

## 유육종증에서 단핵구의 교원질에 의한 Procoagulant Activity와 종양괴사인자- $\alpha$ 의 표현\*

계명대학교 의과대학 내과학교실

### 전영준

#### 서 론

유육종증은 폐간질내에 교원질과 같은 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 축적과 단핵구 침윤을 특징으로 하는 육아종성 폐 질환이다<sup>1)</sup>. 단핵구는 어떤 원인인자에 의해서 활성화되면 interleukin-1(IL-1), 종양괴사인자- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor(TGF)와 같은 cytokine을 분비시켜서 섬유아세포를 활성화시켜 교원질 및 fibronectin과 같은 세포외기질을 분비시키게 하는 것<sup>2,4)</sup>으로 알려져 있다. 단핵구는 간질내에 축적된 세포외기질에 의해서 다시 활성화되고 같은 반응이 되풀이되어 간질성 폐질환이 진행되므로 폐섬유증으로 진행되는 것으로 생각되고 있다.

단핵구가 활성화되면 procoagulant activity(PCA)가 증가되어 응고반응이 증가되고 섬유소의 축적이 일어나며 이 섬유소는 "provisional ECM"의 일부를 형성하여 여기에 염증세포와 섬유아세포가 이동하여 염증 및 섬유화 병소를 형성한다<sup>5)</sup>. 또 교원질은 말초혈액의 단핵구로부터 IL-1을 분비하게 하는 것<sup>6)</sup>으로 밝혀졌다.

교원질이 말초혈액단핵구와 폐포대식세포에서 TNF- $\alpha$ 를 분비시키는지 또 PCA를 증가시키는지에 대한 연구는 찾아볼 수 없다. 유육종증은 폐, 텁포질, 심장, 신경계, 간, 근골격 등의 장기를 침범하는 전신질환으로서 폐포대식세포는 물론 말초혈액단핵구도 이미 자극되어서 이를 세포가 자극없이 저절로 TNF- $\alpha$ 와 PCA를 분비하고 세포외기질인 교원질이 이를 세포를 자극할 수 있는 것으로 생각된다.

이에 저자는 교원질이 단핵구를 자극하여 섬유소

형성에 중요한 PCA와 육아종 형성과 섬유화에 중요한 역할을 하는 TNF- $\alpha$ 를 분비시킬 수 있는지를 알아보기로 정상인과 유육종증 환자의 말초혈액단핵구와 기관지 폐포세척술(bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하여 얻은 폐포대식세포(alveolar macrophage, AM)를 분리하여 교원질을 첨가한 배지에서 배양하여 procoagulant activity와 granulomagenic cytokine인 TNF- $\alpha$ 를 측정하였다.

#### 재료 및 방법

##### 대상

건강한 정상인과 조직학적으로 증명된 유육종증 환자 각각 10명의 말초혈액 및 기관지폐포세척액을 채취하였다. 정상인은 최근 1개월간 호흡기 증상이 없고 흉부사진상 정상소견을 보였으며 폐기능검사상 정상범위에 속하는 성인을 대상으로 하였다. 유육종증 환자는 흉부사진상 stage II내지는 stage III에 속하는 환자를 대상으로 하였다.

##### 단핵구의 분리

단핵구의 분리는 말초혈액은 기관지경검사 직전에 전완전부정맥에서 citrated vacutainer tube(Becton Dickinson, Rutherford, NJ)를 이용하여 채취하여 실온에서 400×g에서 10분간 원심분리하여 혈장은 소독된 polystyrene pipet를 이용하여 채취하고 Ficoll/Hypaque로 분획하여 단핵구를 분리하였다. RPMI 1640 medium으로 2번 세척하고 RPMI 1640 + 10% heat-inactivated FBS(Endotech™, Scharz/Mann Biotech, Cleveland, OH)로서 내독소 오염여부를 확인하였다.)에 1×10<sup>6</sup>cells/ml농도로 재 혼탁시켰다. Trypan blue 염색을 시행하여 단핵구의 90% 이상의 viability를 확인하였다.

##### 기관지폐포세척(broncholaveolar lavage, BAL)

\* 이 논문은 1993년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

기관지폐포세척은 국소마취하에 기관지섬유경을 이용하여 우증엽의 기관지세분절에서 시행하였다. 150ml(50ml씩 3번)의 무균 생리식염수를 주입하여 세척액을 얻었으며 평균 획득량은 정상인은 99ml (median 99, range 66-120ml), 유육종증 환자는 평균 81ml(median 80, range 62-100ml)이었다. 세척액은 어름에 채워서 laminar-flow hood에서 무균 거즈를 통과시킨 후 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 Wright's stain으로 염색하고 감별계수는 field당 100 개의 세포를 4 field에서 세어서 계산하였다. Cell pellet은 RPMI 1640/10% FBS with penicillin/streptomycin & glutamine(Mediatech, Washington D.C) 1.0ml에 재현탁하여 hemocytometer를 이용하여 총 세포수를 계산하였다.

BAL cell은 cytopspine을 실시하여 Diff Quick stain을 시행하여 감별계수를 시행하였다. 평균 총 세포수는 유육종증 환자에서 정상대조군( $12. \pm 1.2$ )에 비하여 월등히 높았다( $32 \pm 4.36$ ,  $P < 0.02$ ).

#### Cell culture

말초혈액단핵구와 폐로대식세포는 collagen stimulation group은 배양용 collagen(Sigma, St. Louis, Mo) 100 $\mu$ g/ml을 배지에 추가하였고 untreated cell과 lipopolysaccharide(LPS)-treated cell은 negative and positive internal control로 사용하였다. LPS-treated cell은 E. coli endotoxin(LPS) (Sigma, St. Louis, MO 10 $\mu$ g/ml을 첨가하여 각각 24시간 배양 후에  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.)

#### Procoagulant assay(PCA)

배양된 세포는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다가 녹이는 작업을 반복하여 cell lysate를 만들었다. PCA는 fibrrometer(Data Clot 2, Helena Laboratories, Beaumont, Tx)를 이용하여 citrated plasma의 recalcification time을 측정하였다. 정상 citrated plasma (source of fibrinogen)은 건강한 자원자들로부터 혈액을 채취하여 3000 $\times g$ 에서 30분간 원심분리하여 혈소판을 제거하여 만들었다.

Cell lysate 시료 100 $\mu$ l를 citrated plasma 100 $\mu$ l과  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 항온배양한 후, 20mM calcium chloride를 빠르게 점적하여 clot formation 될 때까지의 시간을 측정하였다. PCA는 Geczy와 Meyer, 1982의 방법으로 index를 산출하였으며, index가 높을수록 PCA는 높게 나타났다. PCA는 rabbit brain thromboplastin(Sigma, St. Louis, Mo)를 10배씩 계단회석하여 recalcification time을 얻고 표준곡선을 구

하여 units of thromboplastin(Uthp)로 표시하였다.

#### Cell culture TNF- $\alpha$ assay

TNF- $\alpha$ 는 conditioned medium에서 TNF- $\alpha$  Elisa Kit(Genzyme사, Cambridge, MA)를 이용하여 측정하였다. Standard TNF- $\alpha$ 를 계단회석하여 standard curve로 이용하였고 Absorbance는 Bio-Rad Model 3350 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다. 시료내의 TNF- $\alpha$ 농도는 ng/ml로 표시하였다.

**통계방법 :** 통계적 처리는 ANOVA를 시행하였고, P 값이 0.05이하일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 성 적

#### Procoagulant activity(PCA) assay

단핵구활성도의 지표로 이용되는 PCA는 유육종증 환자의 PBMC와 AM는 건강대조군에 비해서 기저치(spontaneous, constitutive level)가 유의하게 높았으며( $P < 0.05$ , Table 1, Fig. 1) LPS는 건강대조군과 유육종증환자의 PBMC와 AM를 자극하여 PCA생성을 유의하게 증가시켰으나 교원질은 건강 대조군의 PBMC, AM와 유육종 환자의 PBMC는 자극할 수 있으나 AM의 PCA생성은 자극하지 못하였다(Table 1, Fig. 2).

#### Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) assay

TNF- $\alpha$ 는 PCA와 마찬가지로 건강대조군에 비하여 유육종증 환자의 PBMC, AM 모두에서 기저치가 높았으며( $P < 0.05$ , Table 2, Fig. 1) PBMC는 건강 대조군과 유육종증 환자 모두에서 collagen과 LPS에 의해서 TNF- $\alpha$ 생성이 증가되었으나 유육종증 환자의 AM는 collagen에 의해서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 증가되지 않았다(Table 2, Fig. 3).

## 고 칠

유육종과 같은 간질성 폐질환은 폐간질 내에 있는 혈관, 림프관 및 폐포벽에 미만성만성 염증성변화를 일으켜서 폐포벽간질의 비후와 섬유화로 인하여 폐기능을 상실하게 되는 질환이다<sup>7,9</sup>. 만성 미만성 염증성 폐질환이 진행중인 조직에서는 alveolar-capillary leak가 일어나고 혈장섬유원과 담백질이 폐간질과 폐포내로 유입되어 섬유소성 초자막이 형성되고 혈관의 조직에 응고반응이 증가되어 섬유소침착을 일으킨다<sup>10</sup>.

폐간질내에 축적된 섬유소는 잠정적인 세포외기질의 일부로 작용하여 여기에 염증세포와 섬유아세포가 유주해 들어오고 기질화되어 염증 및 섬유화해를 형성하여 폐조직손상 및 복원과 염증반응에 매우 중요한 역할을 한다<sup>11-15)</sup>. 유육종종의 육아종은 대식세포, T 림프구, 유상피세포로 구성되어 있는데 여기에는 tissue factor와 섬유소기질이 축적된다는 것<sup>16-18)</sup>이 알려져 있다. 기관지 폐포세척액내에는 macrophage-associated procoagulant activity가 증가되어 상해를 받은 폐조직내로 누출된 혈장섬유

소원이 섬유소로 전환되는데, 활성화된 단핵구와 폐포대식세포와 폐포상피세포가 procoagulant activity를 나타내는 것<sup>19-22)</sup>으로 알려져 있다. PCA는 extrinsic coagulation pathway의 initiator로서 주로 tissue factor(thromboplastin, factor III)이며 대식세포, 단핵구, 다핵형 백혈구, 림프구가 활성화되어 분비되며, factor VII을 활성화하여 coagulation cascade를 작동시켜서 섬유소를 형성하게 된다<sup>19,23,24)</sup>.

섬유소는 폐섬유증 조직내에 많이 침착되어 있으며<sup>25)</sup>, 유육종종과 인위적 육아종 병변에서도 많이

Table 1. Effect of LPS and collagen on expression of PCA by PBMCs and AMs from healthy individuals and sarcoidosis patients

cell	Stimuli	PCA(units of thromboplastin)	
		Healthy	Sarcoid
PBMC	Spontaneous	1±1	6±2
	LPS	67±16	274±33
	Collagen	6±3	24±12
AM	Spontaneous	3±2	62±13
	LPS	22±4	190±61
	Collagen	12±3	44±28

\* Values are mean±SD(n=10).

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

AM: alveolar macrophages

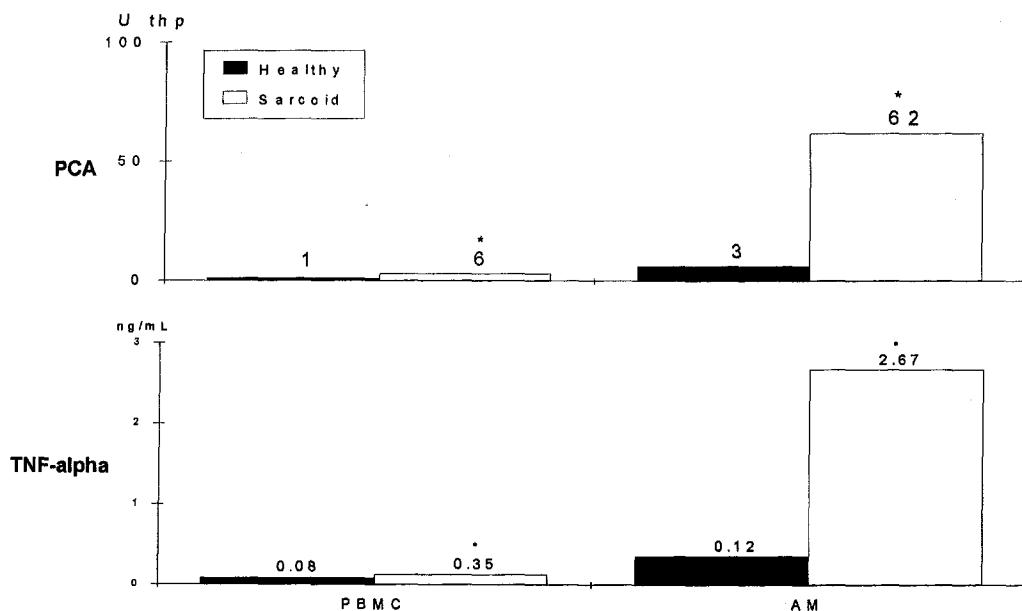


Fig. 1. Spontaneous release of PCA and TNF-alpha by PBMCs and AMs from healthy individuals and sarcoid patients. Spontaneous release of PCA and TNF-alpha by sarcoid PBMCs AMs was significantly high compared with healthy individuals(P<0.05).

축적되어 있다는 것이 밝혀졌으며<sup>16,18,26</sup>, 간질성 폐질환의 병인기전에 중요한 역할을 하는 것<sup>10</sup>으로 알려졌다.

기관지 폐포세척술을 이용한 실험에서 간질성 폐질환에서는 폐포대식세포의 용고기전이 증가되어 있고 섬유소성 용해기전은 감소되어 있다는 것<sup>10,27-29</sup>이 밝혀졌으며, 섬유소는 cross-linking 되어 염증세포, 섬유아세포, fibronectin과 같은 adhesion molecule, cytokine 등과 반응하는 “잠정적인 세포외

기질”로서의 역할을 한다<sup>5,15</sup>. 섬유소는 다른 ECM component와 함께 cell adhesion과 유주를 일으키며<sup>13,23</sup>, 대식세포를 자극하여 육아종형성과 섬유화 기전에 중요한 TNF- $\alpha$ -like cytotoxin을 분비하게 하고<sup>30</sup>, TNF- $\alpha$ 는 단핵구를 자극하여 PCA expression 을 증가시켜 섬유소침착을 증폭시킨다<sup>31</sup>.

간질성 폐질환을 일으키는 원인인자에 의해서 대식세포가 자극되면 TNF- $\alpha$ , IL-1과 같은 cytokine을 분비하고 autocrine 또는 paracrine 방식으로 염증

Table 2. Effect of LPS and collagen on expression of TNF-alpha by PBMCs and AMs from healthy individuals and sarcoidosis patients

cell	Stimuli	TNF-alpha(ng/mL)	
		Healthy	Sarcoid
PBMC	Spontaneous	0.08±0.03	0.35±0.07
	LPS	1.24±0.02	3.73±0.02
	Collagen	0.82±0.06	1.74±0.14
AM	Spontaneous	0.12±0.04	2.67±0.14
	LPS	2.25±0.09	8.81±0.13
	Collagen	0.53±0.07	2.38±0.12

\* Values are mean±SD(n=10).

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

AM: alveolar macrophages

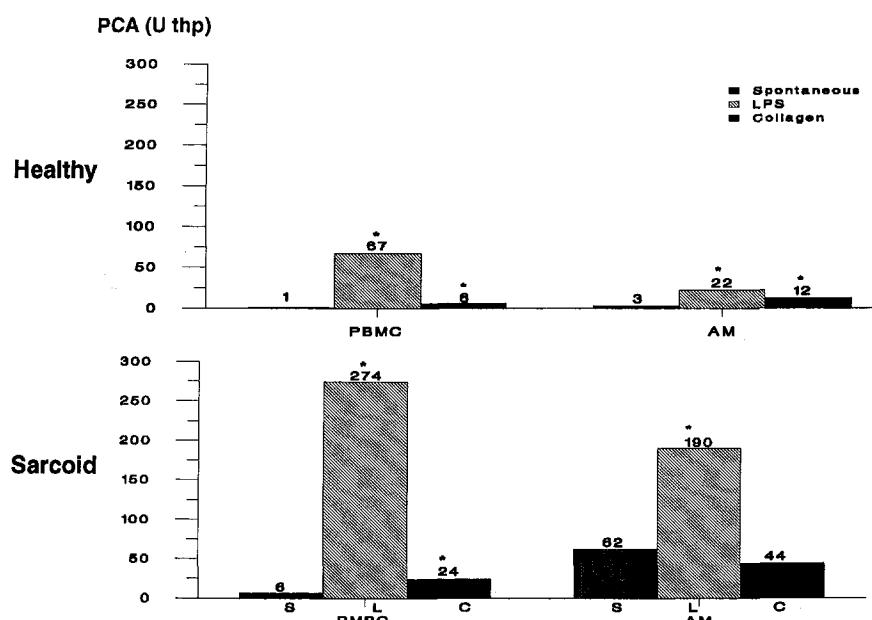


Fig. 2. Effect of collagen and LPS and expression of PCA by PBMCs and AMs from healthy individuals and sarcoidosis patients. Collagen and LPS stimulated PBMCs and AMs from healthy individuals. LPS stimulated PBMCs and AMs from sarcoid patients to produce PCA but collagen could not stimulate AMs from sarcoidosis ( $P<0.05$ ).

반응을 증폭시켜서 주위로 파급되게 한다<sup>22</sup>). TNF- $\alpha$ 는 주로 대식세포, 단핵구에서 생성되며 림프구, NK cell도 TNF- $\alpha$ 를 분비할 수 있으며 면역조절, 악액질 유발 및 proinflammatory 기능을 가지고<sup>32</sup>, 특히 강력한 육아종형성 cytokine<sup>33-35</sup>이며 여러 세포에서 PCA증기를 유도하여 섬유소형성을 증가시키며<sup>31,36,37</sup>, fibrin(ogen)과 TNF- $\alpha$ 와 같은 granulomagenic cytokine의 co-stimulatory 효과에 의해서 주위로 섬유소 침착을 파급시키고 그 부위에 inflammatory cytokine 농도를 증가시킨다<sup>31,36</sup>). TNF- $\alpha$ 는 IL-1, IFN- $\beta$ , GM-CSF와 같은 cytokine과 IL-2 receptor 생성을 증가시켜서 염증반응을 증폭 또는 조절한다<sup>37</sup>). TNF는 IL-1과 함께 인체 폐조직의 섬유아세포를 활성화시켜서<sup>38,39</sup>, fibronectin, 교원질과 같은 ECM과  $\alpha_2\beta_1$   $\alpha_5\beta_1$ 과 같은 integrin receptor와 adhesion molecule를 증가시키고<sup>40</sup> 침착된 ECM은 cell activation, proliferation, differentiation에 직접적으로 작용하여 염증조직을 복구시키거나 fibrosis로 진행하게 한다<sup>39</sup>. 교원질은 말초혈액 단핵구의 화학주성을 일으키며<sup>41</sup> 말초혈액 단핵구로부터 IL-1분비를 유발할 수 있는 것<sup>42</sup>으로 밝혀졌다.

유육종은 폐, 피부, 관절, 근골격, 신경계, 심장, 간, 림프절 등 거의 모든 장기를 침범하는 전신성 질환이기 때문에 유육종증환자의 폐포대식세포는 물론 말초혈액단핵구도 이미 primed되어 있어서 monocyte/macrophage maturation의 지표인 PCA<sup>43</sup>와 강력한 granulomagenic cytokine인 TNF- $\alpha$ <sup>33-35</sup>를 spontaneous(constitutive) release할 것으로 가정하고 강력한 단핵구자극제인 LPS에 의해서 더 자극될 수 있는지를 알아보자 이번 연구를 시행한 결과 유육종증환자의 말초혈액 단핵구와 폐포대식세포 모두 PCA, TNF- $\alpha$ 를 spontaneous release하며 교원질에 의한 자극에 대해서는 정상 건강인, 유육종증환자 두군모두에서 PBMC는 PCA, TNF- $\alpha$  분비가 증가되나 대식세포는 증가가 없는 것으로 나타났다.

Spatafora 등<sup>44</sup>은 LPS로 자극하지 않은 단핵구는 미량의 TNF를 분비하며 건강대조군과 유육종증군 사이에 차이가 없지만 LPS자극에 대해서는 활동성 유육종증 환자의 폐포대식세포는 건강대조군과 비활동성환자에 비하여 훨씬 높은 TNF를 분비한다고 발표하였으며, 이 증가는 폐내의 단핵구만 TNF를 생산하여 폐포염 생성에 관여함을 의미한다고 하

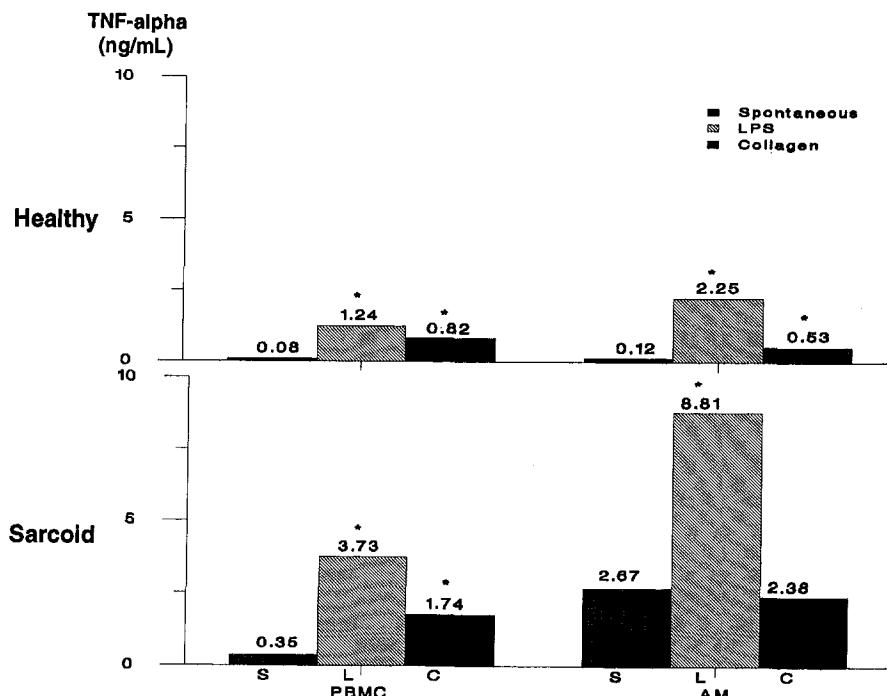


Fig. 3. Effect of collagen and LPS on expression of TNF-alpha by PBMCs and AMs from healthy individuals and sarcoidosis patients. LPS stimulated PBMCs and AMs from both healthy individuals and sarcoidosis patients but collagen did not stimulate sarcoid AMs (\* P < 0.05).

였다. Muller-Auernheim 등<sup>45)</sup>은 유육종증의 폐포대식세포는 건강대조군이나 비활동성유육종증보다 spontaneous와 LPS자극에 의한 TNF- $\alpha$  생성이 현저히 증가되나 말초혈액 단핵구에서는 spontaneous release에 차이가 없고, LPS에 의해서는 증가되지만 3군 사이에는 정도의 차이가 없는 것으로 보아 하부호흡기의 염증환경에 의해서 면역세포들이 동시 활성화되는 것이라고 하였다. Bachwich 등<sup>46)</sup>은 건강인과 유육종증환자의 폐포대식세포는 모두 자극 없이는 TNF 생산을 거의 하지 않고 LPS 자극에 의해서 증가되나 그 정도가 유육종증에서 현저히 증가되는 것으로 보아 유육종증폐포대식세포는 이미 자극되어 있고 훨씬 높은 TNF를 생산한다 하였다. 그러나 Rich 등<sup>47)</sup>은 정상인에서 폐포대식세포는 말초혈액단핵구에 비해서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 저하되어 있다고 보고하였다. 1992년 Pueringer 등<sup>48)</sup>은 유육종증환자의 폐포대식세포는 자극없이도 TNF, IL-1, prostaglandin E<sub>2</sub>를 분비하고 LPS로 자극하면 이들 cytokine 및 mediator의 생성이 훨씬 증가되었으나 질환의 활성도유무와는 무관하여 "all or none event"로 나타났다고 보고하였다.

이번 연구결과 유육종증은 전신성질환이어서 말초혈액 단핵구도 이미 자극되어 PCA, TNF- $\alpha$ 를 자극없이 분비하며 교원질이 말초단핵구를 자극하여 PCA, TNF- $\alpha$  생성을 증가시키는 것으로 보아서 간질성 폐질환의 폐조직내에 침착된 교원질은 단핵구를 활성화시켜서 염증반응을 계속 지속시킬 수 있을 것으로 생각된다. 폐포대식세포는 폐조직내의 교원질과 같은 세포외기질(ECM)에 이미 노출되어 더 이상 교원질에 의해서 자극되자 않는 것으로 생각되며 LPS와 같은 강력한 자극에 의해서는 반응이 현저한 것으로 생각된다. 단핵구자극검사방법으로 PCA와 TNF- $\alpha$ 의 반응양상이 비슷하므로 검사방법이 비교적 용이하고 비용이 저렴한 PCA가 TNF-assay를 대체시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

이 연구는 간질성 폐질환에서 폐간질내에 축적된 교원질이 섬유소형성에 중요한 PCA와 육아종 형성에 중요한 TNF- $\alpha$ 를 분비시켜서 염증반응을 지속시키는지를 알아보기로 시행한 실험으로서 정상인과 유육종증환자의 말초혈액 단핵구와 폐포대식세포를 교원질로서 자극하여 PCA와 TNF- $\alpha$ 를 측

정하였다.

PCA는 유육종증 환자의 밀초혈액 단핵구와 폐포대식세포는 건강대조군에 비하여 기저치가 유의하게 높았으며( $P<0.05$ ), LPS는 건강대조군과 유육종증 환자의 말초혈액 단핵구와 폐포대식세포를 자극하여 PCA 생성을 유의하게 증가시켰다. 교원질은 건강대조군의 말초혈액 단핵구와 폐포대식세포를 자극하여 PCA를 증가시켰으나 유육종증 환자에서는 말초혈액 단핵구는 자극할 수 있으나 폐포대식세포의 PCA생성을 자극시키지 못하였다.

TNF- $\alpha$ 는 PCA와 마찬가지로 건강대조군에 비하여 유육종증 환자의 말초혈액 단핵구, 폐포대식세포 모두에서 기저치가 높았으며( $P<0.05$ ), 말초혈액 단핵구는 건강대조군과 유육종증 환자 모두에서 교원질과 LPS에 의해서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 증가되었으나 유육종증 환자의 폐포대식세포는 교원질에 의해서 TNF- $\alpha$ 의 생성이 증가되지 않았다.

이상의 성적으로 보아 유육종증은 전신질환이어서 말초혈액 단핵구도 이미 자극되어 PCA, TNF- $\alpha$ 를 자극없이 분비할 수 있으며 교원질이 말초혈액 단핵구를 자극하여 PCA, TNF- $\alpha$ 생성을 증가시키는 것으로 보아서 간질성 폐질환의 폐조직내에 침착된 교원질은 단핵구를 활성화시켜서 염증반응을 지속시킬 수 있을 것으로 사료된다.

폐포대식세포는 폐조직내의 교원질과 같은 세포외기질에 이미 노출되어 더 이상 교원질에 의해서는 자극되지 않는 것으로 생각되며 LPS와 같은 강력한 자극에 의해서는 반응이 현저히 나타나는 것으로 생각된다.

단핵구 자극검사방법으로 PCA와 TNF- $\alpha$ 의 반응양상이 비슷하므로 검사방법이 비교적 용이하고 비용이 저렴한 PCA가 TNF- $\alpha$  assay를 대체시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- duBois RM, Holroyd KJ, Saltini C, et al: Granulomatous processes, in Crystal RG, West JB (eds): *The Lung*. New York, Raven Press, Ltd, 1991, pp 1925-1938.
- Kelly J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 765-788.
- Elias JA, Kotloff R: Mononuclear cell-fibroblast interactions in the human lung. *Chest* 1991; 99: 73S-79S.

4. Sheppard MN, Harrison NK: Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax* 1992; 47: 1064-1074.
5. Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, et al: Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 264-269.
6. Pacifici R, Basilico C, Roman J, et al: Collagen-induced release of interleukin 1 from human blood mononuclear cells. Potentiation by fibronectin binding to the a5b1 integrin. *J Clin Invest* 1992; 89: 61-67.
7. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, et al: Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med* 1981; 70: 542-568.
8. Fulmer JD: The interstitial diseases. *Chest* 1982; 82: 172-178.
9. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, et al: Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (first of two parts). *N Engl J Med* 1984; 310: 154-166.
10. Chapman HA, Allen CL, Lee Stone O: Abnormalities in pathways of alveolar fibrin turnover among patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 437-443.
11. Ciano PS, Colvin RB, Dvorak AM, et al: Macrophage migration in fibrin gel matrices. *Lab Invest* 1986; 54: 62-70.
12. Kuhn III C, Boldt J, King Jr, TE, et al: An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1693-1703.
13. Senior RM, Skogen WF, Griffin GL, et al: Effects of fibrinogen derivatives upon the inflammatory response: studies with human fibrinopeptide B. *J Clin Invest* 1986; 77: 1014-1019.
14. Roman J, Limper AH, McDonald JA: Lung extracellular matrix: physiology and pathophysiology. *Hosp Pract* 1990; November: 125-140.
15. Grinnell F, Feld M, Minter D: Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell* 1980; 19: 517-525.
16. Kalifat SR, Bouteille M, Delarue J: Changes in connective tissue in sarcoid granuloma: hyalin, paraamyloid, and fibrinoid. Electron microscopic study of 11 cases. *Virchows Arch Abt B Zellpath* 1969; 3: 348-358.
17. Kataria YP, Zafranas A, Sharma HM: Immunohistochemistry of human cutaneous sarcoidosis: a study of nine cases. *Hum Pathol* 1978; 9: 517-522.
18. Izaki S, Goldstein SM, Fukuyama K, et al: Fibrin deposition and clearance in chronic granulomatous inflammation: correlation with T-cell function and proteinase inhibitor activity in tissue. *J Invest Dermatol* 1979; 73: 561-565.
19. Edgington TS, Helin H, Susan A, et al: Cellular pathways and signals for the induction of biosynthesis of initiators of the coagulation cascade by cells of the monocyte lineage, in Ralph van Furth(ed): *Mononuclear Phagocytes*. The Hague, Martinus Nijhoff, 1985, pp 687-696.
20. Thomas J, Gross TG, Simon RH, et al: Tissue factor procoagulant expression by rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol B* 1992; 6: 397-403.
21. Lyberg T, Nakstad B, Hetland O, et al: Procoagulant (thromboplastin) activity in human bronchoalveolar lavage fluids is derived from alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1990; 3: 61-67.
22. Edwards RL, Rickles FR: Macrophage procoagulants. *Prog Hemost Thromb* 1984; 183-209.
23. Sitrin RG, Brubaker PG, Fantone JC: Tissue fibrin deposition during acute lung injury in rabbits and its relationship to local expression of procoagulant and fibrinolytic activities. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 930-936.
24. Helen H: Macrophage procoagulant factors-mediators of inflammatory and neoplastic tissue lesions. *Med Biol* 1986; 64: 167-176.
25. H. Spencer H: *Pathology of the Lung*, ed 4. Philadelphia, WB Saunders, 1985, pp 788-801.
26. Salo OP, Hannuksela M: Immunohistology of the Kveim reaction. *Ann Clin Res* 1972; 4: 169-172.
27. Hasday JD, Bachwich PR, Lynch JP, III, et al: Procoagulant and plasminogen activator activities of bronchoalveolar fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Res* 1988; 14: 261-278.
28. Callahan KS, Blumenthal DK, Fair DS: Tissue factor expression in human endothelial cells is

- regulated by calcium calmodulin, in Yasutomi Nishizuka (ed): *The Biology and Medicine of Signal Transduction*. New York, Raven Press, 1990, 24: pp 449-454.
29. Idell S, Garcia JGN, Gonzalez K, et al: Fibrinopeptide A-reactive peptides and tissue factor-factor VII procoagulant activity in bronchoalveolar lavage: Relationship to rheumatoid interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: A292.
30. Jajikawa T, Oshima H, Yamazaki M, et al: induction by heterologous fibrinogen of release of TNF-like cytotoxic factor from murine macrophages. *J Biol Response Modif* 1986; 5: 283-287.
31. Bach RR: Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1988; 23: 339-368.
32. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989; 1: 1122-1125.
33. Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, et al: The role of monokines in granuloma formation in mice: the ability of interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha to induce lung granulomas. *Clin Immunol Immunopath* 1989; 51: 419-425.
34. Shikama Y, Kobayashi K, Kasahara K, et al: Granuloma formation by artificial microparticles in vitro. Macrophages and monokines play a critical role in granuloma formation. *Am J Pathol* 1989; 134: 1189-1199.
35. Kunkel SL, Chensue SW, Strieter RM, et al: Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. *Am J Respir Cell Mol B* 1989; 1: 439-447.
36. Richard S, Kornbluth RS, Thomas S, et al: Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: induction of TNF- $\alpha$ -mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J Immunol* 1986; 8: 2585-2591.
37. Nawroth P, Handley D, Matsueda G, et al: Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth a fibrosarcomas. *J Exp Med* 1988; 168: 637-647.
38. Elias JA, Reynolds MM: Interleukin-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate lung fibroblast interleukin-1 $\alpha$  production. *Am J Respir Cell Mol B* 1990; 3: 13-20.
39. Elias JA, Freundlich B, Kern JA, et al: Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 1990; 97: 1439-1445.
40. Limper AH, Roman J: Fibronectin-versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest* 1992; 101: 1663-1673.
41. Postlewaite AE, Kang AH: Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J Exp Med* 1976; 143: 1299-1307.
42. Pacifici R, Basilico C, Roman J, et al: Collagen-induced release of interleukin 1 from human blood mononuclear cells. Potentiation by fibronectin binding to the a5b1 integrin. *J Clin Invest* 1992; 89: 61-67.
43. Rothberger H, McGee MP, Lee TK: Tissue factor activity. A marker of alveolar macrophage maturation in rabbits. Effects of granulomatous pneumonitis. *J Clin Invest* 1984; 73: 1524-1531.
44. Spatafora M, Merendino A, Chiappara G, et al: Lung compartmentalization of increased TNF releasing ability by mononuclear phagocytes in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1989; 96: 542-549.
45. Muller-Quernheim J, Pfeifer S, Mannel D, et al: Lung-restricted activation of the alveolar macrophage/monocyte system in pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 187-192.
46. Bachwich PR, Lynch III JP, Lerrick J, et al: Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. *Am J Pathol* 1986; 125: 421-425.
47. Rich EA, Panuska JR, Wallis RS, et al: Dyscoordinate expression of Tumor Necrosis Factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1010-1016.
48. Pueringer RJ, Schwartz DA, Dayton CS, et al: TNF, IL1, PGE2 release by alveolar macrophages is an all or none event independent of disease severity in sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: A231.

=Abstract=

## Collagen-induced Expression of Procoagulant Activity and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Pulmonary Sarcoidosis

Young June Jeon, MD

*Department of Internal Medicine, Keimyung University*

*School of Medicine, Taegu, Korea*

Extracellular matrix deposition and granulomatous lesions are the hallmarks of a variety of diffuse interstitial lung diseases that can lead to loss of pulmonary function. Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease which involves the lungs, lymph nodes, skin, central nervous system, liver and musculoskeletal system.

Activated macrophages and monocytes express procoagulant activity which is an initiator of extrinsic coagulation cascade for fibrin formation. And activated macrophages produce cytokines which are important for chemotaxis and differentiation of fibroblast to produce collagen and fibronectin, which in turn, stimulate monocyte/macrophage to produce interleukin-1.

To understand the role of monocyte/macrophage and collagen in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis, ten subjects with pulmonary sarcoidosis (stage II and III) were investigated by bronchoalveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells. Spontaneous release of PCA and TNF- $\alpha$  from AMs were significantly higher in patients than healthy individuals ( $p<0.05$ ). Collagen could stimulate PBMCs from sarcoidosis patients and healthy PBMCs and AMs to produce PCA and TNF- $\alpha$  but could not stimulate AMs from sarcoidosis patients. This dyscoordinate stimulation of AM/PBMC in sarcoidosis seems to be related with activation with pre-exposure to the milieu in the collagen-deposited interstitium of sarcoidosis.

This data demonstrated that in stage II and III sarcoidosis, PBMCs and AMs are actively produce cytokines and PCA, and collagen deposited in the sarcoidosis may play role in perpetuating the inflammatory process.

**Key Words:** Alveolar macrophage, Collagen, Procoagulant activity, Sarcoidosis, Tumor necrosis factor- $\alpha$