

인체 기관지 상피세포에서 *Mycoplasma pneumoniae* 항원이 IL-8 유전자 발현에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 인제대학교 의과대학 소아과학교실*,
국민건강보험공단 일산병원 소아과[†], 고신대학교 의과대학 미생물학교실[‡]

손명현 · 이경은 · 최성연 · 권병철 · 김우경* · 장광천[†] · 장명웅[‡] · 김규언

=Abstract=

Effect of *Mycoplasma pneumoniae* on IL-8 Gene Expression in Human Respiratory Epithelial Cells

Myung Hyun Sohn, M.D., Kyung Eun Lee, MSC., Sung Yeon Choi, M.D.,
Byung Chul Kwon, M.D., Woo Kyung Kim, M.D.* , Gwang Cheon Jang, M.D.[†],
Myung Woong Chang, Ph.D.[‡] and Kyu-Earn Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Department of Pediatrics*,
Inje University College of Medicine, Department of Pediatrics[†], NHIC Ilsan Hospital,
Department of Microbiology[‡], College of Medicine, Koshin University, Korea

Purpose : *Mycoplasma pneumoniae* is a common cause of lower respiratory disease. Several studies have suggested that *M. pneumoniae* respiratory infection is associated with reactive airway disease and asthma. It has been suggested that Interleukin-8(IL-8) has a role in the pathogenesis of allergic inflammation of bronchial asthma and is well known to be expressed in bronchial epithelial cells.

Methods : In this study, we examined the effect of *M. pneumoniae* extract and the role of mitogen-activated protein kinases(MAPKs) on IL-8 expression in human lung epithelial cells. IL-8 levels were determined by an enzyme linked-immunosorbent assay. Extracellular signal-regulated kinase(ERK) phosphorylation was assessed by western blotting.

Results : In A549 cells, *M. pneumoniae* extract induced IL-8 release in a time- or dose-dependent manner. Pretreatment with PD98059, which blocks the activation of MAPK/ERK kinase 1, before *M. pneumoniae* extract stimulation inhibited the increase in the production of IL-8 by 64.4% at 25 M. Stimulation of A549 cells by extract caused an increase in the activity of ERK, compared with the non-stimulated cells. The extract stimulation had no effect on the activities of p38.

Conclusion : These observations suggest that activation of ERK by *M. pneumoniae* extract may be one of the mechanisms that result in the increase of the production of IL-8.

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae*, Interleukin-8, Respiratory epithelial cells

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(01-PJ10-PG6-01GM03-0002).

접수: 2004년 2월 19일, 승인: 2004년 3월 13일

책임저자: 김규언 서울시 강남구 도곡동 146-92

연세의대 영동세브란스병원 소아과

Tel: 02)3497-3353 Fax: 02)3461-9473

E-mail: kekim@yumc.yonsei.ac.kr

서론

*Mycoplasma pneumoniae*는 세포막이 없는 균으로 기도점막의 상피세포에서 증식하면서 폐

렴, 인후염, 부비동염, 중이염 등의 호흡기질환을 일으키며 중추신경계, 피부, 관절, 신경 및 혈관 등에 합병증을 나타낼 수 있다.¹⁾ 또한 호흡기감염은 제 1형 과민 반응에 의한 기도 폐색으로 인하여 천명 및 기도과민반응의 주원인이 되고 기관지 천식을 유발한다고 알려져 있다.²⁾ Berkovich 등은 *M. pneumoniae* 폐렴시 정상아에서 천명을 동반할 수 있고 천식을 가진 경우 천식을 악화시킬 수 있다고 하였으며 84명의 소아 천식 환자 중 천식의 발작시 32.1%에서 *M. pneumoniae* 혹은 바이러스 감염을 증명할 수 있었다.³⁾ 또한 Yang 등은 *M. pneumoniae*로 인체 기관지 상피세포를 감염시켰을 때 interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-1 β 등의 염증 전구 cytokine들의 생성이 증가된다고 하였다.⁴⁾

IL-8은 CXC chemokine subfamily에 속하며 기도에서 염증부위의 세포이동을 매개하는 chemokine으로 주공급 세포는 기관지 상피세포로서⁵⁾ 알레르기 염증 반응에 밀접한 관련을 가진다. IL-8은 천식 환자의 기관지 상피세포에서 발현이 증가되어 있으며,⁶⁾ *Der p 1*, *Der p 9*과 같은 집먼지진드기 단백질 분해항원(proteolytic allergen)⁷⁾이나 ragweed 등의 화분⁸⁾으로 기관지 상피세포 자극시에도 생성이 증가된다.

본 연구에서는 기관지 상피세포에 *M. pneumoniae* 항원을 자극했을 때 IL-8 유전자의 발현과 그 신호전달경로를 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. *Mycoplasma pneumoniae* 항원

고신대학교 미생물학교실에서 확보하여 보관 중인 *M. pneumoniae* 균주를 Chanock 증균배지 5 mL에 접종하여 5-7일간 배양하였다. 배양된 균액을 증균용 배지 100 mL, 1000 mL, 4,000 mL 순으로 증균시켜 이를 20,000 g에서 1시간 원침하였다. 상층액을 제거한 후 균체들만

을 다시 phosphate-buffered saline(PBS)으로 3회 씻은 다음 20 mL의 PBS로 부유시켰다. 균 부유액을 100 watt에서 10분간 초음파처리한 후 단백질 농도를 측정하였다. 항원 내에 endotoxin 유무를 확인하기 위하여 Limulus amoebocyte assay(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 시행하였다.

2. 기관지 상피세포 배양

기관지 상피세포주인 A549 세포(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)를 평판하여 배양액으로 Ham's F-12 medium을 사용하고 10% fetal calf serum, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μ g/mL) 등을 배양액에 추가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하고 배양액은 3-4일 간격으로 갈아주었다. 90-100%의 합류(confluency)를 이루는 시점에서 세포들을 분리하여 6 well culture plate에 충분히 분화할 때까지 배양 후 0.5% fetal calf serum이 포함되지 않은 DMEM 배지에서 24시간 배양 후 PBS로 세척하였다. 다양한 농도의 *M. pneumoniae* 항원을 노출시킨 후 이들을 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 여러 시간 간격으로 배양하여 세포와 배양상층액을 수거하였다. 수거된 배양 상층액은 300 g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 세포와 함께 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3. IL-8 단백질의 측정

IL-8치는 ELISA kit(R & D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였고 이미 알고 있는 농도의 표준곡선에 의하여 농도를 계산하였다. 검사의 민감도는 10 pg/mL 이하였다. 또한 신호전달경로를 밝히기 위한 실험으로 ERK inhibitor인 PD98059(25 μ M), p38 inhibitor인 SB202190(25 μ M, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)을 A549 세포에 30분간 전처리한 후 *M. pneumoniae* 항원을 노

출시켰다.

4. IL-8 mRNA 검색을 위한 역전사 효소중합 연쇄반응

배양된 A549 세포에서 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 추출한 3 µg의 total RNA를 100 µg/µL random hexamer 1 µL와 200 U의 Superscript II 역전사효소(GibcoBRL, MD, USA)와 함께 42°C 50분, 80°C 10분간 반응시켜 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 10 mM Tris(pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM씩의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 그리고 25 pmol씩의 sense primer와 antisense primer가 포함된 100 µL의 buffer에서 Taq DNA 중합효소(Takara, Shiga, Japan)를 첨가하여 PCR thermal cycler로 증폭시켰다. Cycle의 총 횟수는 35회로 시행한다. 효소중합 연쇄반응 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동한 뒤 ethidium bromide 염색으로 확인하였다. IL-8 mRNA 검색을 위한 primer sequence는 sense 5'-AGA TAT TGC ACG GGA GAA-3', antisense 5'-GAA ATA AAG GAG AAA CCA-3', GAPDH는 sense 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', antisense 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'였다.

5. MAP kinase 활성 분석(*in vitro* kinase assay)

p44/42와 p38 MAPK assay kit(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 제품설명서에 따라 기관지 상피세포를 용해시킨 후 인산화된 p44/42 또는 p38 MAPK를 면역침전시켰다. 그 후 *in vitro* kinase 반응으로서 activating transcription factor-2(ATF-2) 인산화 반응을 거친 후 반응혼합물을 SDS polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고 membrane에 이동시킨 후 phospho-ATF-2 항체를 이용하여 표지하고 en-

hanced chemiluminescence(ECL) 발색에 의해 ATF-2 인산화정도를 측정하였다.

6. 통계 처리

통계처리는 SPSS 11.0 program을 이용하여 MAP kinase inhibitor에 의한 IL-8 생산을 비교하기 위해 t-test를 사용하였고 신뢰구간은 95%를 유의성의 한도로 보았다.

결 과

1. *Mycoplasma pneumoniae* 항원의 endotoxin 측정

Limulus amoebocyte assay를 사용하였을 때 *M. pneumoniae* 항원내의 endotoxin은 음성 반응을 보였다.

2. 기관지 상피 세포의 IL-8 생산

배양한 A549 세포에 *M. pneumoniae* 항원(5 µg/mL)을 노출시켰을 때 시간이 경과함에 따라 1시간 후 1.61±1.34 pg/mL, 2시간 후 3.47±1.53 pg/mL, 6시간 후 15.64±3.70 pg/mL, 10시간 후 49.24±18.90 pg/mL, 24시간 후 384.26

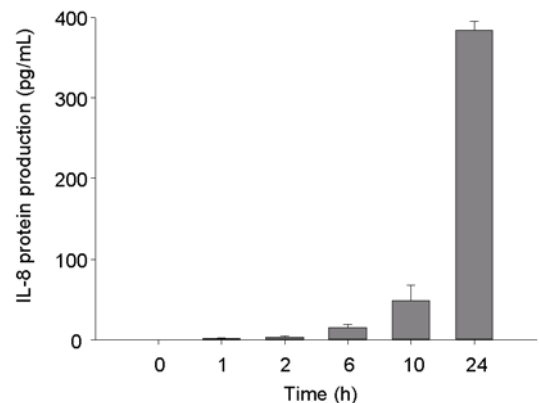


Fig. 1. Time-dependent production of IL-8 protein. A549 cells were stimulated with 5 µg/mL *Mycoplasma pneumoniae* antigen at 37°C. After incubation, culture supernatants were collected and assayed for IL-8 by ELISA. The data represent the mean±SEM from four separate experiments.

± 10.77 pg/mL로 IL-8의 생성이 증가되었다. (Fig. 1) 다양한 농도의 *M. pneumoniae* 항원 투여 10시간 후 IL-8 생성은 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 29.94 ± 14.15 pg/mL, 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 49.24 ± 18.9 pg/mL, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 242.52 ± 28.9 pg/mL로 역시 증가됨을 관찰할 수 있었다. (Fig. 2)

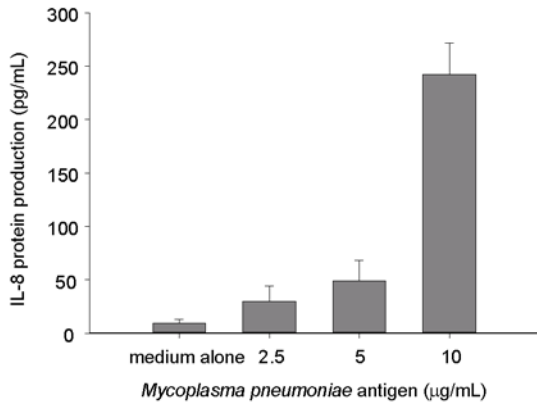


Fig. 2. Dose-dependent production of IL-8 protein. A549 cells were stimulated with different concentrations of *Mycoplasma pneumoniae* antigen (2.5–10 $\mu\text{g/mL}$) or medium alone at 37°C for 10 h. After each incubation, culture supernatants were collected and assayed for IL-8 by ELISA. The data represent the mean \pm SEM from four separate experiments.

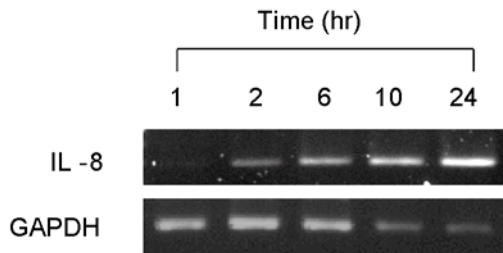


Fig. 3. Induction of IL-8 mRNA expressions in human lung epithelial cells during *Mycoplasma pneumoniae* antigen stimulation. Cells were stimulated with *Mycoplasma pneumoniae* antigen (5 $\mu\text{g/mL}$) or medium alone at 37°C. After each incubation, total RNA was extracted. The RT-PCR products were run on agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized with UV light. GAPDH was used as an internal control.

3. 기관지 상피 세포의 IL-8 mRNA 발현 유도

배양한 A549 세포에 *M. pneumoniae* 항원 5 $\mu\text{g/mL}$ 을 노출시켰을 때 시간이 경과함에 따라 IL-8 mRNA 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. (Fig. 3)

4. *M. pneumoniae* 항원에 의한 IL-8 생산에서 MAP kinase의 역할

배양한 A549 세포에 *M. pneumoniae* 항원 5 $\mu\text{g/mL}$ 을 24시간 노출시키고 상층액에서 측정된 IL-8치는 384.26 ± 10.76 pg/mL였다. ERK inhibitor인 PD98059를 30분간 전처리하고 항원을 자극한 세포의 상층액에서 측정된 IL-8치는 137.85 ± 8.9 pg/mL로 64.4%의 유의한 감소를 보였다. ($P < 0.05$) 그러나 p38 inhibitor인 SB 202190를 전처리 하였을 때의 IL-8치는 354.22 ± 18.9 pg/mL로 의미있는 감소를 보이지 않았

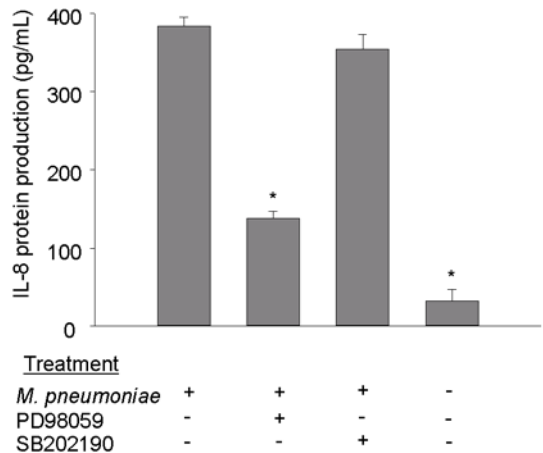


Fig. 4. Effect of MAPK inhibitors on *Mycoplasma pneumoniae* antigen-induced IL-8 release from human lung epithelial cells. A549 cells were preincubated with PD 98059 (25 μM) or SB 202190 (25 μM) for 30 min at room temperature before the addition of 5 $\mu\text{g/mL}$ *Mycoplasma pneumoniae* antigen. After 24 h of culture, supernatants were collected and evaluated for IL-8 presence. The data represent the mean \pm SEM from four separated experiments. * $P < 0.05$ versus *Mycoplasma pneumoniae* antigen alone.

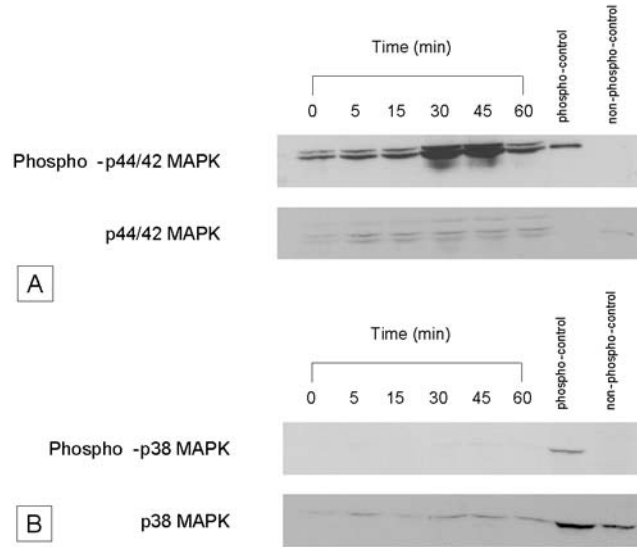


Fig. 5. The activity of p44/42 MAPK(A) and p38 MAPK(B), in A549 cells. Cells(0.5×10^6) were stimulated with *Mycoplasma pneumoniae* antigen($5 \mu\text{g/mL}$) for various time.

다.(Fig. 4)

5. *M. pneumoniae* 항원에 의한 MAP kinase 활성 분석

배양한 A549 세포에 *M. pneumoniae* 항원 $5 \mu\text{g/mL}$ 을 노출시키고 p44/42와 p38 MAP kinase의 활성을 분석한 결과 p44/42 MAP kinase의 활성도가 30, 45분에 최고점을 보이며 증가됨을 관찰할 수 있었다.(Fig. 5A) 그러나 p38 MAP kinase의 활성도는 증가되지 않았다.(Fig. 5B)

고 찰

본 연구에서는 *M. pneumoniae* 항원으로 기관지 상피세포를 자극했을 때 시간이 경과함에 따라 IL-8 단백질의 생성이 증가되었고 농도의 증가에 따라서도 IL-8 생성이 역시 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 시간이 경과함에 따라 IL-8 mRNA 발현도 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과들로 인하여 *M. pneumoniae* 항원이 기관지 상피세포를 직접 자극하여 IL-8 생성

에 기여함을 알 수 있었다.

이러한 IL-8 생성과 MAP kinase와의 연관성을 밝히기 위하여 PD98059, SB 202190로 30분간 전처리한 후 *M. pneumoniae* 항원으로 A549 세포를 자극한 실험에서는 ERK가 *M. pneumoniae* 항원에 의한 IL-8 생성의 신호전달경로에 관여함을 알 수 있었다.

*Mycoplasma pneumoniae*는 세포막이 없는 균으로서 주로 소아와 젊은 성인에서 폐렴을 포함한 급성 호흡기질환을 일으키는 병원체로 알려져 있으나 영유아에서도 감염될 수 있으며 호흡기 뿐 아니라 혈액, 위장관, 신경, 피부계 등을 침범하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 국내에서도 *M. pneumoniae* 폐렴 환자 중 영유아의 빈도가 23.3%를 차지하며 연장아와 비교하여 임상 증상 및 검사 소견에서 차이가 없다고 보고되고 있다.⁹⁾ 급성 천식 발작 환자 중 20-25%의 기관지에서 *M. pneumoniae*가 검출되며^{10, 11)} *M. pneumoniae* 감염시 기관지 과민성이 있는 경우 정상 아동에 비해 천명의 빈도가 더 높게 나타난다.¹²⁾ 또한 천명 등의 특별한 호흡기 증상이

없는 경우도 하기도 말단의 기관지 수축이나 폐 기능 장애를 관찰할 수 있었고¹³⁾ 기관지 과민성이 계속 유지되었다.¹⁴⁾ 이러한 기관지 과민성은 바이러스 감염에서와 같이 제 1형 과민 반응에 의한 기도 폐색에 의해 가능하며¹⁾ 그 기전으로는 기도의 직접 손상으로 인한 cholinergic afferent fiber의 과민성, β -adrenergic 기능의 감소, 기도 상피 손상, 특히 IgE 항체의 생산, 화학 매체 방출의 변화 등이 관여할 수 있다.¹⁵⁾

정상인의 말초혈액 단핵구를 *M. pneumoniae*와 함께 배양했을 때 IL-1 β , IL-2, IL-6와 TNF- α 가 증가하였고,¹⁶⁾ *M. pneumoniae* 폐렴 환자의 기관지 폐포 세척액 검사상 IL-4 치와 IL-4/IFN- γ 비가 유의하게 증가되어 TH2 like cytokine 반응을 보였다.¹⁷⁾ 또한 BALB/c mice를 이용한 *M. pneumoniae* 폐렴 모델의 폐와 비장에서 TNF- α , interferon(IFN)- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10이 발현되었고,¹⁸⁾ 기관지 폐포 세척액 검사상 TNF- α , IFN- γ , IL-6, cytokine-induced neutrophil chemoattractant(KC, 기능적으로 IL-8), macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α , monocyte chemotactic protein(MCP)-1/JE 수치가 현저하게 증가하지만 IL-4, IL-10의 농도는 현저한 증가를 보이지 않았으며,¹⁹⁾ 기관지 유발시험상 기관지 과민성을 유발하면서 조직내 IFN- γ 수치가 유의하게 감소하였다.²⁰⁾ 또한 *M. pneumoniae* 감염이 epithelial neutral endopeptidase를 억제하여 tachykinin과 bradykinin의 증가로 인해 기관지 수축과 과민성이 유발된다²¹⁾는 결과가 보고되었지만 *M. pneumoniae*가 인체내 호흡기로 들어왔을 때 기관지 상피세포의 변화 및 기능, 신호 전달 경로 등에 대한 병인 기전은 아직 알려져 있지 않다.

IL-8은 CXC chemokine subfamily에 속하며 기도에서 염증부위의 세포이동을 매개하는 chemokine으로 호중구와 호산구에 대한 화학주성을 가진다.²²⁾ 주공급 세포는 기관지 상피세포

로서⁵⁾ 낭포성 섬유증²³⁾이나 기관지 천식의 알레르기 염증 반응과 밀접한 관련을 가진다. 최근 세포내 신호전달경로에 대한 많은 연구가 진행되면서 기관지 상피세포에서도 mitogen-activated protein(MAP) kinase가 중요한 역할을 수행하는 것이 밝혀지고 있다.

이제까지는 IL-8 유전자 조절에 미치는 신호 전달경로로서 주로 NF- κ B, JNK, p38 등의 역할에 대해 연구가 되어져 왔으나 ERK의 역할은 많이 알려져 있지 않은 실정이다. 그러나 PD 98059나 U0126 등의 ERK inhibitor들이 ERK가 IL-8 유전자 발현에 관여함을 밝히는데 기여하였고²⁴⁾ Holtmann 등은 ERK의 생리적 activator인 EGF가 JNK와 NF- κ B 등의 신호전달 경로와는 독립적으로 IL-8 생산을 유도한다고 보고하였다.²⁵⁾ 또한 ERK의 구조적으로 활성화된 mutant form의 발현이 일부 IL-8 transcription을 유도하기는 하지만 유의있는 IL-8 단백질 생산을 유도하지는 못한다고 한다. 이러한 결과들은 ERK 신호전달경로가 NF- κ B 또는 다른 신호전달경로를 자극하여 IL-8 생산에 기여한다는 사실을 의미한다.

따라서 앞으로의 연구에서는 *M. pneumoniae* 항원이 호흡기로 들어왔을 때 인체 기관지 상피세포에서 어떠한 경로를 통하여 ERK 신호전달 경로를 활성화시키고, 활성화된 ERK가 실제로 단백질 생산과정에서 IL-8 유전자 promoter의 어떤 부위에서 어떤 transcription factor를 활성화시켜 IL-8 단백질을 생산하는 지에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

목 적 : *Mycoplasma pneumoniae*는 기도 점막의 상피세포에서 증식하면서 호흡기 질환을 일으키며 기관지 천식의 발생이나 악화와 관계된다고 알려져 있다. IL-8은 기도에서 염증부위의 세포이동을 매개하는 chemokine으로 기관

지 천식의 알레르기 염증 반응에 밀접한 관련을 가진다. 본 연구에서는 기관지 상피세포에 *M. pneumoniae* 항원을 자극했을 때 IL-8 유전자 발현과 그 신호전달경로를 살펴보았다.

방 법 : *M. pneumoniae* 항원을 기관지 상피 세포주인 A549 세포에 노출시켜 시간과 농도에 따른 IL-8 단백질 생성과 mRNA 발현을 측정하였다. 그리고 IL-8 유전자 조절과 관련된 신호전달경로로서 MAP Kinase의 활성화를 알아 보았다.

결 과 : A549 세포에 *M. pneumoniae* 항원을 노출시켰을 때 시간과 농도가 증가함에 따라 IL-8의 생성이 증가되고 mRNA 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 PD98059를 전처리 했을 때 IL-8 생성이 감소하였으나 SB 202190를 전처리 하였을 때는 의미있는 감소를 보이지 않았다. MAP kinase 활성 분석에서도 p44/42 MAP kinase의 활성도가 증가되었지만 p38 MAP kinase의 활성도는 증가되지 않음을 알 수 있었다.

결 론 : *Mycoplasma pneumoniae* 항원은 기관지 상피 세포에서 IL-8 유전자 발현을 증가시키며 그 신호전달과정에 ERK pathway가 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Murray HW, Masur H, Senterfit LB, Roberts RB. The protean manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection in adults. *Am J Med* 1975;58:229-42.
- 2) Busse WW. The precipitation of asthma by upper respiratory infections. *Chest* 1985;87 (Suppl):44-8.
- 3) Berkovich S, Millian SJ, Snyder RD. The association of viral and mycoplasma infections with recurrence of wheezing in the asthmatic child. *Ann Allergy* 1970;28:43-9.
- 4) Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Regulation of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 2002; 70:3649-55.
- 5) Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J Investig Med* 1995;43:241-9.
- 6) Marini M, Vittori E, Hollemborg 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;89:1001-9.
- 7) King C, Brennan S, Thompson PJ, Stewart GA. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* 1998;161:3645-51.
- 8) Chen W, Hunninghake GW. Effects of ragweed and Th-2 cytokines on the secretion of IL-8 in human airway epithelial cells. *Exp Lung Res* 2000;26:229-39.
- 9) Choi YM, Kim JH, Kwon MJ, Park SS, Lim DH, Son BK. Clinical manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in infants. *Pediatr Allergy Respir Dis(Korea)* 2000;10: 61-8.
- 10) Gil JC, Cedillo RL, Mayagoitia BG, Paz MD. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. *Ann Allergy* 1993;70:23-5.
- 11) Seggev JS, Lis I, Siman-Tov R, Gutman R, Abu-Samara H, Schey G, et al. *Mycoplasma pneumoniae* is a frequent cause of exacerbation of bronchial asthma in adults. *Ann Allergy* 1986;57:263-5.
- 12) Sabato AR, Martin AJ, Marmion BP, Kok TW, Cooper DM. *Mycoplasma pneumoniae*: acute illness, antibiotics, and subsequent pulmonary function. *Arch Dis Child* 1984;59: 1034-7.
- 13) Mok JY, Waugh PR, Simpson H. *Mycoplasma pneumoniae* infection. A follow-up study of 50 children with respiratory illness. *Arch Dis Child* 1979;54:506-11.
- 14) Wongtim S, Mogmued S. Methacholine inhalation challenge in patients with post-*Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1995;13:5-10.
- 15) Busse WW. Respiratory infections: their role

- in airway responsiveness and the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:671-83.
- 16) Kita M, Ohmoto Y, Hirai Y, Yamaguchi N, Imanishi J. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol Immunol* 1992;36:507-16.
- 17) Koh YY, Park Y, Lee HJ, Kim CK. Levels of interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with *Mycoplasma pneumoniae*: implication of tendency toward increased immunoglobulin E production. *Pediatrics* 2001;107:E39.
- 18) Pietsch K, Ehlers S, Jacobs E. Cytokine gene expression in the lungs of BALB/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* 1994;140:2043-8.
- 19) Martin RJ, Chu HW, Honour JM, Harbeck RJ. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:577-82.
- 20) Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Wordemann M, Hatfield J, Rogers BB, et al. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic, and respiratory plethysmographic profile. *Infect Immun* 2001;69:3869-76.
- 21) Tamaoki J, Chiyotani A, Tagaya E, Araake M, Nagai A. Airway hyper-responsiveness to neurokinin A and bradykinin following *Mycoplasma pneumoniae* infection associated with reduced epithelial neutral endopeptidase. *Microbiology* 1998;144:2481-6.
- 22) Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307:97-101.
- 23) Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993;264:L413-8.
- 24) Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002;72:847-55.
- 25) Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eicke-meier S, Hoffmann E, Wallach D, et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1999;19:6742-53.