

폐포대식세포의 시험관내 자극이 폐섬유화에 미치는 영향

인하대학교 의과대학 예방의학교실

오 민 화

— Abstract —

Regulatory Effect of Alveolar Macrophage Released Factor on Pulmonary Fibrosis in Vitro

Min Wha Oh

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Inha University

Interstitial lung disorders are characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract that include increased numbers of activated alveolar macrophages and fibroblasts. These increased numbers of fibroblasts may be influenced by the alveolar macrophage released factor which was known as alveolar macrophage derived growth factor.

To evaluate this hypothesis, alveolar macrophages from bronchoalveolar lavage fluid in rat were incubated with various stimulants including lipopolysaccharide(LPS), free silica dust(SiO₂), natural carbon dust(NC) for 4 hours and we added these supernatants to the culture of fibroblasts. And we evaluated the fibroblast proliferation, ATP and protein in 1, 2, 3 days.

The results were as follows;

1. The number of fibroblasts in groups of LPS and SiO₂ show significant increase in comparison with the control group but there was no difference between NC and control groups.
2. The measurements of ATP in groups of LPS and SiO₂ tended to be higher than those in the control, and also higher in NC group at the 2nd day than those of control.
3. The amount of protein in LPS and SiO₂ increased markedly compared with the control group but there was no difference between NC and control groups.
4. In LPS group, we can observe the decrease of ATP and protein after the peak at the 1st day, but SiO₂ group show the continuous increase of ATP and protein during the observation period.

*본 연구는 1994년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었음

5. Increased proportion of ATP and protein indicated their sensitive changes compared with the fibroblast proliferation.

These results suggest alveolar macrophages act as the important integrator of the fibrotic process in interstitial lung disorders.

서 론

진폐증을 비롯한 각종 간질성폐질환의 특징은 폐포대식세포의 수 또는 활동성의 증가와 폐포벽에서의 섬유모세포의 빈번한 출현으로 요약된다(Bitterman 등, 1983). 주지하는 바와 같이 폐포대식세포는 이물질의 탐식작용을 할 뿐 아니라 염증 및 면역반응의 매개 역할 그리고 폐포대식세포 자체에서 이루어지는 항원처리과정이나 각종 효소 및 cytokine의 생성과 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다(Hunninghake 등, 1979).

폐포벽의 섬유화는 일반적으로 비가역적 변화이므로 이 질환을 이해하고 폐포-모세혈관으로 구성된 폐기분구조의 비가역적 기능소실을 예방하기 위하여 섬유화를 조절할수 있는 기전의 연구가 필요하다. 이 섬유화 기전에 있어 주로 생산되는 물질은 폐포대식세포유래 성장인자 (alveolar macrophage derived growth factor: AMDGF)로서 18,000 D의 단백질(Bitterman 등, 1982)이며 섬유모세포의 증식을 자극시킴으로써 결국 폐섬유화를 유발한다.

최근 발달된 분자생물학과 생화학적 분석법을 이용하여, 단핵세포에서 분비하는 섬유화 조절에 관여하는 cytokine으로 interleukin-1(IL-1), tumor necrotic factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), fibroblast growth factor(FGF), platelet derived growth factor(PDGF), transforming growth factor-b(TGF-b)를 분리하였으며(Elizabeth, 1991), AMDGF의 생화학적 구조, 특징, 그리고 cDNA cloning을 통하여 새로운 물질 연구가 진행 중이나 아직 정확한 분리나 합성은 어렵고 더우기 그에 관한 생체실험은 거의 발표된 바가 없다. 최근 TNF- α 의 교잡법(hybridization)을 이용하여 단일클론항체를 실험 규폐증의 쥐에 투여하여 치료 효과를 보고한 바 있고(Peuket, 1992) 그 외 IL-1에 관해서도 많은 연구들이 진행, 발표되고 있다.

진폐증에 있어 이와 같은 다양한 면역요법을 시도하기 위하여는 우선 시험관내 세포배양을 통한 폐포대식세포 분비물질의 연구가 필요하며 이 물질들의 분리, 추출을 통하여 섬유모세포의 증식에 대한 연구가 수반되어야 할 것이다.

현재 국내에서는 동물을 이용한 실험진폐증에서의 여러 연구가 발표된 바 있으나 이러한 동물실험에서 생체효과가 나타나기에는 많은 시간과 물량이 소요된다는 것을 감안할 때 시험관내 세포배양연구가 기본적으로 선행되어야 할 것으로 사료된다.

따라서 저자는 쥐의 기관지폐포세척액에서 추출한 폐포대식세포에 여러가지 자극물질을 투여하여, 이 물질들이 섬유모세포 증식에 미치는 영향을 연구하고자 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

체중 200g 내외의 수 흰쥐(Sprague-Dawley계) 8 마리를 동일한 조건에서 2주간 사육한 후 기관지폐포세척술을 시행하였다.

2. 폐포대식세포의 자극물질

- 1) lipopolysaccharide (LPS) (Sigma); 2mg/ml
- 2) free silica dust (Sigma); 0.5mg/ml

3) natural carbon dust; 5 mg/ml (강원도 소재 모탄광의 채탄 막장에서 얻은 탄괴를 금강연구소에서 분쇄하여 사용하였고 입자의 크기는 0.15-8.0mm 이고 그 중 1-5mm 크기의 분진은 약 30.9 %였으며 총 분진 중 81%는 탄분진, 7.4%는 유리규산 분진 이었고 나머지 18.9 %는 유황, 알루미늄, 마그네슘, 철, 나트륨, 칼슘이었다).

3. 실험 방법

1) 폐포대식세포의 배양

흰 쥐를 ketamine으로 전신마취한 다음 복부를 절개하고 하대정맥과 대동맥을 절찰한 후 쥐의 심장에 24G 주사바늘을 삽입하고 인산염완충용액(phosphate buffered saline)을 폐장이 창백해질 때까지 관류시키고 즉시 심장을 절찰한다. 기도를 절개한 후 우측폐에 정맥도자(14번)를 삽입하여 37 °C PBS 0.15 cc/gram(총 45-50cc)를 10회로 나누어 세척하고 Wright-Giemsa 염색으로 폐포대식세포가 90 % 이상임을 확인하였으며 각 세포의 백분율은 표 1과 같다(Table 1). 이를 다시 2회 원심분리(1000 g, 5분)하여 1×10^6 세포/ml로 적정한 후

24 well plate에 각각 1 ml씩 분주하여 이를 대조군으로 하였고 실험군으로는 자극제로 LPS 2mg/ml, 유리규산분진 0.5mg/ml, 자연산석탄분진 5mg/ml을 각각 첨가하여 37°C 이산화탄소배양기(CO₂ 10%)에서 4시간 배양시킨다. 4시간 후 세포의 상층액을 추출하여 0.22 μ filter (Millipore Corp. Bedford, MA)로 세포를 거른후 -20°C에 저장하였다.

2) 섬유모세포의 배양

섬유모세포는 임신 초기 (1주 정도)의 암컷 흰쥐로부터 태아 일차세포배양법(Culture of animal cell, 1987)을 참고하여 배양하였는데, 간단히 기술하면 흰쥐를 우레탄으로 마취시킨 후 복부피포를 70% 알콜로 깨끗이 소독하여 개복하고 자궁내 태아를 확인하여 밀균된 페트리 접시에 분리하여 놓는다. 약 10개 정도의 태아를 멸균된 PBS로 세척하고 두부, 발, 꼬리, 복부장기 등을 안과용 가위와 핀셋으로 세밀하게 제거한 후 나머지 부분을 다시 2-3회 멸균 PBS로 세척한다.

페트리 접시에서 가위와 칼날을 이용하여 평방 1 mm가 되도록 잘게 다진후 이것을 0.25% 트립신 용액에 넣어 자성막대를 이용하여 약 20분간 흔들어준다. 이 용액을 5분간 방치한 후 상층액은 10%의 우태아혈청을 가한 후 따로 4°C의 냉장고에 보관하고 나머지 조직은 다시 트립신용액에 섞어 20분간 흔들어 처리한 후 10% 우태아혈청을 넣어 먼지의 세포액과 섞어 3겹 거즈에 거른다. 1:1 용량으로 RPMI 배지를 섞은 후 1000 rpm으로 10분간씩 2회 원심분리하여 적혈구 등을 제거하고 이를 0.4% 우태아혈청이 포함된 RPMI로 1x10⁶ 개/ml이 되도록 적정하여 24 well plate에 well당 1 ml씩 분주한다. 배양액은 2일에 한번씩 교체하였으며 4일간 배양한 후 -20°C에 보관중인 자극제를 첨가하였다.

3) 섬유세포의 성장 측정

섬유모세포는 배양용기의 벽에 부착되어 자라므로 섬유모세포의 증식을 알기 위하여 배양 후 24시간마다 0.25% trypsin으로 벽에 붙은 세포를 용해시켜 trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 그 수를 측정하였으며 4일간 배양 후 -20°C에 보관중인 폐포대식세포 상층액을 녹여 각 well당 1 ml씩 분주하였고 대조군에는 RPMI를 1 ml 첨가하였다. 그리고 1, 2, 3일후 각 well로부터 전술한 바와 같이 trypan blue로 세포수를 측정하였다.

4) ATP의 농도 측정

세포내 ATP는 luciferin과 luciferase를 이용한

생물발광법(bioluminescence)으로 측정하였는데, 즉 1x10⁶ 섬유모세포의 well당 10% trichloroacetic acid 40μl를 넣어 ATP를 유리시킨 후 0.1 M Tris/EDTA (pH 7.75) 60μl를 첨가하였다. Polystylen Cuvette(Clinicon 2174-08, Sweden)에 1μl의 시료를 넣은 후 ATP 측정시약(LKB 1243-200) 80μl를 첨가하여 vortex mixer로 잘 섞은 후 luminometer(Bio-Orbit 1250, Finland)로 ATP 농도를 측정하였다.

5) 단백질양 측정

96 well microplate 2N NaOH를 80μl씩 분주하고 측정하고자 하는 well로부터 2μl의 시료를 첨가한 후 증류수에 1:1로 섞은 Coomassie blue 용액(assay agent, Pierce, USA) 200μl를 섞어 2분간 vortex mixer로 잘 섞은 후 570 nm에서 ELISA reader(MR 700, Dynatech, USA)로 측정하였다.

6) 유의성 검정

모든 측정치는 3회 이상씩 반복시행하여 평균±표준편차로 표시하였으며 Student's t-test로 유의성을 검정하였다.

성 적

1. 폐포대식세포의 배양

1x10⁶으로 적정한 폐섬유모세포는 배양후 1, 2, 3, 4일에 각각 1.4x10⁵, 1.7x10⁵, 1.8x10⁵, 2.1x10⁵으로 완만한 증식을 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

2. 각종 자극에 의한 폐섬유모세포의 증식

4일간 배양한 섬유모세포의 24 well plate에 LPS, SiO₂, NC으로 자극을 가한 후 1, 2, 3일 경과 후 세포의 증식을 측정하였다. 대조군에 비하여 LPS군과 SiO₂군은 1, 2, 3일에 모두 유의한 증가를 보였으나 두 군 모두 시간 경과에 따른 유의한 변화는 보이지 않았으며 NC군은 대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 2).

3. 각종 자극에 따른 ATP의 변화

24 well plate에 4일간 배양한 섬유모세포에 여러 가지 자극을 가한 후 well로부터 ATP를 측정하고 결과 대조군에 비하여 LPS군은 배양 1, 2, 3일 모두 뚜렷한 증가를 보였고 배양 2일과 3일에는 1일에

Table 1. Percentages of various cells to the total number of cells in the bronchoalveolar lavage fluid (n=8)

| total 10 ⁵ /ml | macrophage % | lymphocyte % | neutrophil % | eosinophil % |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2.1 ± 0.3 | 9.2 ± 3 | 5 ± 1 | 2 ± 1 | 1 ± 1 |

Table 2. Changes in number of fibroblasts by the various stimulants (x10⁵)

| | control | LPS | SiO ₂ | NC |
|----|------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | 2.1 | 2.1 | 2.1 | 2.1 |
| 1d | 2.2 ± 0.3 | 3.4 ± 0.5* (154 ± 14) | 2.6 ± 0.4* (118 ± 20) | 2.2 ± 0.2 (100 ± 11) |
| 2d | 2.2 ± 0.4 | 3.3 ± 0.4* (150 ± 19) | 2.6 ± 0.3* (118 ± 12) | 2.3 ± 0.3 (105 ± 11) |
| 3d | 2.3 ± 0.33 | 3 ± 0.3* (143 ± 21) | 2.7 ± 0.3* (117 ± 13) | 2.1 ± 0.2 (91 ± 10) |

* p<0.01 compared with control group. ():%

비하여 약간씩 감소하는 경향을 나타내었으며 유의하지는 않았다. SiO₂군과 NC군은 모두 대조군에 비하여 ATP가 유의하게 증가하였으며 이 증가는 시간에 따라 계속되었다(Table 3, Fig. 3).

4. 각종 자극에 따른 단백질량의 변화

각 well로부터 단백질의 양은 대조군에 비하여 LPS군과 SiO₂군에서는 모두 유의한 증가를 나타내었으나 LPS군에서는 배양 후 1일에 가장 그 증가의 폭이 컸고 2일, 3일에 점차 감소한 것에 반하여 SiO₂군에서는 점차 그 증가가 뚜렷하였다(Table 4, Fig. 4).

고 찰

정상상태의 폐에서 섬유모세포는 자극인자와 억제인자의 균형에 의하여 아주 적은 폭으로 그 증식이 조절되나(Evans and Bils, 1969), 일단 어떤 이유로 인해 섬유모세포의 수가 증가하면 일정한 균형을 잃게 되어 폐포벽에서의 섬유모세포의 숫적인 증가와 그로 인한 교원질의 축적이 일어난다(Bitterman 등, 1982).

본 실험에서 저자는 체내 단핵세포의 일종인 폐포대식세포가 섬유모세포 증식속도의 조절에 영향을 준다는 것을 밝혔다. 즉 무자극상태의 폐포대식세포에서 추출한 물질은 섬유모세포에 별다른 영향을 미치지 않는 반면, 독소나 유리규산 그리고 자연산 석탄분진으로 자극을 가한 폐포대식세포에서 유리된

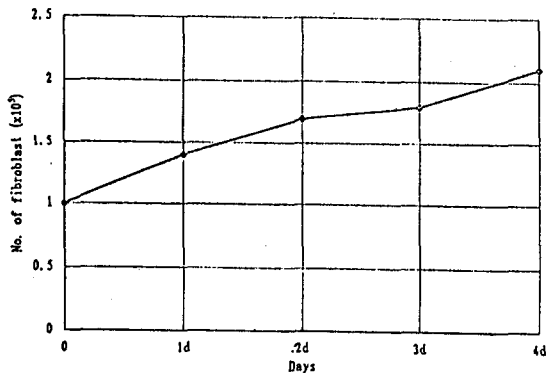


Fig 1 Changes in number of fibroblasts by the time course

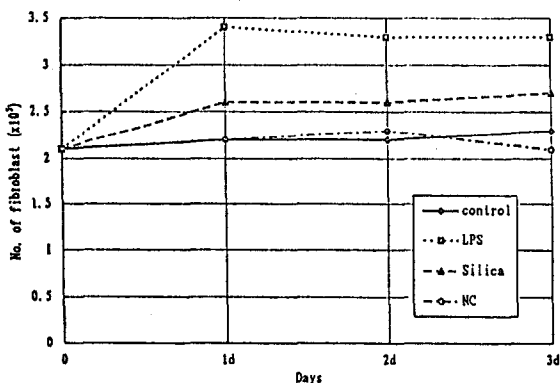


Fig 2. Changes in number of fibroblasts according to the various stimulants

물질에는 섬유모세포의 증식효과가 있었다. 또한 Eaves와 Bruce(1974)는 이러한 물질의 분비가 LPS를 썼을 경우 폐포대식세포뿐 아니라 복강내 대식세포, 혈액내 단핵세포에서도 유사한 증식효과가 있음을 밝혔다. 폐포대식세포는 모든 자극에 대해 폐섬유화를 촉진하는 것은 아니다. 염증과 면역반응에 관계된 IgG, C3b 그리고 세포독성이 있는 분자에 대하여 폐포대식세포는 섬유모세포의 성장인자뿐 아니라 IL-1(Unanue 등, 1976), CSF(colony stimulating factor) (Golde VW 등, 1972; Burgass & Metcalf, 1980) 등을 분비한다(Reynolds 등, 1975; Green and Kass, 1964). 염증과 면역반응에 관계되는 신호전달인자에는 여러 가지 매개물질들 즉 lysosomal hydrolase(Davies 등, 1974), prostaglandins (Bonney 등, 1978), reactive oxidant species(Johnston 등, 1978) 그리고 neutrophil chemotactic factor(Hunninghake 등, 1980) 등과 그의 성장인자들이 있

Table 3. Changes of ATP according to the various stimulants (mg/ml)

| | control | LPS | SiO ₂ | NC |
|----|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 1d | 0.06 ± 0.01 | 0.20 ± 0.05* (338 ± 28) | 0.12 ± 0.01* (200 ± 17) | 0.08 ± 0.01* (133 ± 13) |
| 2d | 0.07 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02* (257 ± 25) | 0.15 ± 0.01* (214 ± 18) | 0.11 ± 0.02* (157 ± 12) |
| 3d | 0.09 ± 0.02 | 0.15 ± 0.01* (167 ± 23) | 0.20 ± 0.02* (222 ± 18) | 0.11 ± 0.01* (122 ± 11) |

* p<0.01 compared with control group. ():%

Table 4. Changes of protein by the various stimulants (mg/ml)

| | control | LPS | SiO ₂ | NC |
|----|------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 |
| 1d | 2.0 ± 0.02 | 6.1 ± 0.5* (305 ± 21) | 4.5 ± 0.4* (225 ± 20) | 2.1 ± 0.3 (105 ± 13) |
| 2d | 2.1 ± 0.03 | 5.8 ± 0.5* (247 ± 21) | 5.0 ± 0.5* (238 ± 20) | 2.2 ± 0.4 (105 ± 12) |
| 3d | 2.4 ± 0.03 | 4.1 ± 0.6* (170 ± 15) | 5.2 ± 0.4* (217 ± 19) | 2.5 ± 0.4 (104 ± 16) |

* p<0.01 compared with control group. ():%

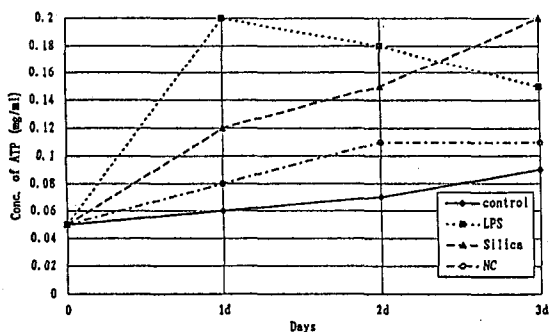


Fig 3. Changes of ATP according to the various stimulants

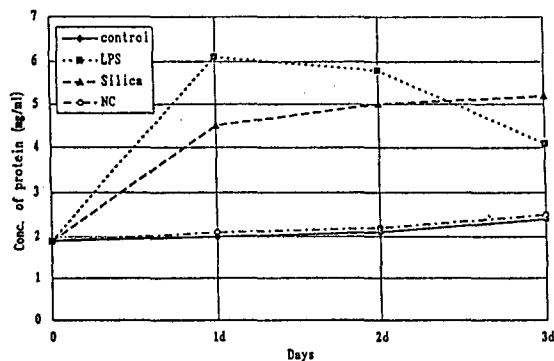


Fig 4. Changes of protein by the various stimulants

다. William 등(1991)도 직업에 의한 유리규산이나 석면분진에 장기간 폭로될 때 폐포대식세포로부터 섬유모세포 성장인자의 활성이 분진의 비폭로군에 비해 유의하게 증가하였음을 보고하였으며, 특히 폐의 기능상 장애가 있을 경우에는 증가의 폭이 더욱 컸다고 하였다.

그들은 이러한 무기성 분진으로 인한 염증을 neutrophil chemotactic factor, reactive oxidants 그리고 섬유모세포 성장인자등의 중간물질 분비로 인한 것이라고 설명하였다. 본 실험에는 섬유모세포의 증식을 알아보기 위하여 현미경에 의한 직접적인 세포수의 측정외에 ATP와 단백질양을 정량하였다. Maurizio 등(1989)은 폐조직절편에서 세포호흡억제제를 투여할 때 ATP및 단백질합성이 민감하게 저하되었음을 보고하였다. 본 실험에서는 자극물질의 투여로 인한 세포증식이 세포호흡 및 세포대사의 에너지원인 ATP와 세포질내 단백질양을 변화시킬 것으로 보고 그 변화량을 측정함으로써 그 세포의 증식과 대사활동상태를 간접적으로 측정하였다. 측정 결과, 각 자극에 따라 세포의 증가는 모든 방법에서 비교적 뚜렷하였으나 대조군에 대한 백분율 비교시 그 변화 폭에 있어 직접적인 세포수의 측정정보보다 ATP나 단백질양이 더 민감한 반응을 보였다. 폐포단핵세포가 유리규산분진에 의하여 폐포대식세포를 자극시켜 규폐증을 유발한다는 것이

Heppleston과 Style(1967)에 의하여 제안되었고, 그 후 많은 연구자들이 유리규산(Schmidt JA 등, 1984), bleomycin(Phan 등, 1985), 석면(William NR 등, 1991)을 폐포대식세포 자극인자로 사용하여 섬유모세포로부터 교원질을 측정하였으나 여러가지 방법론적 차이에 의하여 그 결과는 큰 차이를 보였다. 본 실험에서는 폐포대식세포를 LPS로 자극한 후 그 배양상층액을 섬유모세포에 첨가하여 3일간 배양시킨 결과 배양 1일 후에는 대조군에 비하여 크게 그 수가 증가하였지만 그 뒤 2일, 3일에는 점차 감소하는 경향을 보였는데 이는 Elias 등(1985)의 결과와 유사하였으며, 그들은 이러한 섬유모세포 증식억제가 prostaglandin E의 증가로 인한 항염작용으로 설명하였다. Moniak 등(1987)이 생체내에서 폐염을 유발할 수 있는 내독소에 의하여 폐포대식세포가 자극을 받을 경우 초기에는 섬유모세포의 증식효과가 나타나지만 시간이 경과함에 따라 prostaglandins 등의 중간 매개물질에 의하여 다시 증식속도가 느려져 결국 정상상태로 조절된다고 한 것과 비교하여, SiO₂나 NC는 내독소, 즉 LPS에 의한 전형적 염증반응과는 다른 병태생리를 보이는 것이라고 추론할 수 있고 이 차이를 밝히는 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. Clark 등(1987)은 정상및 bleomycin 처리 hamster에서 함유된 배양액내 혈청의 농도가 높을 때에는 섬유모세포의 증식을 억제시키지만 저농도에서는 증식을 자극한다고 하였으나, 본 저자가 섬유모세포를 2% 우태아혈청에 포함된 유지(maintenance)배지에 배양하였을 때에도 비슷한 증식효과를 관찰하였으므로 섬유모세포의 증식이 반드시 배지내의 혈청농도에 의해 영향을 받을 것으로 생각되지는 않으나 이러한 인자들이 모두 단핵세포에 의한 섬유모세포 성장인자 분비에 어떤 영향을 미친다는 가능성은 배제할 수 없다. 이상의 결과에서 폐포대식세포에 투여한 LPS, SiO₂, NC는 모두 폐섬유모세포의 증식을 자극시키는 물질을 분비하였고 그 증식효과는 자극물질에 따라 차이가 있음으로 미루어 향 후 폐섬유화를 조절하는 물질의 분리, 합성및 그의 생체반응에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

폐섬유화를 유발하는 간질성폐질환에서 폐포대식세포가 섬유모세포의 증식을 조절하는 데에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 흰쥐의 기관지폐

포세척액에서 분리한 폐포대식세포에 각각 LPS(2 mg/ml), SiO₂(0.5 mg/ml), NC(5 mg/ml)을 첨가하여 4시간 배양한 후 그 배양상층액을 폐섬유모세포에 투여하여 그 증식을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 0.4%의 우태아혈청만을 첨가하여 섬유모세포를 배양시 세포의 수는 배양 4일까지 아주 느린 증식을 보였고 그 이후에도 큰 변화를 나타내지 않은 데 반하여, LPS군과 SiO₂군은 모두 대조군에 비하여 큰 증식효과를 보였고 NC군은 유의한 변화가 없었다.

2. 섬유모세포증식을 간접적으로 보기 위하여 ATP를 측정한 결과 LPS군과 SiO₂군은 1, 2, 3일 그리고 NC군은 1, 2일에서 모두 대조군과 비교시 유의한 증가를 보였으며, 3. 각 군의 단백질양을 비교한 결과 LPS군과 SiO₂군에서는 배양 1, 2, 3일에서 모두 대조군과 비교시 유의한 증가를 보였으나 NC군에서는 별 차이가 없었다.

4. 섬유모세포의 증식을 측정하기 위한 여러 방법 중 시간에 따른 변화를 대조군에 대한 백분율 변화로 비교시 직접 세포수를 측정하는 방법에 비하여 APT와 단백질양 측정법이 민감한 반응 보여, LPS군에서는 배양 1일에서 그 증가가 가장 컸으며 그 이후에는 점차 감소하는 것으로 나타났으며 SiO₂군과 NC군은 시간에 따라 점차 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과는 폐섬유화과정에서 폐포대식세포가 섬유모세포 증식에 영향을 미치는 물질을 분비하며, 이 물질은 자극물질에 따라 세포증식에 차이를 보여 폐섬유화반응의 정도를 조절할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

- Bitterman PB, Adelberg S and Crystal RG. Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. J Clin Invest. 1983; 72: 1801-1813.
- Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease. Evaluation by bronchoalveolar lavage. Am J Pathol. 1979; 97: p149.
- Bitterman PB, Rennard SI, Hunninghake GW and Crystal RG. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts. Regulation and partial characterization. J Clin Invest. 1982; 70: 806-

Elizabeth JK. Fibrogenic cytokines, the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today* 1991; 12(1).

Peuget PF. In "Xenobiotic induced Inflammation, Roles of Cytokines and Growth Factors" (Schook LB and Laskin DL eds.). San Diego: Academic Press, 1992.

Culture of animal cells; A manual of basic technique (2nd ed.). Chap. 9: Disaggregation of the tissue and primary culture. New York: R. Ian Freshney Inc., 1987: 107-126.

Allen RC, Stjernholm RL and Steele RH. Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bacteriocidal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 47: 679-684.

Evans MJ and Bilis RF. Identification of cells labelled with tritiated thymidine in pulmonary alveolar walls of the mouse. *Am. Rev Res Dis.* 1969; 100: 372-378.

Bitterman PB, Rennard SI, Adelberg S and Crystal RG. Role of fibronectin as a growth factor for fibroblast. *J Cell Biol.* 1982.

Eaves AC and Bruce WR. In vitro production of colony stimulating activity I. Exposure of mouse peritoneal cells to endotoxin. *Cell Tissue Res* 1974; 7: 19-30.

Unanue ER, Kiely JM and Calderon J. The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages II. Conditions leading to increased secretion. *J Exp Med.* 1976; 144: 155-166.

Golde VW, Finleg and Cline MJ. Production of colony stimulating factor by human macrophages. *Lancet* II 1972: 1397-1399.

Burgess AW and Metcalf. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980; 56: 947-958.

Reynolds HJ, Atkinson H, Newball and Frank M. Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. *J Immunol.* 1975; 114: 1813-1819.

Green GM and Kass EM. The role of the alveolar macrophages in the clearance of bacteria from the lung. *J Exp Med.* 1964; 119: 167-176.

Davies P, Page RC and Allison AC. Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolase in macrophages exposed

to group A streptococcal cell wall substance. *J Exp Med.* 1974; 139: 1262-1282.

Bonney RJ, Wightman PD, Davies P, Sadowski SJ, Kuele FG Jr and Humes J. Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by arrouse peritoneal macrophages. *Biochem J.* 1978; 176: 433-442.

Johnston RB Jr, Godzik CA and Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med.* 1978; 148: 115-127.

Hunninghake GW, Gadek JE, Fales HM and Crystal RG. Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils; Stimuli and partial characterization. *J Clin Invest.* 1980; 66: 473-483.

Williams NR, Williams DT and Arnold RB. Cellular and molecular basis of the asbestos-related disease. *Am. Rev Res Dis.* 1991; 143: p408.

Maurizio FM, Lucy T, Brenda D and George DV van Rossa. Effects of Monensin on ATP levels and Cell functions in Rat liver and lung in vitro. *J Membrane Biol.* 1989; 108: 235-246.

Heppleston AG and Styles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formulation by silica. *Nature (Lond.)* 1967; 214: 521-522.

Schmidt JA, Oliver CN, Lepe-Zuniga JLL, Grenn I and Gery I. Silica-stimulated Monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1; A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. *J Clin Invest.* 1984; 73: 1462-1472.

Phan SH, Varan J and Smith D. Rat lung fibroblast Collagen Metabolism in Bleomycin-induced Pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1985; 76: 241-247.

Elias JA, Rossman MD, Zarich RB and Daniele RP. Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. *Am Rev Res Dis.* 1985; 131: 94-99.

Monik M, Raymond C, Sergle P, Pierre B. Human alveolar macrophage suppress interleukin-1 activity via the secretion of prostaglandin E2. *Am. Rev Res Dis.* 1987; 135: p72.

Clark JG and Greenberg J. Modulation of the effects of alveolar macrophages on lung fibroblast collagen production rate. *Am. Rev Res Dis.* 1987; 135: 52-56.