

기관(氣官) 상피세포 생리 및 약리 실험모델로서의 공기-액체 접면 일차배양법 연구

이충재* · 이재훈 · 석정호 · 허강민
충남대학교 의과대학 약리학 교실

Studies on the Air-Liquid Interface Culture as an Experimental Model for Physiology and Pharmacology of Tracheal Epithelial Cells

Choong Jae LEE*, Jae Heun LEE, Jeong Ho SEOK, and Gang Min HUR

Department of Pharmacology, College of Medicine, Chungnam National University

(Received November 5, 2002 ; accepted December 5, 2002)

Abstract – In this study, we intended to get a preliminary data for establishing rat tracheal surface epithelial (RTSE) cell culture system as an experimental model for physiology and pharmacology of tracheal epithelial cells. Primary culture on the membrane support and application of the air-liquid interface system at the level of cell layer were performed. The cell growth rate and mucin production rate were measured according to the days in culture. The results were as follows: (1) this culture system was found to manifest mucocilliary differentiation of rat tracheal epithelial cells, (2) the cells were confluent and the quantity of produced and released mucin was highest on culture day 9, (3) the mucin was mainly released to the apical side and the free ³H-glucosamine which was not incorporated to process of synthesis of mucin was left on the basolateral side. Taken together, we suggest that air-liquid interface culture system can be used as a substitute for immersion culture system and as an experimental model for *in vivo* mucus-hypersecretory diseases.

Key words □ tracheal surface epithelial cell, air-liquid interface culture, mucin-hypersecretory diseases

1. 서 론

만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 천식, 낭포성 섬유증 등 호흡기 점액 과다분비를 유발하는 질환에 대한 기초과학적 연구에서의 주된 문제점은 호흡기 점액의 생화학과 약리에 대한 연구정보가 부족하다는 점일 것이다. 호흡기 뮤신은 periodic acid-schiff (PAS)에 반응하는 secretory granule (mucous granule)로부터 유래되는데, 이 분비성 과립은 배상세포와 접착점액선에서 공히 발견되며, 호흡기 뮤신은 이러한 두개의 상이한 세포로부터 유래되는 물질의 혼합물일 가능성이 크다. 또한, 호흡기 질환자의 점액에서 분리해낸 뮤신은 순수하지 못하며, 점액에 존재하는 단백질분해효소 등의 존재로 인해 분비 후의 구조변화 과정을 거치게 된다(Houdret *et al.*, 1984). 이런 오염이나 구조변화의 문제를 해결하기 위해 organ explant culture와 같은 *in vitro* system을 이용해 왔다. 특히, organ explant culture는 실험조작의 용이성과 *in vivo*

기도와 유사성으로 인하여 많이 사용해 왔으나(Adler *et al.*, 1987, Clark *et al.*, 1979, Chakrin *et al.*, 1972, Coles *et al.*, 1984, Gallagher *et al.*, 1975, Klinger *et al.*, 1984, Marom *et al.*, 1981, Mian *et al.*, 1982, Shelhamer *et al.*, 1980, Shelhamer *et al.*, 1984, Sherman *et al.*, 1981, Woodward *et al.*, 1982), 시스템 자체가 불안정하고(Niles *et al.*, 1986), 조직 분리시 주위 조직의 혼입 등이 단점으로 알려져 있어(Kim *et al.*, 1987) 기도 뮤신분비에 관련된 생화학적 기전 연구에는 부적합한 것으로 평가되고 있다. 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위해 다수의 호흡기 세포 1차 배양법이 여러 동물들을 이용하여 개발되어 왔으며(Wu *et al.*, 1982, Lchner *et al.*, 1982), 그 중에서도 Hamster Tracheal Epithelial (HTSE) cell 배양법이, 점액 과다분비를 나타내는 인간과 동물에서 공히 관찰되는 기도 secretory cell metaplasia의 *in vitro* model로 주로 이용되고 있는 유용한 모델(Kim, 1985, Rearick *et al.*, 1987, Wasano *et al.*, 1988)이다. 그러나, *in vivo*에서의 호흡기 상피세포는 그 apical side는 호흡되는 공기와 접하고 있으며, basolateral side는 조직

*To whom correspondence should be addressed.

과 연결되어 물질대사 및 생리작용을 수행하고 있으므로 기존의 호흡기 상피세포 일차 배양법에서 채택되고 있는 immersion culture법으로는 *in vivo*에서의 호흡기 상피세포의 거동을 반영함에 있어 미흡한 부분이 있을 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 기존의 culture plate의 각 well에 콜라겐이 도포된 반투성 막 지지체를 삽입한 뒤 흰쥐의 기관상피세포를 도포한 후 immersion culture 방법으로 배양하다가, 일정시간이 경과한 후, 세포의 apical side에서 배양액을 제거하고 basolateral side로만 배양액이 공급되도록 함으로써, 세포층 수준에서 공기-액체 접면이 형성되도록 하는 배양법(Kaartinen et al., 1993)을 도입하고, 이러한 배양세포에서 시간의 경과에 따른 세포의 증식 정도와 뮤신을 포함한 glycoconjugates의 생성 및 유리(release)의 양상을 연구함으로써 이러한 배양법이 호흡기 배양세포의 생리 및 약리에 관한 기초적 실험모델, 나아가 *in vivo* 호흡기 점액 과다분비 질환 연구모델로서 이용되기에 적합한지를 검증해 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

실험동물

공기-액체 접면 일차배양 기관상피세포를 얻기 위해, 6-8주령의 웅성 S.D. rat을 사용하였다. 동물이 실험실에 도착한 후 2-3일간 실험실 환경에 순화시키고, 순화기간 중 일반상태를 관찰, 건강한 동물만을 사용하였다. 환기가 잘 되고, 12시간 명암 주기가 유지되며, 실온이 25°C 내외로 유지되는 환경에서 사료와 식수를 자유로이 섭취시켰다.

시약

pronase (Type XIV), insulin, transferrin, epidermal growth factor, hydrocortisone, sodium selenite, testicular hyaluronidase (Type VI-S), LDH assay kit (LD-L 10), retinoic acid, gentamicin, sodium dodecyl sulfate, bovine serum albumin (BSA), Sepharose CL-4B, collagenase 등은 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서, Transwell-Col tissue culture inserts 및 부착된 culture plate는 Costar사(MA, U.S.A.)에서, penicillin-G, streptomycin, Joklik-modified Minimal Essential Medium (S-MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME), fetal bovine serum (FBS), Medium 199 (M199)등은 GIBCO사(Grand Island, New York, U.S.A.)에서, [^3H] glucosamine (39.2 Ci/mmol)은 New England nuclear사(U.S.A.)에서, type I collagen은 Regenmed (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 기타 일반시약들은 reagent grade 이상의 것들을 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 탈이온 이차증류수를 한번 더 탈이온하여 사용하였다.

흰쥐 기관표면 상피세포의 분리 및 배양

흰쥐의 기관표면 상피세포 분리와 배양에 적용된 실험 방법은 Kim 등의 방법(Kim et al., 1985; Kim et al., 1989)을 사용하였다. 6-8주령의 웅성 S.D. rat을 이산화탄소로 질식사시켜, 기관을 무균 상태에서 노출시킨 후 멸균된 폴리에틸렌 튜브(PE tube)를 삽입하였다. PE tube를 통하여 Ca^{++} , Mg^{++} free Minimum Essential Medium에 용해시킨 0.2% pronase를 기관 강내에 주입하고, 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 16시간 후, 기관 강 내용물을 세척 및 수거하고, 10% fetal bovine serum을 함유하는 MEM내에서 200×g로 5분간 원심 분리함으로써 수거한 세포를 2회 세척했다. 세척된 cell pellets는 insulin (5 µg/ml), transferrin (5 µg/ml), epidermal growth factor (12.5 ng/ml), hydrocortisone (0.1 µM), sodium selenite (0.01 µM), retinoic acid (0.1 µM), fetal bovine serum (5%, v/v), Penicillin-G (100 µU/ml), streptomycin (100 µg/ml), Gentamicin (50 µg/ml) 등이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)과 M199의 1 µl 혼합 배양액(이하 완전배양액)에 재현탁시켰다. Transwell-Col tissue culture inserts에 여분의 type I collagen mixture (이하 collagen)를 도포하였는데, 경시적인 세포수 증가 정도와 뮤신의 생성 및 유리 정도를 비교하기 위한 실험에서는 3.0 µm의 pore size를 가진 직경 6.5 mm의 inserts에 66 µl의 collagen을 도포하였으며, 뮤신을 포함한 기타 분비성의 glycoconjugate의 생성 및 유리 양상을 비교하는 실험을 위해서는 0.4 µm의 pore size를 가진 직경 24.5 mm의 inserts에 1.0 ml의 collagen을 도포한 뒤, 37°C 조건에서 경화시켰다. 위에서 재현탁된 세포를 10⁴ cells/cm²의 밀도로 inserts의 표면, 즉 apical side에 분포시키고 basolateral side에도 소정량의 완전배양액을 가한 후 37°C 세포배양기내에서 배양하였으며, 24시간이 경과한 후 apical side와 basolateral side 양쪽 다 배양액을 교체하는데, 24.5 mm의 inserts의 경우 apical side에 0.5 ml, basolateral side에 2.5 ml, 6.5 mm의 inserts의 경우 apical side에 0.1 ml, basolateral side에 0.6 ml의 완전배양액을 가하였다. 세포는, 습도가 충분히 유지되며, 95% 공기, 5% CO₂를 함유하는, 37°C 조건에서 배양되었으며, 배양액 교체는 배양 개시 후 제 1, 3, 5, 7일에 각각 시행하였다. 배양 개시 후 제 7일부터는 apical side로부터 배양액을 제거하고, basolateral side로만 배양액을 공급함으로써 세포층 수준에서의 공기-액체 접면 배양상태를 조성하였고 이후에는 배양액을 매일 교체하였다.

세포 수 측정

6.5 ml inserts에서 자란 세포에 1,000 U/ml의 collagenase (type IV)를 apical side에 100 µl, basolateral side에

600 μ l를 각각 가하고 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 철저히 현탁시킨 후 200 \times g, 4°C에서 5분간 원심분리함으로써 세포 pellet을 얻었다. 여기에 0.2% trypsin-0.05% EDTA 용액 50 μ l를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 세포들을 철저히 분산시켜 hemacytometer를 이용, 세포 수를 측정하였다.

뮤신의 대사적 방사선 표지 및 표지된 뮤신을 함유한 배양액의 수거

Kim 등(Kim *et al.*, 1985)의 방법을 이용하였는데, 배양세포 중의 뮤신은, 배양세포에, 10 Ci/ml의 [6-³H] glucosamine (39.2 Ci/mmol, New England nuclear)을 함유하는 완전배양액을, 24.5 mm의 inserts의 경우 basolateral side에 2.5 ml, 6.5 mm의 inserts의 경우 basolateral side에 0.6 ml씩 각각 가하고 37°C에서 24시간 동안 배양함으로써 방사선 표지(metabolic radiolabeling)되었다. 24시간이 지나면, 방사성 뮤신을 함유하는 배양액을 수거하는데, basolateral side에서는 전량을 수거했고, apical side에서는 24.5 mm의 inserts의 경우 0.2 ml, 6.5 mm의 inserts의 경우 0.1 ml씩 완전배양액을 각각 가하고 culture plate 전체를 부드럽게 흔들어 apical side를 씻어준 뒤 배양액을 수거하였다. 세포 수와 뮤신 생성 및 유리 정도를 측정하기 위한 실험에서는 배양 개시 후 제 4, 6, 8, 10, 12일에 각각 방사선 표지하고, 제 5, 7, 9, 11, 13일에 배양액을 각각 수거하였으며, 뮤신을 포함한 glycoconjugates의 생성 및 유리 양상을 알기 위한 실험에서는 배양 개시 후 제 6, 8, 12일에 각각 방사선 표지하고, 제 7, 9, 13일에 배양액을 각각 수거하였다. 수거된 배양액은 뮤신함량 측정 시까지 -70°C에 보관했다.

뮤신 함량 측정법

Hyaluronidase에 의해 분해되지 않으며, Sepharose CL-4B column으로부터 exclude되는 고분자량의 glycoconjugate를 뮤신으로 정의하였다(Kim *et al.*, 1985). 수거된 배양 상등액을 0.1 M citric acid를 써서 pH 5.0으로 조정하고 100 unit/ml의 testicular hyaluronidase (Type VI-S)를 가한 뒤 37°C에서 16시간 동안 incubation하였다. Incubation이 끝나면 digestion mixture를 0.2 M NaOH로 중화시키고 최종농도가 0.1%가 되도록 SDS 용액을 가한 뒤 2분간 끓인 다음 12,000 \times g에서 5분간 원심분리했다. 원심분리 후 상등액 100 μ l에 동일 용량의 running buffer, 2 μ l의 10% SDS, 3 μ l의 5 M NaCl을 가한 뒤 철저히 혼합하였다. 이렇게 조제된 loading sample 들을 running buffer로 평형화된 Sepharose CL-4B column (0.7 \times 50 cm)에 적용하였다. Column은 0.336 ml/min의 유속으로 작동되었고, 한 분획의 용량은 0.42 ml로 하였다. 6 ml용량

의 vial에 수거된 각 분획에 3.2 ml의 scintillation cocktail을 가하고 잘 섞은 뒤 Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac)를 이용, 방사선량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Kaartinen 등은, 흰쥐 기관상피의 공기-액체 접면 일차 배양 세포가 *in vivo* 흰쥐 기관상피와 유사한 양상으로 분화되며, mucocilliary 분화를 위해서는 retinoic acid, collagen gel substratum, 배양 개시 후 제 7일부터 공기-액체 접면 상태 유지 등이 필수적이라고 보고하였다. 또한, 배양 개시 후 7일 내에 confluent해져야 지속적인 mucocilliary 분화가 가능하며, 공기-액체 접면 일차배양법은 공기-액체 접면이 형성되는 시기부터 섬모세포의 분화가 일어나므로 *in vivo* 기도상태와 유사하다는 점 등도 보고하였다(Kaartinen *et al.*, 1993). 이러한 보고에 근거하여 본 연구에서는, 흰쥐 기관상피의 공기-액체 접면 일차배양 세포가, 호흡기 상피세포의 생리 및 약리 연구 모델로 많이 사용되며 그 특성이 잘 규명된 HTSE culture (Kim, 1985, Rearick *et al.*, 1987, Wasano *et al.*, 1988)와 기도 배상세포 증식 및 뮤신의 생성/유리 양상이라는 측면에서 어떤 유사성 및 상이성이 있으며 나아가 이를 기관 상피세포의 생리 및 약리 연구모델로 이용하기에 적합한 지를 검증해 보고자 하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 기존의 HTSE culture에서는 배양 개시 후 제 6-7일째에 세포들이 confluent하게 되는데 이와 유사한 양상을 흰쥐 기관상피세포의 공기-액체 접면 일차 배양법에서도 관찰할 수 있었다. 즉, 배양 개시 후 제 9일째에 세포들이 confluent해지는 것으로 간주할 수 있으

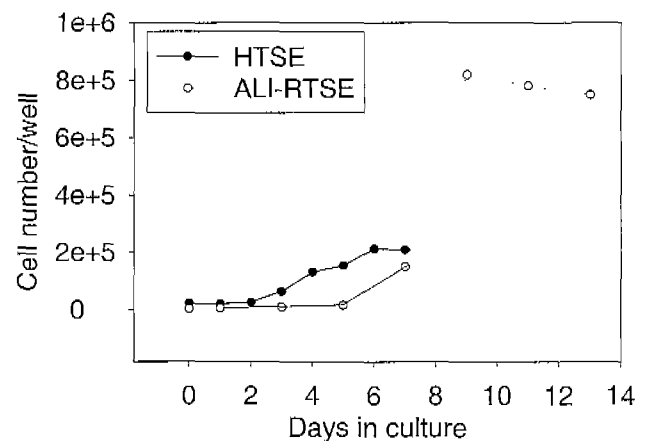


Fig. 1. Comparison of cell growth patterns. The cells were isolated, plated, incubated and counted as described in Materials and methods. (HTSE; Hamaster Tracheal Surface Epithelial, ALI-RTSE; Air-Liquid Interface Rat Tracheal Surface Epithelial).

며, 이 시점이 지나면 오히려 세포수가 약간 감소하는 현상을 볼 수 있다. 따라서, 공기-액체 접면 일차 배양법으로 배양 시 9일 정도 배양된 세포가 뮤신유리와 관련된 약리 및 생리 실험 시 사용되기에 가장 적합할 것으로 추정된다. Fig. 2에 나타난 결과에서, 뮤신의 생성 및 유리량에 있어서는 HTSE culture에서는 배양 개시 후 6-7일 경이 최고점을 나타냄에 비하여 흰쥐 기관상피세포의 공기-액체 접면 일차 배양법에서는 제 9일 경에 peak를 이루는 것을 알 수 있다. 이같은 결과는 배양 개시 후 세포 수의 증가 정도와 뮤신의 생성 및 유리 정도의

경시적 양상이 서로 상당히 유사함을 나타내는 것이라 볼 수 있다. 즉, 이상의 두 결과는, 뮤신의 생성 및 유리와 관련된 약리학적 실험 모델로서 흰쥐 기관상피세포의 공기-액체 접면 일차 배양법이 기존의 HTSE culture 방법에 대응될 수 있을 가능성을 제시하는 것이라 볼 수 있다. 다음으로, 이러한 새로운 배양법에서, 생성되는 뮤신의 분비 혹은 유리의 방향성(polarity) 및 뮤신의 방사선 표지 시 표지 물질인 ^3H -glucosamine의 뮤신으로의 도입(incorporation) 정도와 도입되지 않은 표지 물질의 분포 양상을 검증해 보고자 하였다. Fig. 4, 5, 6에서 볼 수 있는 것처럼 배양 개시 후 세포 수 및 뮤신 생성 및 분비량이 최고점에 도달하는 제 9일을 중심으로 하여 24 시간 전 및 72 시간 후의 각 날짜별로(제 7일 및 제 13일), void volume 부분, 즉 뮤신과 같은 거대 당단백질이 용출되는 부분만 비교해 보면 apical side에서는 측정되는 전체 방사선량 중의 52-63%가 void volume에서 나타나며 basolateral side에서는 1-8% 만이 나타나는 것으로 측정되었다. 이 결과는, Fig. 3에서도 확인되는 바처럼 HTSE culture에서 뮤신으로 정의되었던 거대 분자가 흰쥐 기관상피세포의 공기-액체 접면 일차 배양법에서도 basolateral side로가 아니라 주로 apical side로 유리됨을 시사하는 것이며, 따라서 *in vivo* 기도에서의 생리 현상을 재현하고 있음을 의미하는 것이다. 다음으로, included volume에서 측정되는 방사선량을 비교 시, apical side에서는 전체 방사선량 중의 34-43%가 basolateral side에서는 16-29%가 나타나는 것으로 측정되었다. 이 결과도, HTSE culture에서와 유사하게 이러한 배양세포에서 뮤신

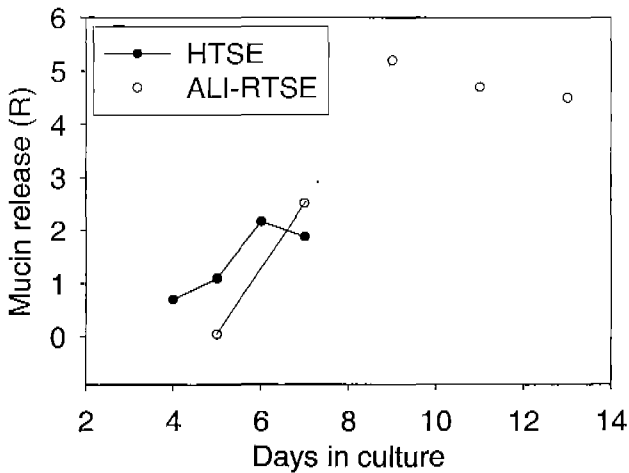


Fig. 2. Comparison of mucin production patterns. The cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine and the amount of ^3H -mucins in the media was measured as described in Materials and Methods. (HTSE; Hamster Tracheal Surface Epithelial, ALI-RTSE; Air-Liquid Interface Rat Trachea Surface Epithelial).

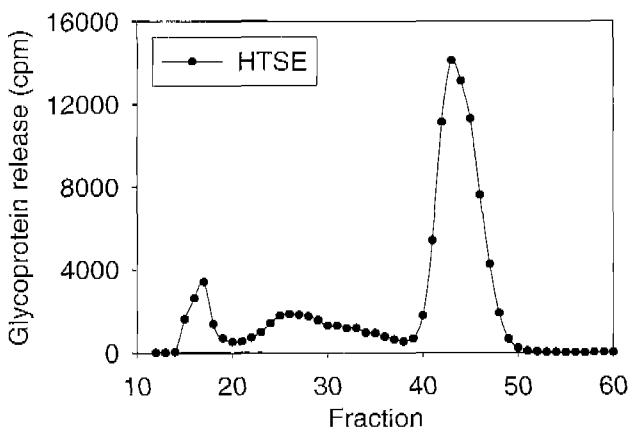


Fig. 3. Elution profile of HTSE(immersion) spent medium through Sepharose CL-4B column (Day 7). Confluent HTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and total elution profile of medium through Sepharose CL-4B column were analysed as described in Materials and Methods (HTSE; Hamster Tracheal Surface Epithelial).

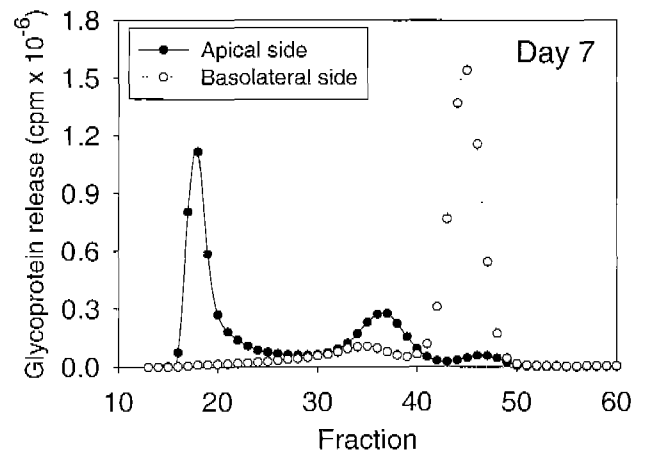


Fig. 4. Elution profiles of ALI-RTSE apical and basolateral side spent medium through Sepharose CL-4B column (Day 7). ALI-RTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and total elution profiles of media through Sepharose CL-4B column were analysed at day 7 as described in Materials and Methods (ALI-RTSE; Air-Liquid Interface Rat Tracheal Surface Epithelial).

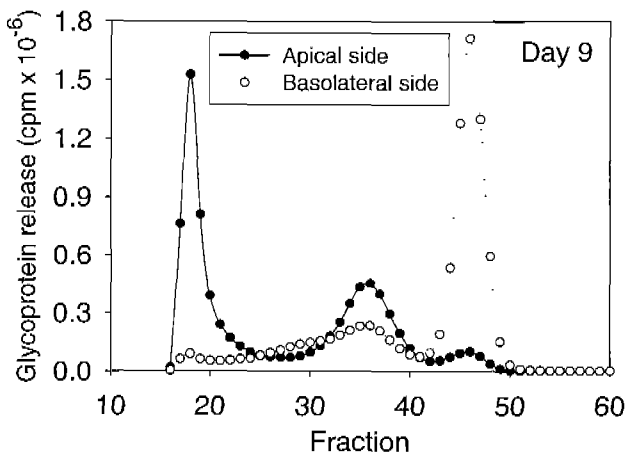


Fig. 5. Elution profiles of ALI-RTSE apical and basolateral side spent medium through Sepharose CL-4B column (Day 9). ALI-RTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and total elution profiles of media through Sepharose CL-4B column were analysed at day 9 as described in Materials and Methods (ALI-RTSE; Air-Liquid Interface Rat Tracheal Surface Epithelial).

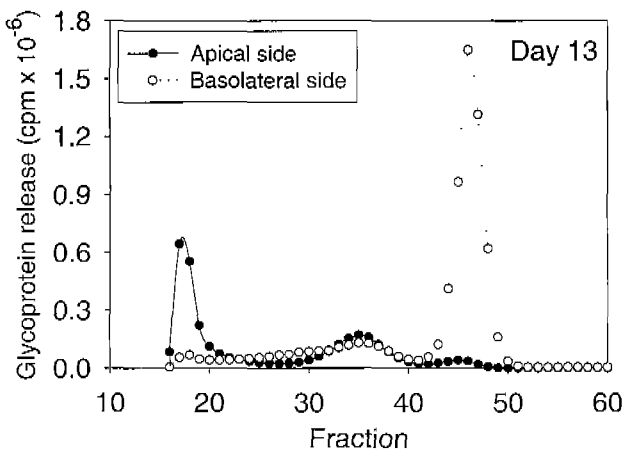


Fig. 6. Elution profiles of ALI-RTSE apical and basolateral side spent medium through Sepharose CL-4B column (Day 13). ALI-RTSE cells were metabolically radiolabeled with ^3H -glucosamine for 24 hrs and total elution profiles of media through Sepharose CL-4B column were analysed at day 13 as described in Materials and Methods (ALI-RTSE; Air-Liquid Interface Rat Tracheal Surface Epithelial).

보다 분자량이 작은 다양한 종류의 표지된 glycoconjugate들이 생성 및 유리될 수 있음을 의미하는 것이며 그 분비 혹은 유리의 방향성도 주로 apical side임을 시사하는 것이다. 마지막으로, total volume에서 측정되는 방사선량을 비교 시 apical side에서는 전체 방사선량 중의 2-7%, basolateral side에서는 65-84%가 나타나는 것으로 측정되었다. 이러한 결과는, 세포 내로 도입되어 뮤신의 생성에 이용되지 않은 ^3H -glucosamine이 대부분 basola-

teral side에 잔류하며 apical side에는 거의 존재하지 않음을 시사하는 것이다. 결론적으로, 흰쥐 기관상피세포의 공기-액체 접면 일차 배양법은 뮤신의 생성 및 유리와 관련된 약리학적 연구의 모델이라는 관점에서 기존의 HTSE culture와 유사한 특성을 지니고 있으므로 향후의 뮤신유리 관련 약리 연구에서 보다 더 *in vivo* 상태와 유사한 실험모델로서 이용될 수 있을 것이다. 또한, 기존의 HTSE culture를 이용한 약리 연구에서 사용되었던 수종의 뮤신 secretagogue 및 분비(유리) 억제물질(Ko, 1995, Ko *et al.*, 1999)의 약리 작용을 공기-액체 접면 일차 배양법을 이용한 모델에도 적용하여 동일한 결과를 얻을 수 있는지에 대해서도 검증해 보아야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Adler, K.B., Schwarz, J.E., Anderson, W.H., and Welton, A.F. (1987). Platelet-activating factor stimulates secretion of mucin by explants of rodent airways in organ culture. *Exp. Lung Res.*, 13, 25-43.

Chakrin, L.W., Baker, A.P., Spiser, S.S., Wardell, J.R.Jr., De Sanctis, N., and Dries, C. (1972). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 105, 368-381.

Clark, J.N. and Marchok, A.C. (1979). Characterization of mucin isolated from rat tracheal transplants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 588, 357-367.

Coles, S.J., Neil, K.H., and Reid, L.M. (1984). Potent stimulation of glycoprotein secretion in canine trachea by substance P. *J. Appl. Physiol.*, 57, 1323-1327.

Gallagher, J.T. and Kent, P.W. (1975). Structure and metabolism of glycoproteins and glycosaminoglycans secreted by organ cultures of rabbit trachea. *Biochem. J.*, 148, 187-196.

Houdret, N., Lamblin, G., Scharfman, A., Humbert, P., and Roussel, P. (1983). Activation of bronchial mucin proteolysis by 4-aminophenylmercuric acetate and disulfide bond reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 758, 24-29.

Kaartinen L., Nettekheim, P., adler, K.B., and Randell, S.H. (1993). Rat tracheal epithelial cell differentiation *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A, 481-492.

Kim, K.C. and Brody, J.S. (1987). Gel contraction causes mucin release in primary hamster tracheal epithelial cells growing on a collagen gel. *J. Cell. Biol.*, 105, 158a.

Kim, K.C. (1985). Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucinlike glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro.*, 21, 617-621.

Kim, K.C., Opaskar-Hincman, H., and Bhaskar, K.R. (1989). Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: Mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp. Lung Res.*, 15, 299-314.

Kim, K.C., Rearick, J.I., Nettekheim, P., and Jetten, A.M. (1985). Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial

- cells in primary culture. *J. Biol. Chem.*, 260, 4021-4027.
- Klinger, J.D., Tandler, B.T., Liedke, C.M., and Boat, T.F. (1984). Proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* evoke mucin release by tracheal epithelium. *J. Clin. Invest.*, 74, 1669-1678.
- Ko, K.H. (1995). Inhibitor for secretion of mucin. The patent in the Republic of Korea, Registered No. 6828.
- Ko, K.H., Lee, C.J., Shin, C.Y., Jo, M.-J., and Kim, K.C. (1999). Inhibition of mucin release from airway goblet cells by polycationic peptides. *Am. J. Physiol.*, 277(21), L811-L815.
- Lechner, J.F., Haugen, A., McClendon, I.A., and Pettis, E.W. (1982). Clonal growth on normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro*, 18, 800-812.
- Marom, Z., Shelhamer, J.H., and Kaliner, M. (1981). Effects of arachidonic acid derivatives on the release of mucous glycoproteins from human airways. *J. Clin. Invest.*, 67, 1695-1703.
- Mian, N., Anderson, C.E., Pope, A.J., and Kent, P.W. (1982). Physicochemical properties of avian tracheal mucus. *Biochem. J.*, 201, 533-542.
- Niles, R.M., Christensen, T.G., Breuer, R., Stonc, P.J., and Snider, G.L. (1986). Serine proteases stimulate mucous glycoprotein release from hamster tracheal ring organ culture. *J. Lab. Clin. Med.*, 108, 489-497.
- Rearick, J.I., Kim, K.C., Nettesheim, P., and Jetten, A.M. (1984). Hamster mucin secreted *in vitro* contains poly-N-acetyllactosamine oligosaccharides. *Fed. Proc.*, 43, 1696.
- Shelhamer, J.H., Marom, Z., and Kaliner, M. (1980). Immunologic and neuropharmacologic stimulation of mucous glycoprotein release from human airways *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 66, 1400-1408.
- Shelhamer, J.H., Marom, Z., Logun, C., and Kaliner, M. (1984). Human respiratory mucous glycoproteins. *Exp. Lung Res.*, 7, 149-162.
- Sherman, J.M., Cheng, P.W., Tandler, B., and Boat, T.F. (1981). Mucous glycoproteins from cat tracheal goblet cells and mucous glands separated with EDTA. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124, 476-479.
- Wasano, K., Kim, K.C., Niles, R.M., and Brody, J.S. (1988). Membrane differentiation markers of airway epithelial secretory cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 167-178.
- Woodward, H., Horscy, B., Bhavanandan, V.P. and Davidson, E.A. (1982). Isolation, purification and properties of respiratory mucus glycoproteins. *Biochemistry.*, 21, 694-701.
- Wu, R. and Smith, D. (1982) Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium. *In Vitro*, 18, 800-812.