대한산업의학회지 제 15 권 제 2 호 (2003년 6월)
Korean J Occup Environ Med, 2003;15(2):181-187

흰쥐의 실험적 규폐결절에서 교차결합-46 KDa 단백질의 확인

가톨릭대학교 의과대학 자연과학교실[1], 성형외과학교실[2]

김유미[1] · 김영진[2] · 이수영[1]

— **Abstract** —

Identification of Cross-Linked 46 KDa Protein in Experimentally Induced Silicotic Nodule in Rat Lung

You Mie Kim[1], Young Jin Kim[2], Soo Young Lee[1]

Department of Natural Sciences[1], Plastic Surgery[2], College of Medicine, The Catholic University of Korea

Objectives: This study was conducted in order to understand the cellular events associated with silica-induced pathogenesis of the rat lung.

Methods: Silicosis was induced by an intratracheal instillation of 50 mg of silica ($S:O_2$, 0.15~10 μm) suspended in 500 μl of a sterile saline solution in Sprague-Dawley rats weighing 200 g. Silicotic nodules were excised from the rat lungs 4 weeks after silica instillation, then boiled for 4 days at 110℃ in solution containing 2% SDS, 10 M urea and 40 mM DTT. The insoluble cellular encapsulates were electrophoresed on 4~12% gradient SDS-PAGE, and the amino acid composition was analyzed. Affinity chromatographies of the homogenate supernatants of the control lung, silicotic nodule, and normal rat plasma were performed using rabbit anti-rat cross-linked protein from the silicotic nodule IgG. The amounts of N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine cross-link in the control lungs and silicotic nodules were determined using HPLC analysis.

Results: The remaining cross-linked protein was insoluble in the 10 M urea and 40 mM sulfhydryl reagents even under prolonged boiling conditions. The encapsulate revealed the retention of silica particles within the protein whose amino acid composition showed a high percentage of alanine, leucine and glycine. A 46 KDa protein was identified as a cross-linked protein in the silicotic nodule by affinity chromatography. The level of N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine dipeptide in the nodule digest was prominently increased compared with that in the control lung.

Conclusions: Transglutaminase (TGase)-catalyzed cross-linking appears to be involved in the silicotic nodule formation, and the 46 KDa protein may be cross-linked to itself and other extracellular matrix proteins during fibrosis and the formation of eventually insoluble nodule.

Key Words: Silicotic nodule, N^{ε}-(γ-Glutamyl) lysine dipeptide, Cross-linked protein

<접수일: 2003년 3월 6일, 채택일: 2003년 4월 22일>

교신저자: 이 수 영 (Tel: 02-590-1263) E-mail: lsyng@catholic.ac.kr

서 론

유리규산(silica) 입자들의 흡입에 의하여 생기는 간질성 폐섬유화는 간질성 폐질환의 중요한 원인이 된다(Mossman et al., 1998). 분사기종사자(sandblaster), 광부, 주물공장 및 채석장 종사자, 그리고 기타 분진에 노출되는 공장 근로자들에서 규폐증이 발생한다고 알려져 있다(American Thoratic Society, 1997). 지난 40여 년간 규폐증의 병 발생기전이 많이 연구되어 왔다. 즉 섬유화 과정 중 교원질 합성이 심히 증대되어 그 결과 교원질이 성숙되면서 다른 세포사이의 메트릭스 성분들(proteoglycan, fibronectin 및 tenascin)과 함께 침착된다(Aeschliman & Thomazy V, 2000).

석탄 광부들의 폐의 병소를 생화학적, 병리학적, 전자현미경적 및 면역학적으로 연구한 결과에 의하면, 교원질이 이들 병소의 피막에 존재하지만 이 병소의 중심부에는 기타 불용성 단백질이 존재하는 것 같다고 주장되었다(Wagner et al., 1975). 즉 사람 부검으로부터 얻은 규폐 병소를 8 M urea와 0.05% dithiothreitol로 처치하여 용해성 물질을 추출한 바 있지만, 그 일부는 교차결합(cross-linking)에 의하여 안정화된 불용성 단백질인 것 같다고 보고된 바 있다(Wagner et al., 1975).

그러나 규폐결절 내 섬유화를 일으키는 결정적인 세포성 기전은 현재까지 거의 알려져 있지 않다. 따라서 저자들은 규폐결절 형성과 관련이 있는 유리규산 입자들을 둘러싼 불용성 세포성 피막(cellular envelope)에서 트란스글루타미네이스(transglutaminase,; E.C. 2,3,2,13, TGase)에 의하여 촉매화된 isopeptide 결합 단백질의 존재 여부를 확인하기 위하여 이 연구를 행하였다.

대상 및 방법

1. 재료

CNBr 활성 Sepharose 4B, amino peptidase, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B, carboxypeptidase Y는 Sigma(St. Louis, MO) 제를, Bondapak C18 10 μM 컬럼은 Waters (Milford, MA)제를 사용하였고, N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine은 미국 NIH의 Folk 박사로 부터 제공받았다.

2. 동물실험 및 처치

규폐증 유발은 500 μl의 생리식염수에 50 mg의 유리규산(Sigma, S:O_2, 0.15~10 μm)을 부유시켜 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐들의 기도에 주입하여 일으켰다. 대조동물은 동량의 생리식염수만을 기도에 주입하였다. 유리규산 주입 후 2, 3, 4주째에 동물들을 폐사시키고 나서 폐포부터 규폐결절들을 분리하였다.

3. 연구방법

(1) 불용성 교차결합 단백질의 분리 및 분석

유리규산 주입 후 4주째 된 흰쥐들로부터 규폐결절을 분리하였다. 그리고 이들 결절에 2% SDS, 10 M urea, 40 mM DTT가 포함된 용액을 가하여 110℃에서 4일 동안 끓였다. 끓여진 용액을 멸균수로 투석한 후 4℃에서 15,000 pm으로 30분간 원심분리하였다. 침전물을 멸균수로 2회 세척하고 동결건조시켰다. PBS에 부유시킨 불용성 세포성 피막들을 4~12% 농도 기울기로 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하고나서 Coomassie-brilliant blue로 염색하였다. 아미노산 조성을 검사하기 위하여 불용성 세포성 피막들을 6 N 염산에 녹인 후 110℃에서 진공상태로 하여 가수분해시켰다. 그 후 가수분해물을 아미노산 분석기(Beckman Model 117, Fullerton, CA)로 분석하였다.

(2) 교차결합 단백질에 대한 항체의 제조 및 친화성 크로마토그래피

교차결합 단백질에 대한 항체를 토끼에서 제조하였다. 즉 앞에서 분리한 불용성 교차결합 단백질인 항원을 동량의 Freund의 complete adjuvant와 섞어서 5회 피내에 주사하였다. 3주 후 0.5 ml의 PBS와 동량의 Freund complete adjuvant 내에 부유시킨 항원 용액을 동일한 방법으로 주사하였다. 다시 3주 후 같은 방법으로 boost 주사를 하였다. 마지막 주사 후 1주째에 토끼로부터 채혈하였다. 교

Table 1. Amino acid composition of the isopeptide-linked protein isolated from silicotic nodule.

Amino acid	%	Amino acid	%
CYS	0.1	TYR	2.2
ASX*	9.2	VAL	7.8
GLX*	6.1	MET	0.6
SER	2.0	ILE	5.0
GLY	12.3	LEU	11.7
HIS	2.4	PHE	3.6
ARG	5.7	TRP	0
THR	1.9	LYS	4.0
ALA	16.0	PRO	9.7

ASX* : the sum of asparagine and aspartic acid.
GLX* : the sum of glutamine and glutamic acid.

차결합 단백질에 대한 IgG(면역글로불린)를 정제하고 나서 CNBr로 활성화된 Sepharose 4B 젤에 결합시켰다. 그리고 나서 대조군 폐의 균질액 상청액, 규폐결절 균질액의 상청액과 정상 흰쥐의 혈장을 각각 친화성 크로마토그라피하였다. 친화성 크로마토그라피에 의해 용출된 단백질은 교차결합 단백질에 대한 항체를 사용하여 Western blot을 행하였다.

(3) N^{ε}-(γglutamyl) lysine 교차결합물의 측정

1) 시료의 준비

조직 균질물의 소화는 약간의 thymol 결정의 존재하에 37℃에서 단백질 분해효소를 처리하여 순차적으로 행하였다(Flok et al., 1980). 소화시키기 위한 효소의 량과 소화 시간은 다음과 같다; 즉 18시간 동안 5 mg의 pronase(Calbiochem, San Diego, CA); 두 번째 5 mg pronase로 8시간 동안; 0.625 mg의 leucine aminopeptidase로 65시간 동안; 10 unit의 carboxypeptidase A, 10 unit의 carboxypeptidase B 및 10 unit의 carboxypeptidase Y로 24시간 동안 소화 후 마지막 소화된 양과 동일한 양의 10% trichloracetic acid(TCA)을 첨가하고 침전물을 원심분리하여 제거하였다. 상청액을 에테르로 3회 추출한 후 수용액층을 증발시켰다.

2) High-performance liquid chromatography(HPLC) 분석

동량의 OPA 시약(매일 새로 만든 2%(v/v) β mercaptoethanol을 함유하고 있는 50%(v/v) methanol 내 22.4 mM의 OPA와 0.4 M sodium carbonate)을 시료에 가하였다(Beninati et al., 1988). 역상 분리를 실온에서 행하였다. 즉 10 mM sodiume acetate(pH 5.0)로부터 10 mM sodium acetate-acetonitrill(20:80, v/v)까지의 직선 기울기(linear gradient)하에서 유속 1.0 ml/min으로 33분간 30 cm×3.9 mm μBondapak C18 10 μm 컬럼을 사용하여 HPLC를 행하였다.

결 과

1. 교차결합 단백질의 확인과 분석

불용성 단백질 피막들이 urea 내에서 심하게 끓여도 녹지 않고 남아 있는지를 검사하기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다. 그 결과 불용성 단백질 피막들은 4~12% 농도 기울기의 SDS-PAGE 상에서 이동을 하지 않았으며(Fig. 1), 이 단백질은 교차결합 단백질임을 보여주었다. 교차결합 단백질의 주요 아미노산은 alanine(16.0%), glycine(12.3%)과 leucine(11.7%) 이었다(Table 1).

2. 친화성 크로마토그래피

Isopeptide결합단백질의 분자크기를 검사하기 위하여 흰쥐의 규폐결절의 교차결합 단백질에 대한 토

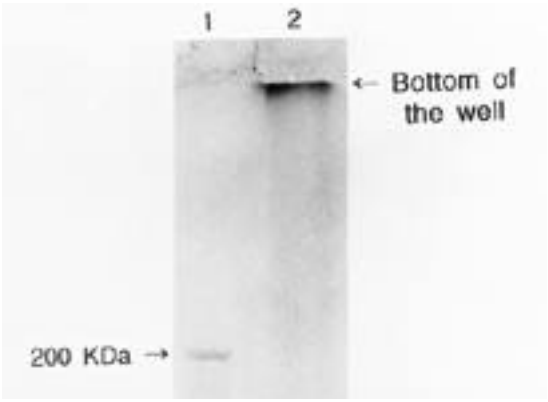

Fig. 1. SDS-PAGE of isopeptide linked protein. Mature silicotic nodules from rats raised 4 weeks after silica instillation were boiled for 4 days in Tris buffer, pH 8.5 containing 10 M urea, 2% SDS, 40 mM DTT. Isolated isopeptide linked protein was electrophoresed on 4-12% gradient SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue R. lane 1: molecular weight marker; lane 2: isopeptide linked protein.

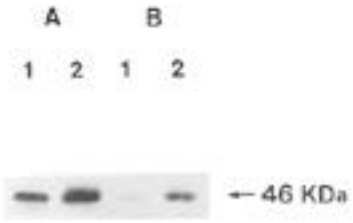

Fig. 2. Identification of isopeptide-linked protein. Rabbit anti-isopeptide -linked protein IgG was coupled to CNBr-activated Sepharose 4B gel. And then affinity chromatography was performed using supernatant of rat lung homogenates (**A**) or rat plasma (**B**). The protein isolated by affinity chromatography was electrophoresed on 4-20% gradient SDS-PAGE, and then examined by Western blot analysis using the same antibody as the affinity chromatography. lane 1: lung homogenate of control rats or plasma of normal rats was bound to rabbit anti-isopeptide-linked protein from control lungs IgG; lane 2: lung homogenate of silicotic rats or plasma of normal rats was bound to rabbit anti-isopeptide-linked protein from silicotic nodules IgG.

끼 항체를 결합시킨 CNBr-Sepharose beads를 이용하여 친화성 크로마토그래피와 Western blotting을 행하였다. 그 결과 isopeptide결합단백질이 분자량 46 KDa의 위치까지 이동하였다. 규폐결절의 46 KDa 단백질의 량은 대조군 폐의 것보다 높은 경향을 보였다(Fig. 2).

3. N^{ε}-(γglutamyl) lysine 교차결합 량의 측정

규폐결절과 대조군 폐조직 내 N^{ε}-(γglutamyl) lysine isopeptide의 양을 정량하기 위하여 HPLC를 행하였다. 그 결과 유리규산의 기도 내 주입 후 4주째의 규폐결절 내 N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide의 량이 대조군 폐의 량에 비하여 증가되었다(Fig. 3).

고 찰

이 연구결과 N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide가 규폐결절 내에서 증가되었고, 46 KDa 단백질이 규폐결절 내에서의 교차결합 단백질임이 확인되었다. 이 교차결합 단백질은 10 M urea와 40 mM sulfhydryl 존재하에 오랫동안 가열하여도 용해되지 않고 불용성으로 남아 있었다. 46 KDa 단백질이 규폐결절 내 교차결합 단백질임이 친화성 크로마토그래피에 의해 증명되었다.

규폐증의 병 발생기전은 많이 알려지고 있다. 규폐증의 초기 변화는 교원질 형성과 침착을 증가시키기 보다는 섬유소 생성을 막는데 도움을 줄 수 있는 방어기전들이다. 만약 이러한 초기 방어가 극복되면 간질성 섬유모세포 유사세포가 섬유소 생성에 중요한 역할을 할 것이다. 강한 가역반응인 섬유소 생성으로부터 섬유화까지의 단계를 조절하는 기전은 교원질의 성숙, 석회화 또는 교차결합 단백질 괴의 형성에 연관되어 있는 것 같다(Richards et al., 1991). 이 단계가 교원질과는 다른 기타의 조직 단백질들을 포함할 수 있으며, 섬유화 시 칼슘-의존성 TGase에 의한 다른 단백질들 사이의 강한 분자 내 교차결합이 형성되는 것으로 보아 이를 설명할 수 있다(Richards & Curtis, 1984).

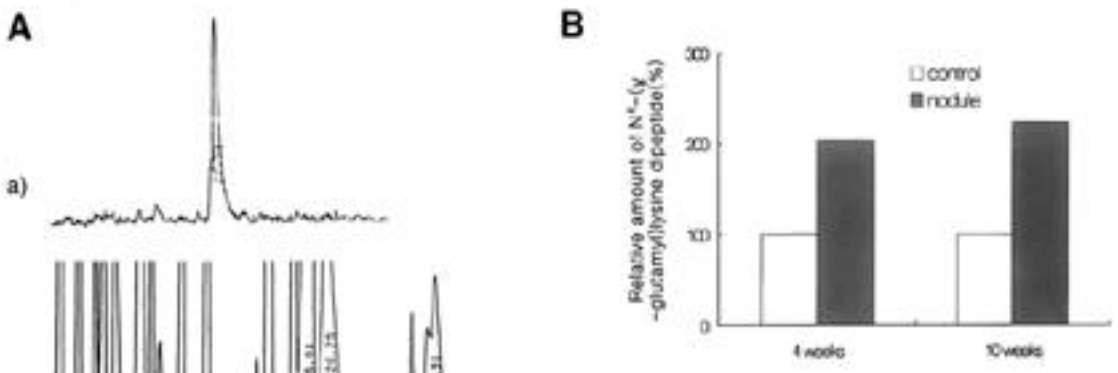

Fig. 3. (**A**) HPLC chromatograms of N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide in silicotic nodules. The samples were subjected to sequential proteolytic digestion using pronase, aminopeptidase M, carboxypeptidase A, B and Y. Analysis of N^{ε}-(γglutamyl) lysine was undertaken by reversed-phase μBondapak C18 column. A: standard (N^{ε}-(γglutamyl) lysine), B: lungs of rat 4 weeks following saline instillation, C: silicotic nodules of rat 4 weeks following silica instillation ▼: N^{ε}-(γglutamyl) lysine peak. (**B**) Amount of N^{ε}-(γglutamyl) lysine quantitated by HPLC. Control lungs or silicotic nodules 4 a and 10 weeks after saline or silica instillation were subjected to sequential proteolytic digestion and then HPLC was performed as described in Materials and Methods. Amount of N^{ε}-(γglutamyl) lysine was converted into relative value.

단백질의 교차결합들 가운데에서 N^{ε}-(γglutamyl) lysine 교차결합이 강한 단백질 가수분해에 저항성을 보인다고 잘 알려져 있다(Folk & Finlayson, 1977). 또한 TGase와 조직 섬유화 사이의 관계가 보고되었다(Griffin et al., 1979; Mirza et al., 1997; Johnson et al., 1997). 즉 일부 섬유화 부위에서 많은 량의 불용성 응집물은 교원질 이외의 다른 단백질로 이루어져 있다는 것이 또한 알려졌다. 교원질 이외의 단백질들의 일부(예, 섬유소원(fibrinogen), 섬유소(frbrin)는 TGase에 대한 기질들이다.

일반적으로 이들 교차결합들이 단백질 내에 생김으로써 변형(강직성), 기계적인 파괴(힘), 용해성 및 화학적 공격(분자 안정성)에 대한 저항성을 더욱 크게 한다(Folk & Finlayson, 1977). 그리고 폐 섬유화에 fibrin, fibronogen, fibronectin과 같은 기질 단백질의 증가와 함께 교차결합을 촉매하는 칼슘 의존효소인 TGase의 활성화가 안정한 단백질 덩어리를 형성할 수 있다고 한다(Wagner et al., 1975; Richards & Curtis, 1984; Richards et al., 1991). 따라서 유리규산 입자에 만성적으로 노출되면 조직 손상과 치유가 반복되며, 이 때 p46 및 TGase에 의한 교차결합 등을 포함하는 세포밖의 마트릭스 단백질이 축적되어 교차결합된 단백질 피막 및 불용성의 결절이 남을 수 있다.

결론적으로 본 연구는 N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide와 교차결합된 46 KDa 단백질이 규폐결절 내에 증가됨을 증명하였다. 이러한 소견들은 46 KDa 단백질이 섬유화와 그 결과 생긴 불용성 결절 형성 시에 다른 세포 밖의 메트릭스 단백질 및 그 자

체에 교차결합이 심하게 일어난다는 것을 말해주고 있다. TGase는 peptide결합 glutamyl 잔기의 carboxamide group과 여러 가지 일차 amine들 사이의 acyl transfer 반응을 통한 단백질의 번역 후 수식(post-translational modification)을 촉매하는 칼슘-의존성 효소이다(Folk & Finlayson, 1977). N^{ε}-(γglutamyl) lysine 결합을 이용한 공유결합의 교차결합은 효소학적, 화학적 및 기계적인 파괴에 대해 안정하며 저항성을 가진다(Folk & Finlayson, 1977).단백질 분해효소로 소화시킨 후 남아 있는 N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide가 대조군 폐에 비하여 결절에 증가되었다는 점은, 46 KDa 단백질이 섬유화 및 섬유화로 인한 불용성 결절 형성시에 단백질 자체 및 세포 밖 메트릭스 단백질 사이에 강하게 교차결합된 산물임을 말해주고 있다.

요 약

목적: 유리규산에 의해 유발되는 흰쥐 폐의 병 발생기전과 관련이 있는 세포들의 반응을 추구하기 위하여 이 연구를 행하였다.

방법: 500 μl의 생리식염수에 50 mg의 유리규산(SiO_2, 0.15~10 μm)을 부유시켜 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley 희쥐들의 기도내에 주입하여 규폐증을 유발시켰다. 규폐결절을 유리규산 주입 후 4주째에 흰쥐 폐에서 적출하였고, 이 결절들은 2% SDS, 10 M urea, 40 mM DTT를 함유한 용액속에서 4일 동안 110℃로 끓였다. 불용성 세포성 피막들을 4~12% 농도 기울기로 SDS-PAGE에서 전기영동하였고 또한 아미노산 조성을 분석하였다. 대조군 폐와 규폐결절의 균질액의 상청액과 정상 흰쥐의 혈장을 흰쥐의 규폐결절의 교차결합 단백질에 대한 토끼 항체를 사용하여 친화성 크로마토그라피를 행하였다. 대조군 폐와 규폐결절 내 N^{ε}-(γglutamyl) lysine 교차결합의 량은 각각 HPLC 분석법을 사용하여 정량분석하였다.

결과: 교차결합 단백질은 10 M urea와 40 mM sulfhydrgl 시약내에서 오랫동안 끓여도 불용성으로 남아있었다. 피막은 단백질 내 유리규산 입자의 잔여물로서 alanine, leucine 및 glycine의 함량이 높았다. 46 KDa 단백질은 규폐결절 내 교차결합 단백질임을 친화성 크로마토그라피 방법으로 증명하였다. 규폐결절 내 N^{ε}-(γglutamyl) lysine dipeptide의 양은 대조군 폐의 량에 비하여 현저하게 증가되었다.

결론: Transglutaminase에 의하여 촉매화된 교차결합은 규폐결절 형성에 관여하며, 46 KDa 단백질은 섬유화와 섬유화로 인한 규폐결절 형성 동안 다른 세포 밖의 마트릭스 단백질 및 그 자체 단백질 내의 교차결합물인 것 같다.

감사의 글

이 연구는 1997년 보건의료기술연구개발사업(HMP-97-M-2-0043)과 2003년 성의기초과학 연구비에 의하여 수행되었음.

참고문헌

Adams DO. Macrophages. Medthods Enzymol 1979;58:494-506.

Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. Connect Tissue Res 2000;41:1-27.

American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure(ATS statement). Am J Respir Crit Care Med 1997;155:761-5.

Anfinson CB. Principles that govern the folding of protein chain. Science 1973;181:223-30.

Beninati S, Martinet N, Folk JE. High-performance liquid chromatographic method for the determination of N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine and mono- and bis-γ-glutamyl derivatives of putrescine and spermidine. J Chromatography 1988;443:329-35.

Chung SI. Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. Ann N Y Acad Sci USA 1972;202:240-55.

Chung SI. Multiple molecular forms of transglutaminases in human and guinea pig. In: Market CL, editor. Isoenzymes: molecular structure(Vol. 1). New York: Academic Press 1975;259-74.

Chung SI, Chang SK, Cocuzzi ET, Folk JE, Kim HC, Lee SY, Martinet N, Nigra T, Sun HS. Modulation of cellular transglutaminase: Protease-induced activation. In: Zappia V, Galletti P, Porta R, Wolk F, editors. Advances

in post-translational modifications of proteins and aging. Germany: Plenum Publishing Corporation, 1988.

Clark DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsh H. The incorporation of amines into protein. Arch Biochem Biophys 1959;79:338-54.

Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS. Activation of murine macrophages by silica particles in vitro is a process independent of silica-induced cell death. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;13:547-54.

Davis GS. Pathogenesis of silicosis: current concepts and hypotheses. Lung 1986;164:139-54.

Folk JE. Transglutaminase. Ann Rev Biochem 1980;49:517-31.

Folk JE, Chung SI. Molecular and catalytic properties of transglutaminases. Advances in Enzymol 1973;38:109-91.

Folk JE, Finlayson JS. The N^{ε}-(γglutamyl) lysine cross link and the catalytic role of transglutaminases. Adv Prot Chem 1977;31:1-133.

Folk JE, Park MH, Chung SI, Schrode J, Lester EP, Cooper HL. Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. J Biol Chem 1980;255:3695-700.

Francis G, 1973. Studies on fibrous protein in pulmonary tissues. Ph.D. Thesis, University of Wales.

Goldknopf IL, Busch H. Isopeptide-linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:864-8.

Griffin M, Smith LL, Wynne J. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Brit J Exp Pathol 1979;60:653-61.

Gross AJ, Sizer IW. The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. J Biol Chem 1959;234:1611-4.

Hunninghake GW, Kalica AR. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:915-8.

Johnson TS, Griffin M, Thomas GL, Skill J, Cox A, Yang B, Nicholas B, Birckbichler PJ, Muchaneta-Kubara C, Nahas ME. The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. J Clin Invest 1997;99:2950-60.

Lee SY, Ghim GJ, Lim JW, Song YW, Kim JH. Interrelationship between transglutaminases and silicotic nodule formation in rats. Korean Biochem J 1993;26:473-8.

Lorand L, Downey J, Gotoh T, Jacobson A, Tokura S. The transpeptidase system which cross-links fibrin by N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine bonds. Biochem Biophys Res Comm 1968;31:222-30.

Lou MF. Isolation and identification of L-β-aspartyl-L-lysine and L-γ-glutamyl-L-ornithine from normal human urine. Biochemistry 1975;14:3503-8.

Matacic SS, Loewy AG. Identification of isopeptide cross-links in insoluble fibrin. Biochem Biophys Res Commu 1968;30:356-62.

Mirza A, Liu SL, Frizell E, Zhu J, Maddukure S, Martinez J, Davies P, Schwarting R, Norton P. A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. Am J Physiol 1997;272:G281-8.

Mossman BT, Chung A. Mechanism in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1666-80.

Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine. Science 1968;160:892-3.

Richards RJ, Curtis CG. Biochemical and cellular mechanisms of dust-induced lung fibrosis. Environ Health Perspect 1984;55:393-416.

Richards RJ, Masek LC, Brown RF. Biochemical and cellular mechani는 of pulmonary fibrosis. Toxicol Pathol 1991;19:526-39.

Seaton A, 1975. Silicosis in: Occupational lung deseases (W.C. Morhan and A. Seaton, Eds.), W.B. Saunders and Co. Philadelphia, p100.

Tanzer ML. Cross-linking. In: Ramanchandran GN, Reddi AH, editors. Biochemistry of Collagen. New York: Plenum, 1976:137.

Wagner JC, Wusteman FS, Edvwards JH, Hill RJ. The composition of massive lesions in coal miners. Thorax 1975;30:382-8.