사람 정상 코점막 상피세포에서 사이토카인에 의한 MUC8과 MUC5AC의 발현 및 조절

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
국민건강보험공단 일산병원 이비인후과,[3] 가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실[4]
이정권[1] · 문형진[3] · 김성식[4] · 김창우[1] · 윤주헌[1,2]

Expression and Regulation of MUC8 & MUC5AC by Various Cytokines in Normal Human Nasal Epithelial Cells

Jeung-Gweon Lee, MD,[1] Hyung-Jin Moon, MD,[3] Sung-Shik Kim, MD,[4] Chang Woo Kim, MD,[1] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]

[1]Department of Otorhinolaryngology and [2]BK 21 Project Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [3]Department of Otorhinolaryngology National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Koyang; and [4]Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery College of Medicine, The Catholic University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Sinusitis is one of the most commonly reported diseases in the world. A network of inflammatory mediators is known to be involved in the pathogenesis of chronic sinusitis and nasal mucus secretion may also be under the control of an inflammatory mediator network. To date, 12 human mucin genes have been identified ; however, the regulation of MUC8 has not yet been found out. In this study, we described the regulation of the MUC8 mRNA expression by inflammatory mediators and investigated its cellular location. **Materials and Method** : MUC8 mRNA and MUC5AC mRNA were detected in culture using passage-2 normal human nasal epithelial (NHNE) cells after the treatment with a mixture of following inflammatory mediators ; TNF-α, IL-1β, LPS, IL-4, PAF. The translocation of MUC8 mRNA from the nucleus to the cytoplasm was investigated by treating the inflammatory mediators with in situ hybridization. **Results** : We found that a mixture of inflammatory mediators increased the MUC8 mRNA expression but decreased the MUC5AC mRNA expression in cultured normal human nasal epithelial cells. Among the inflammatory mediators, Interleukin-4 was responsible for the decrease in the MUC5AC mRNA expression and the MUC5AC mucin secretion. We also found that MUC8 mRNA resides in the nucleus of goblet cells and is transported into the cytoplasm following the treatment with inflammatory mediators. **Conclusion** : These results indicate that MUC8 may play an important role in the pathogenesis of mucus hypersecretion in chronic sinusitis. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:600-5)**

KEY WORDS : Normal human nasal epithelial cells · Mucin · Cytokines · Mucin gene 8 (MUC8) · Mucin gene 5AC (MUC 5AC).

서 론

부비동염은 이비인후과영역에서 매우 흔하게 볼 수 있는 질환중 하나로 부비동염에 이환되면 코점막 상피세포의 형태학적, 기능적 변화가 일어난다.

한편 만성부비동염의 병인에는 염증성 매개체의 복합체가 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉 만성부비동염 상태에서 상피세포와 섬유아세포들에 의해 TNF - α, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 8, 그리고 GM - CSF 등의 사이토카인이 생성되며 이들 사이토카인들은 각종 염증세포들을 끌어들이게 된다. 또한 이 염증세포들도 역시 여러 사이토카인을 상승조절(autocrine upregulated fashion), 분비시켜 더 많은 염증세포들을 모으는 역할을 한다. 이들 염증세포에서 분비된 염증성 매개체들은 배세포증식과 점액과분비에 관여한다.

점액과분비는 만성 부비동염에서 나타나는 주요 병태중 하나로 점액분비에 관여하는 점액유전자의 조절을 이해하는

논문접수일 : 2001년 1월 16일 / 심사완료일 : 2001년 4월 17일
교신저자 : 윤주헌, 120 - 749 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8484, 8470 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

것은 만성 부비동염의 병태생리를 밝히는데 매우 중요하지만 아직 부비동염에서 점액유전자에 대한 연구는 미흡하다. 지금까지 인간에서는 12개의 점액유전자(MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-9, MUC11, MUC12)가 밝혀져 있다.[1-4] 그중 MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC7과 MUC8 등이 하기도의 점액과분비에 있어 중요한 점액유전자이다.[5][6]

한편 MUC2 및 MUC5AC mRNA는 모든 배세포에서,[7] MUC5B 및 MUC7은 점막하 선세포에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있다.[8] 그러나 MUC8 mRNA가 어느 세포에서 발현하는가에 대한 연구로 폐의 상피세포에서 *in situ* hybridization을 이용하여 MUC8 mRNA를 발현하는 세포 종류를 규명하는 실험이 시도되었지만 아직 성공하지 못하였다.[9] 또한 MUC2 mRNA는 TNF-α와 endotoxin에 의해서,[10][11] MUC5AC mRNA는 IL-4, platelet-activating factor(PAF), 및 IL-9 등에 의해 조절된다고 보고되었지만,[12][13] MUC8의 발현과 조절기전에 대해서는 아직 잘 알려져있지 않다.

저자들은 최근 비용조직에서 점액과분비에 관계되는 MUC8 mRNA가 증가하여 있는 현상과 *in situ* hybridization을 통해 MUC8 mRNA가 세포질보다 핵내에 더 강하게 발현되는 것을 발견하였다.[14] 이러한 관찰은 MUC8이 점액 과분비 혹은 비용의 형성에 관여하는 주요 점액유전자일 가능성을 제시하였다. 따라서 저자들은 이전 연구 결과를 토대로 하여, *in-vivo* 및 *in-vitro* 실험에서 점액유전자의 발현을 증가시키거나 점액분비를 상승시키는 것으로 알려진 TNF-α, IL-1β, LPS, PAF, IL-4등 사이토카인을 인체 정상 코점막 상피세포에 투여하여 *in-vitro*에서 사이토카인 자극에 의한 MUC8 mRNA의 발현 변화와 핵에서 세포질 내로의 이동이 있는 지를 확인하고자 하였다. 동시에 현재까지 기도점막에서 가장 중요한 점액의 하나로 알려져 있는 MUC5AC의 발현 변화도 조사하였다.

재료 및 방법

Air-liquid interface culture(ALI)

10^5개의 인체 정상 코점막 상피세포(passage-2)를 basal epithelial growth medium(BEGM)과 DMEM을 1 : 1로 혼합한 용액에 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 무혈장 배양액에 부유하여 평판하였다.[15] 배양용기는 반투과성막(24.5 mm, 0.45 μm pore size ; Transwell-clear, Costar Corp., Cambridge, MA, USA)이 있는 것을 사용하였다. 세포들은 첫 9일간은 배양액에 잠긴 상태로 두었으며 ALI를 만드는 9일까지는 격일로 배양액을 갈아주었으며 그 후 배양액은 배양용기의 아래쪽 부분만 매일 갈아주었으며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켰다. 배양은 37℃, 5% CO_2에서 진행하였다. 배양 11일째 세포들에 5개의 염증성 매개체들(IL-1β 10 ng/ml, TNF-α 10 ng/ml, lipopolysaccharide(LPS) 5 μg/ml, plateletactivating factor(PAF) 10^{-8}M, IL-4 100 ng/ml)을 동시에 투여하여 8, 24, 48시간 후에 각각 total RNA와 분비점액을 얻었으며 아무런 염증성 매개체를 투여하지 않은 대조군에서도 각각 시간별로 total RNA와 분비점액을 얻었다.

점액의 면역적 검출 및 정량

5가지 염증성 매개체를 투여한 배양세포와 투여하지 않는 배양세포에서 각각 배양된 세포의 상층에서 채취한 분비물에서 점액의 양을 dot blotting으로 정량하였다. 순수 인체 점액(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)을 표준으로 사용하였으며 점액에 대한 일차항체로는 단클론 항체인 H6C5(1 : 1000, a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)를 채취된 분비물과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막에 적용하여 일차항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG에 반응시켰으며, chemiluminescence(ECL kit, Amersham, Buckingamshire, UK)로 발색시켰다. Standard curve를 linear regression analysis를 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 분비물의 실험결과를 평균±표준편차로서 나타냈으며, 통계학적 처리는 student's t-test로 하였다.

Total RNA, nuclear RNA 및 cytoplasmic RNA의 분리

Total RNA는 배양된 인체 정상 코점막 상피세포에 Trireagent(Molecular Research Center. Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 분리하였다. RNA의 질은 1 μg RNA를 ethidium bromide와 함께 6.6% formaldehyde를 함유하는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 핵과 세포질 RNA의 분리를 위해 배양된 사람 정상 코점막 상피세포에 Buffer RLN(50 mM TrisCl, pH8.0/140 mM NaCL/1.5 mM $MgCL_2$/0.5% NP-40) 175 μl를 넣고 1.5 ml tube로 옮긴 후 얼음에 5분간 처치한후 4℃에서 원심분리기로 300 g의 속도로 2분간 원심분리 시켜 상층 액에는 세포질이 모이게 하고 아래쪽 침전물에 핵이 모이게 하였다. 이를 각각 Trireagent와 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia,

Calif., USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다.

MUC5AC mRNA와 MUC8 mRNA를 위한 RT-PCR

Guzman 등[16]이 보고한 RT-PCR을 사용하였다. Oligonucleotide primers는 인체 MUC5AC cDNA 염기서열(Genbank #U06711)을 토대로, 5'primer, TCCGGCCTCA-TCTTCTCC와 3'primer, ACTTGGGCACTGGTGCTG를 사용하여 680 bp를 증폭하였으며, MUC8 cDNA 염기서열Genbank #U14383)을 토대로 5'primer, AC-AGG-GTTTCTCCTCATTG와 3' primer, CGTTTATTCC-AGCACTGTTC를 사용하여 239 bp를 증폭하여 MUC5AC와 MUC8의 mRNA를 RT-PCR로 정량하였다. RT-PCR의 대조유전자로서는 β2 microglobulin(335 bp, Clontech Lab.)을 이용하였다. 기술한 각 유전자의 mRNA를 비교하기 위해 comparative kinetic analysis를 시행하였다.[16] PCR 산물은 50 ng/ml ethidium bromide를 함유하는 2% Seakem agarose gel(FMC, Rockland, ME)에서 전기영동으로 분리하여 사진을 찍었다. PCR의 linear range는 PCR cycle수당 증폭강도를 정량 하여 정하였다. 최종산물이 genomic DNA의 오염이 없었다는 것을 증명하기 위해 RT-PCR 반응에서 reverse transcriptase를 생략하여 음성 대조군으로 삼았으며 RT-PCR의 특이성은 PCR 산물의 염기서열을 확인하여 관찰하였다.

염증매개체 각각이 점액유전자 발현에 미치는 영향분석

연구자가 사용한 염증성 매개체중 어떠한 매개체가 MUC-5AC 및 MUC8발현 변화에 기여하는 지를 알기 위해 각각의 염증매개체가 미치는 효과를 검사하였다. 검사방법은 아무런 처치도 하지 않는 대조군, 한종의 염증매개체만 투여한 군, 염증성 매개체들에서 한종의 염증매개체만 뺀 군, 기존의 5가지 염증성 매개체들의 복합 투여군으로 나누어 각각 자극한 후 24시간 후에 MUC5AC mRNA와, MUC8 mRNA 및 MUC5AC 점액을 측정하였다.

Cytospin slide에서 MUC8 in situ hybridization

Cytospin slides를 4% 파라포름알데하이드 고정액에 고정한 후 MUC8에 대한 antisense 및 sense RNA probes를 Sp6 및 T7 RNA polymerases를 이용하여 in vitro transcription하여 만들었다(forward-ACAGGGTTTCT-CCTCATTG, reverse-CGTTTATTCCAGCACTGTTC, EMBL Accession number U14383).

Cytospin slides를 1 ug/ml DIG-labelled cRNA에 56℃에서 처치하였다. Hybridization buffer는 50% formamide와 5×sodium chloridesodium citrate(SSC), 40 μg/ml ssDNA가 들어 있는 용액을 이용하였다. Hybridization후 1시간 동안 2×SSC와 0.1×SSC로 세척하고 anti-DIG Fab

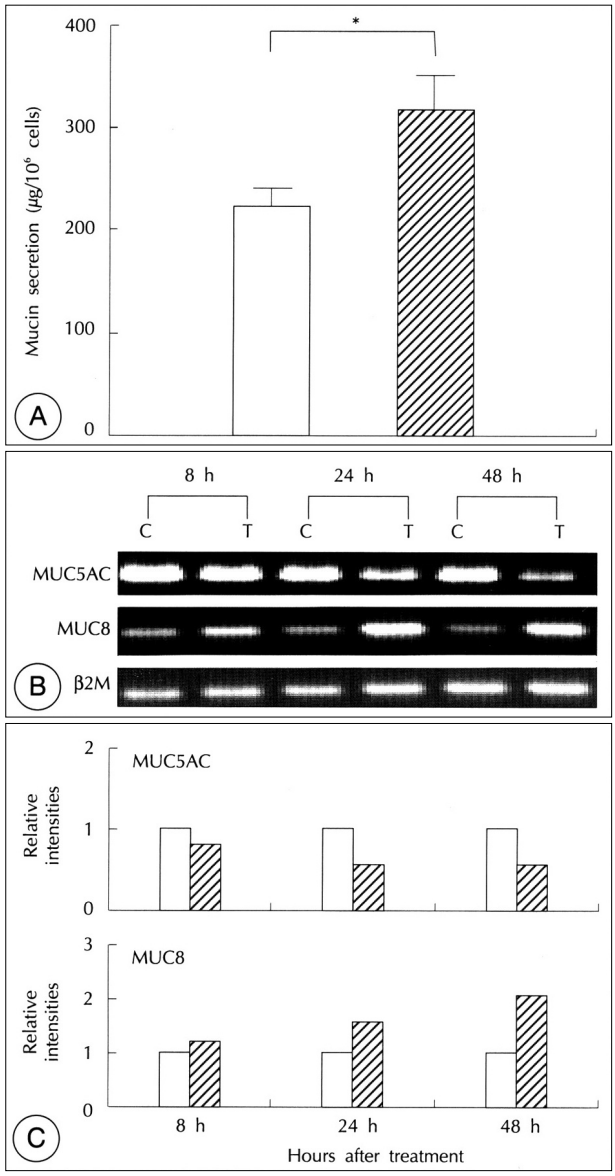

Fig. 1. Effects of treatment with a mixture of inflammatory mediators including TNF-α, IL-1β, LPS, IL-4 and PAF on mucin secretion, MUC5AC mRNA, and MUC8 mRNA in cultured normal human nasal epithelial cells. The data shown in Figure 1A is representative of results obtained in three separate experiments. The mucin secretion 24 h after the treatment showed a 40% increase (Fig. 1A, the mixture of inflammatory mediators : 313.7±29.3 μg/10⁶ cells ; control : 223.1±18.6 μg/10⁶ cells). Expression of MUC5AC mRNA gradually decreased after 24 h treatment. However, expression of MUC8 mRNA significantly increased after 8 h of treatment and gradually increased over time (Fig. 1B). After treatment with a mixture of the five inflammatory mediators (Fig. 1C), the relative intensity of MUC5AC mRNA showed a 50% decrease over time, and that of MUC8 mRNA showed a 2.1-fold increase compared to the control gene. White bars indicate control (C) and black bars demonstrate treatment (T) with inflammatory mediators.

로 2시간동안 처치하였다. Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolylphosphate (BCIP)로 발색시켰다.

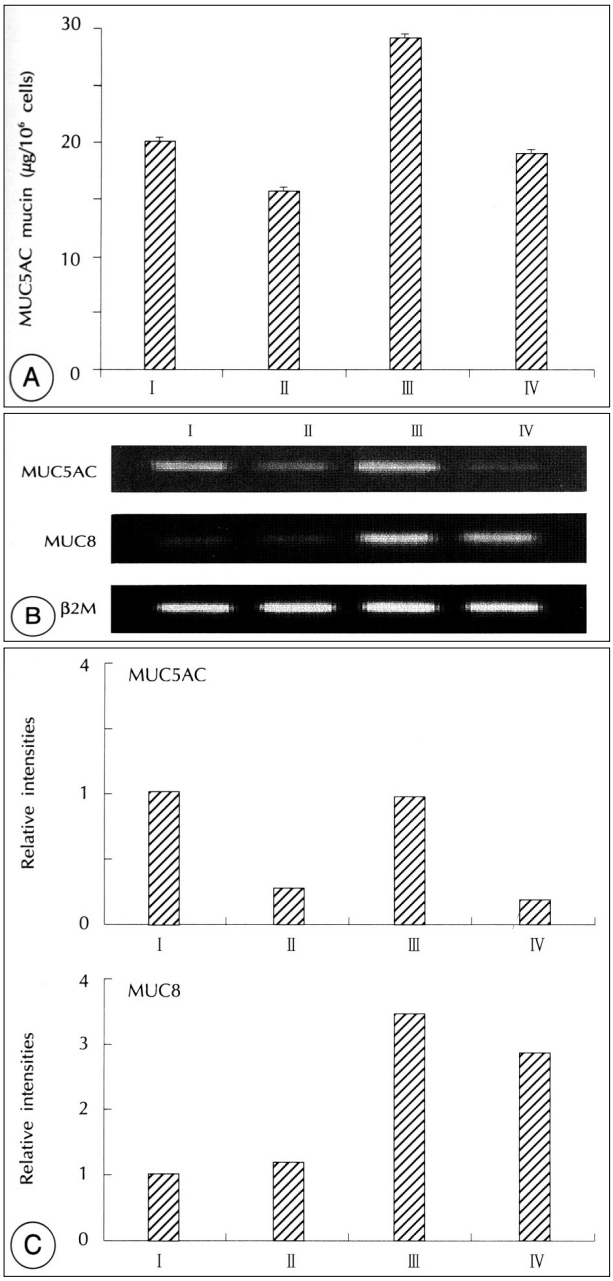

Fig. 2. Effects of IL-4 alone, the deletion of IL-4 from the mixture of inflammatory mediators, and treatment with the mixture of inflammatory mediators on MUC5AC mRNA and mucin secretion in cultured normal human nasal epithelial cells. Treatment with either IL-4 alone or the mixture of inflammatory mediators decreased MUC5AC mucin secretion (Figure 2A, control (Ⅰ) : 20.3±0.3 μg/10^6 cells, IL-4 alone (Ⅱ) : 16.1±0.2 μg/10^6 cells, deletion of IL-4 from a mixture (Ⅲ) : 28.8±0.3 μg/10^6 cells, a mixture of inflammatory mediators (Ⅳ) : 18.4±0.2 μg/10^6 cells) and MUC5AC mRNA expression (Fig. 2B and 2C) compared to the control.

결 과

배양된 인체 정상 코점막 상피세포에서 염증성 매개체에 의한 점액양 및 MUC5AC와 MUC8 mRNA 발현의 비교

생체에서의 만성 염증상태와 유사한 조건을 만들기 위해 5가지의 염증성 매개체(IL - 1β, TNF - α, LPS, PAF, IL - 4)를 복합 투여한 결과, 점액분비가 처치 24시간 후에 10^6 세포당 313.7±29.3 μg으로 대조군 223.1±18.6 μg에 비해 의의 있게 40.6%증가하였다(Fig. 1A). 한편, MUC5AC

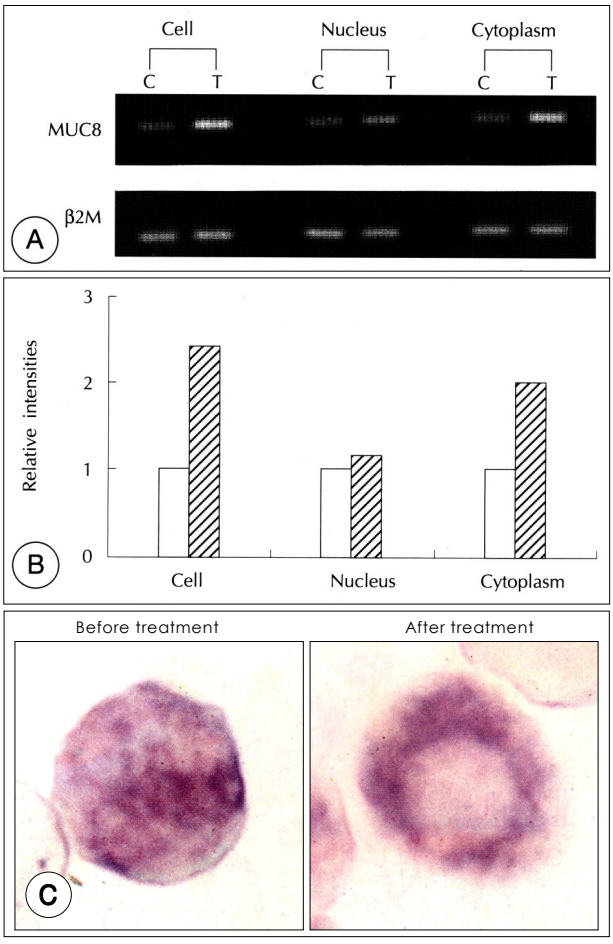

Fig. 3. Effects of the mixture of inflammatory mediators on expression and translocation of MUC8 mRNA in the nucleic and cytoplasmic RNA. Interestingly, the expression of nucleus MUC8 mRNA did not increase significantly but that of cytoplasmic MUC8 mRNA strongly increased. This result suggests that the increased levels of total cellular MUC8 MrNA is due to the increased levels of MUC8 in the cytoplasm, which is translocated from the nucleus (Fig. 3A, 3B). This finding is further supported by the observation that signals of MUC8 messages were strongly intensified in the cytoplasm of cells treated with inflammatory mediators as determined by in situ hybridization (Fig. 3C). White bars indicate control (C) and black bars demonstrate treatment (T) with inflammatory mediators.

mRNA는 점차 감소하여 24시간 후에는 대조군에 비해 50%로 줄어들었으나 MUC8 mRNA는 8시간 후에 증가하기 시작하여 48시간 후에는 2배 증가하였다(Fig. 1B and C).

염증성 매개체 각각이 점액유전자 발현에 미치는 영향

다른 염증매개체와는 달리 IL-4는 각 실험군간에 차이를 보였다. IL-4만 투여한 군과 기존의 5가지 염증성 매개체들의 복합투여군에서는 MUC5AC mRNA와 MUC5AC 점액이 대조군에 비하여 모두 줄어들었으며 염증성 매개체들에서 IL-4만 뺀 군에서는 MUC5AC mRNA의 변화가 없었다(Fig. 2). 한편, IL-4는 MUC8 mRNA에 대해서는 아무 효과가 없었다(Fig. 2B and 2C).

염증성 매개체에 의한 MUC8 mRNA의 핵에서 세포질로의 전좌

인체 코점막 상피세포를 배양하여 5가지의 염증성 매개체 복합으로 처치하였을 때 핵과 세포질에 있는 MUC8 mRNA의 변화를 RT-PCR과 *in situ* hybridization으로 조사하였다. 염증성 매개체 복합으로 처치한 24시간 후에 세포내의 총 MUC8 mRNA의 증가가 있었다. 다시 핵과 세포질을 분리하여 얻은 total RNA에서는 핵에서는 큰 변화가 없었으나 세포질에서는 MUC8 mRNA의 현저한 증가가 관찰되었다(Fig. 3A and 3B). 또한 *in situ* hybridization 결과에서도 염증성 매개체 복합으로 처치한 후 세포질에 MUC8 mRNA가 뚜렷이 증가하였다(Fig. 3C).

고 찰

점액과분비는 만성 부비동염에서 나타나는 대표적인 병적 산물이다. 하지만 현재까지 만성부비동염에 의해 과분비된 점액에서의 점소의 유전자적 특징이나 점액과분비의 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 다만 만성부비동염의 점막에 많이 발견되는 배세포들이 점액과분비를 주로 담당하는 것으로 알려져 있을 뿐이다.

TNF-α, neutrophil elastase, IL-4, IL-9, 그리고 endotoxin과 같은 몇 몇 염증성매개체는 점액분비와 점액유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 사실에 기초하여 저자들은 이들 염증성 매개체의 상호작용이 MUC8 mRNA 조절에 중요하리라 생각되어 5가지 염증성 매개체를 배양된 인체 정상코점막 상피세포(NHNE cell)에 복합투여 후 MUC8 mRNA 양을 조사하였는데 8시간 안에 MUC8 mRNA 발현이 증가하여 48시간후 최고치에 도달하였다. 이는 이들 염증성 매개체의 복합체가 MUC8 발현의 증가에 영향을 주는 것을 의미한다. 그러나 MUC5AC mRNA는 대조군에 비하여 감소하였고 이 결과는 IL-4,[12] neutrophil elastase,[17] 그리고 그람양성, 음성 박테리아에서 분비된 endotoxins[18]등의 염증성 매개체에 의해 MUC5AC mRNA의 양이 상승 조절된다는 기존의 보고들과는 상이한 결과를 보였다. 이러한 차이는 분명치는 않지만 두 가지 해석이 가능하다. 첫째로, 인체 코점막의 배세포중 일부에서만 MUC5AC의 발현이 나타나기 때문이 되며[19] 둘째로는, 염증성 매개체 복합투여에 포함된 IL-4의 영향 때문으로 여겨진다. Fig. 2에서 제시한 것처럼 IL-4의 투여시 MUC5AC mRNA 발현과 점액분비가 감소되었고 이는 배양된 인체 정상 기관지 점막 상피세포(NHTBE cell)에서 IL-4의 투여가 점액분비와 MUC5AC와 MUC5B mRNA의 발현을 감소시킨다는 보고와 일치한다.[20] 이 결과로 이번 연구에서의 MUC5AC mRNA의 감소는 IL-4의 영향이었음을 알 수 있었다.

저자들은 이전의 실험에서 비용조직에서 점액과분비에 관계되는 MUC8 mRNA가 증가하여 있는 현상과 in situ hybridization을 통해 MUC8 mRNA가 세포질보다 핵내에 더 강하게 발현되는 것을 발견하였으며 MUC8 mRNA가 왜 핵에서 세포질보다 강하게 나타났는지에 대한 의문점을 가지게 되었다. 혹시 비활동성 형태로 존재하는 핵에 있는 MUC8 mRNA가 염증성 매개체들에 의해 세포질로 전좌되어, 세포질에서 빠르게 번역되어 분비되기 때문에 세포질에서는 약하게 나타났을 가능성을 생각하였다. 이러한 의문을 규명하기 위해 코점막 상피세포를 배양하여 5가지의 염증성 매개체 복합으로 처치하였을 때 핵과 세포질에 있는 MUC8 mRNA의 변화를 RT-PCR과 *in situ* hybridization으로 조사하였다. 염증성 매개체를 복합 처치후 총 MUC8 mRNA는 증가하였다. 증가된 총 MUC8 mRNA는 핵에서 전이된 세포질에서의 MUC8 mRNA의 증가에 의한 것으로 추정된다. 그 근거는 핵과 세포질을 분리하여 얻은 total RNA에서 핵에서는 큰 변화가 없었으나 세포질에서는 MUC8 mRNA의 현저한 증가가 관찰되었으며 또한 *in situ* hybridization 결과에서와 같이 염증성 매개체 복합으로 처치한 후 세포질에 MUC8 mRNA가 뚜렷이 증가한다는 것에서 찾을 수 있다. 이러한 결과는 염증성 매개체 복합 자극에 의해 핵에서 세포질로 MUC8 mRNA의 전좌에 의한다는 것을 암시한다.

요약하면, 염증성 매개체의 복합투여는 배양된 NHNE cell에서 MUC8 mRNA의 발현을 증가시키며 반면 MUC5AC mRNA의 발현을 감소시킨다. 저자들은 또한 MUC8 mRNA는 분비세포의 핵에 존재하다가 염증성매개체 처치 후에 세포질로 전이됨을 추정할 수 있었다.

이상의 결과를 보면 MUC5AC는 염증성 매개체의 복합투여후 그 발현양상이 줄어드는 것으로 보아 MUC5AC는 정상상태에서는 주요점액중 하나이지만 여러 염증성 매개체로부터 영향을 받는 병적상태에서는 주요점액이 아닐 가능성이 있으며, MUC8는 염증성 매개체 복합투여후 그 발현이 뚜렷이 증가하여 병적상태에서 주된 역할을 하는 점액유전자의 하나일 가능성을 암시하고 있다. 그러나 MUC8이 만성 부비동염에서 분비된 점액의 주된 점소 인지는 향후 추가로 연구해 보아야 할 내용이다.

결 론

염증성 매개체의 복합투여는 배양된 NHNE cell에서 MUC8 mRNA의 발현을 증가시키며 MUC5AC mRNA의 발현을 감소시킨다. MUC8 mRNA는 분비세포의 핵에서 존재하다가 염증성매개체 처치 후에 세포질로 전이된다. 이상에서 MUC8은 병적상태에서 점액과분비(mucus hypersecretion)에 관여하는 중요한 병적 점액유전자중 하나일 것으로 추정된다.

중심 단어 : 인체 정상 코점막 상피세포 · 점액 · 사이토카인 · MUC8 · MUC5AC.

이 논문은 2000년도 연세대학교 의과대학 교수연구비(2000 - 20)에 의해 이루어 졌음.

REFERENCES

1) Yoon JH, Park IY. *Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. Rhinology 1998;36:146-52.*
2) Rose MC. *Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. Am J Physiol 1992;263:413-29.*
3) Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. *Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). Fertil Steril 1997;68:702-8.*
4) Williams SJ, McGucklin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. *Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer Res 1999;59:4083-9.*
5) Thornton DJ, Devine PL, Hanski C, Howard M, Sheehan JK. *Identification of two major populations of mucins in respiratory secretions. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:823-32.*
6) Hovenberg HW, Davis JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. *MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. Glycoconj J 1996;13:839-47.*
7) Buisine MP, Devisme L, Copin M-C, Durand M, Gosselin B, Aubert JP, *et al. Developemtnal mucin gene expression in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:209-18.*
8) Sharma P, Dudus L, Nielsen PA, Clausen H, Yankaskas JR, Hollingworth MA, *et al. MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;19:30-7.*
9) Reid CJ, Gould S, Harris A. *Developmental expression of mucin genes in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;17:592-8.*
10) Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. *Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC2 gene expression by human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:196-204.*
11) Li JD, Feng W, Gallup M, Kim J-H, Gum J, Kim Y, *et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for Peudomonas eruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:5718-23.*
12) Temann UA, Prasad B, Gallup MW, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, *et al. Novel role of murine IL-4 in vivo: Induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:471-8.*
13) Lou YP, Takeyama K, Grattan KM, Lausier JA, Ueki IF,Agusti C, *et al. Platelet-activating factor induces goblet cell hyperplasia and mucin gene expression in airways. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1927-34.*
14) Kim HU, Kim CH, Lee YH, Lee JG, Yoon JH. *Expression of MUC5AC and MUC8 mRNA in human nasal mucosa. Korean J Otolaryngol 2001;44:490-4.*
15) Yoon JH, Gray TE, Guzman K, Koo JS, Nettesheim P. *Regulation of the secretory phenotype of human airway epithelium by retinoic acid, triiodothyronine, and extracellular matrix. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:724-31.*
16) Guzman K, Gray TE, Yoon JH, Nettesheim P. *Quantitation of mucin RNA by PCR reveals induction of both MUC2 and MUC5AC mRNA levels by retinoids. Am J Physiol 1996;271:1023-8.*
17) Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. *Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. Am J Physiol 1999;276:835-43.*
18) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum C. *Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional upregulation by bacterial exoproducts. J Biol Chem 1998;273:6812-20.*
19) Kim CH, Song KS, Kim HU, Seong JK, Yoon JH. *Expression of MUC5AC mRNA in the goblet cells of human nasal mucosa. Laryngoscope 2000;110:2110-3.*
20) Jayawickreme SP, Gray TE, Nettesheim P, Eling T. *Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol 1999;276:596-603.*