 증가를 관찰하였으며 이것은 dipropionate와 budesonide를 전처치한 경우에는 전처치한 농도에 비례해서 IL-8과 RANTES의 증가가 차단되는 것을 보여 주었다. Inoue 등<sup>33)</sup>은 파리세포주인 A549 세포를 이용한 장기이식시 장기손상에 관련된 연구에서 5시간동안 4°C에 노출 후 37°C로 재가온 시켰을 때 1-3시간 사이에 IL-8의 농도가 급격히 증가하는 양상을 보여 주었다. 본 연구에서도 재가온 1-6시간 사이에 IL-8가 급격히 증가하여 6시간 후에는 1°C와 4°C에 노출된 군에서, 12시간 후부터는 18°C에 노출된 군에서 대조군보다 유의하게 증가하였으며 48시간에 측정된 IL-8의 거의 대부분은 1-6시간 동안 분비되는 양상을 보였다. 본 연구에서

는 다양한 저온 온도에 노출시킨 후 IL-8의 변화를 관찰하였는데 온도에 따른 유의한 차이는 없었으나 낮은 온도에 노출된 경우에 IL-8이 더 많이 증가하는 양상을 보여 주어 저온과 재가온의 온도차이가 IL-8의 분비를 자극하는 데 중요한 역할을 할 수도 있다는 것을 보여 주었다.

본 연구에서 저온 자극 후 재가온이 점액 유전자의 발현의 증가를 보여 주지는 못했지만 IL-8의 변화에는 영향을 주었고 IL-8은 어느 정도는 노출 온도에 영향을 받고 있음을 보여 주고 있다. 그러나 실제 운동유발성 천식이 있는 환아에서 과호흡을 하더라도 기도 온도 저하는 그리 크지 않아 기도의 온도 변화와 기관지 염증반응에 대한 추가연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

**목적:** 기도의 열 손실 후 재 가온은 운동 유발성 천식의 가설의 하나로 제시되어 왔다. 기관지의 염증소견과 점액의 과분비는 천식의 중요한 병리학적 요소로서 점액의 과분비는 치명적인 천식과 천식의 악화에 관련이 있으며 기관지 상피세포에서 분비되는 IL-8은 기관지 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 그러나 기관지 상피세포의 온도 변화에 대한 세포반응에 관해서는 거의 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 배양된 기관지 상피세포를 저온 자극 후 재 가온이 기도의 주 점액유전자인 MUC5AC, MUC5B의 발현과 IL-8의 변화에 미치는 영향을 보고자 하였다.

**방법:** 기관지 상피세포주인 NCI-H292 세포를 배양한 후 실험군은 1°C, 4°C, 18°C에, 대조군은 37°C에 2시간동안 놓아둔 후에 세포에서 RNA와 배양상층액을 채취하고 이후 37°C에서 계속 배양하면서 재가온 1, 6, 12, 24시간 후 채취된 세포에서 RNA를 채취한 후 RT-PCR을 이용해 MUC5AC와 MUC5B, IL-8 유전자의 발현을 관찰하였고, 재가온 1, 6, 12, 24시간 후에 채

취한 배양상층액에서 IL-8의 농도를 측정하였다.

**결 과**: 저온 자극 직후와 재가온 후 1, 6, 12, 24시간에 MUC5AC, MUC5B의 발현은 대조군에 비해 증가하지 않았다. IL-8은 저온자극 후 현저히 감소하는 양상 보였으며 1시간이후 6시간까지 급격히 증가하여 1°C, 4°C 군은 6시간 후부터, 18°C 군은 12시간부터 대조군에 비해 유의하게 증가하는 양상을 보여 주었다. 저온 자극의 온도가 낮을수록 IL-8이 재가온시 더 증가하는 양상을 보였으나 유의한 차이는 없었다.

**결 론**: 기관지 상피세포에 대한 저온자극 후 재가온은 점액 유전자의 발현에는 영향을 주지 못했으나 IL-8을 증가시켜, 기관지 상피세포의 저온자극 후 재가온으로 기관지 염증 반응이 초래될 수 있을 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 1) McFadden ER Jr. Exercise-induced airway obstruction. *Clin Chest Med* 1995;16:671-82.
- 2) Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:453-9.
- 3) Gon Y, Hashimoto S, Matsumoto K, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. Cooling and Rewarming-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 MAP kinase-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:156-60.
- 4) Polito AJ, Proud D. Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:714-8.
- 5) Marini M, Vittori E, Hollebomberg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1257-67.
- 6) Bellini AH, Yoshimura E, Vittori M, Marini M, Mattoli S. Bronchia epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:412-24.
- 7) Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:769-74.
- 8) Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takshima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101:916-21.
- 9) Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J* 1996;9:709-15.
- 10) Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 1996;9:1395-401.
- 11) Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:517-523.
- 12) Fahy JV. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest* 2002;122:320S-6S.
- 13) Hovenberg HW, Davies JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J* 1996;13:839-47.
- 14) Thronton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. Evidence for a cysteine-rich sequence repeated within the molecule. *J Biol Chem* 1997;272:9561-6.
- 15) Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998;334:685-693.
- 16) Basbaum C, Lemjabbar, Longphre M, Li D,

- Gensch E, McNamara N. Control of Mucin Transcription by diverse injury-induced signaling pathways. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;160:S44-8.
- 17) Rose MC. Mucins: structure, function, and role in pulmonary disease. *Am J Physiol* 1992;263:L413-L29.
  - 18) Openshaw PJM, Turner-Warwick M. Observations on sputum production in patients with variable airflow obstruction: implications for the diagnosis of asthma and chronic bronchitis. *Respir Med* 1989;83:25-31.
  - 19) Alimann MZ, Piazza FM, Selby DM, Letwin N, Luang L, Rose MC. Muc-5/5ac mucin, messenger RNA and protein expression are markers of goblet-cell metaplasia in murine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22: 253-60.
  - 20) Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki I, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunology* 1999;162: 6233-7.
  - 21) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282:2258-61.
  - 22) Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Bronbacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282: 2261-3.
  - 23) Longpre M, Li D, Gallup M, Drori E, Ordonez CL, Redman T, et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1375-82.
  - 24) Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renaud JC, Levitt RC, et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:649-56.
  - 25) Takeyama K, Dabbagh K, Shim JJ, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA. Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 2000;164:1546-52.
  - 26) Li JD, Feng W, Gallup M, Kim JH, Gum J, Kim Y, et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-p90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5718-23.
  - 27) Koo JS, Jetten AM, Belloni P, Yoon JH, Kim YD, Nettekheim P. Role of retinoid receptors in the regulation of mucin gene expression by retinoic acid in human tracheobronchial epithelial cells. *Biochem J* 1999;338:351-7.
  - 28) Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3081-6.
  - 29) Marini M, Vittori E, Lollemberg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colon-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1001-9.
  - 30) Matsumoto K, Hashimoto S, Gon Y, Nakayama T, Horie T. Proinflammatory cytokine-induced and chemical mediator-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:825-31.
  - 31) Crimi E, Balbo A, Milanese M, Miadonna A, Rossi GA, Brusasco V. Airway inflammation and occurrence of delayed bronchoconstriction in exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:507-12.
  - 32) Hashimoto S, Gon Y, Matsumoto K, Takeshita I, Maruoka S, Horie T. Inhalant corticosteroids inhibit hyperosmolarity-induced, and cooling and rewarming induced interleukin-8 and RANTES production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1075-80.
  - 33) Inoue K, Suzuki S, Kubo H, Ishida I, Ueda S, Kondo T. Effects of rewarming on nuclear factor- $\kappa$ B and interleukin 8 expression in cold-preserved alveolar epithelial cells. *Transplantation* 2003;76:409-15.