

# 흰쥐를 이용한 실험적 맥락막신생혈관 모델에서 유리체강내 양막 주입의 효과

이종현<sup>1</sup> · 정재림<sup>2</sup> · 홍사민<sup>2</sup> · 고희준<sup>2</sup>

인제대학교 의과대학 일산백병원 안과학교실<sup>1</sup>, 연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발연구소<sup>2</sup>

**목적:** 흰쥐의 실험적 맥락막신생혈관 모델에서 유리체강내 양막 주입의 효과를 알아보고자 하였다.

**대상과 방법:** 레이저 조사 직후 15마리 흰쥐의 좌안에 양막(12.5 µg/mL)을, 우안에는 인산염완충식염수를 유리체강내 주입하였다. 레이저 조사 2주째에 형광안저혈관조영술 시행 후, 쥐를 희생하여 조직병리학 검사를 시행하였다. 맥락막신생혈관 성장에 관한 양막의 효과를 알아보기 위하여 두 그룹 사이의 안저혈관조영검사 및 조직병리검사 결과를 비교하였다.

**결과:** 맥락막신생혈관의 두께는 양막처리군(141.54±8.12 µm)에서 대조군(65.23±16.90 µm)에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p=0.010$ ).

**결론:** 유리체강내 양막의 주입은 흰쥐 맥락막신생혈관 모델에서 조직병리학적으로 혈관형성 촉진효과를 보여주었다. <한안지 49(7):1154-1158, 2008>

맥락막신생혈관(choroidal neovascularization)은 전세계적으로 비가역적인 시력 손실의 주된 원인 중의 하나이며, 시력 예후는 여러 가지의 치료 시도에도 불구하고 대부분의 환자에서 불량하다. 맥락막신생혈관의 병인에 관한 정확한 기전은 현재까지도 불명확하고, 임상적으로 효과적인 완치법은 아직 밝혀지지 않고 있다.<sup>1,2</sup>

맥락막신생혈관의 병인에는 병적인 혈관형성(angiogenesis)이 핵심적인 역할을 하고 있다. 여기에는 세포외기질(extracellular matrix) 재형성(remodeling)과 결합된 혈관내피세포의 증식 및 이동이 관여한다고 알려져 있다.<sup>3</sup> 양막(amniotic membrane)은 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase) 억제제를 통한 세포외기질 재형성을 억제하고, 염증을 완화시켜 창상치유를 촉진시키므로 전안부 안과 의사들에

게 널리 이용되어왔다.<sup>4-8</sup>

후안부에서의 양막의 효과에 관한 연구는 드물다. 또한 이러한 연구들에서는 양막을 동물실험모델에서 맥락막신생혈관의 생성을 촉진시키는 기저막의 한 종류로서만 활용되어왔다.<sup>9-11</sup> 하지만 양막이 유리체, 망막 및 맥락막에 대하여 어떠한 영향을 미치는가에 관한 부분은 기술되어있지 않다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐를 이용하여 레이저로 유발된 실험적 망막신생혈관모델에서 유리체강내로 주입된 양막의 효과를 규명해 보고자 하였다.

## 대상과 방법

### 1. 레이저 조사에 의한 실험적 맥락막신생혈관

본 연구에 사용된 15마리의 Sprague-Dawley 흰쥐는 연세대학교 의과대학 및 시기능 연구소에서의 동물사용에 관한 ARVO 규정(Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision research)을 준수하여 동물실험에 사용되었다. 모든 실험절차에서 흰쥐의 복강내에 ketamine hydrochloride (21 mg/kg, Ketalar<sup>®</sup>, Yuhan, Korea) 및 xylazine hydrochloride (5.25 mg/kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer Animal Health, Korea)를 주사하여 마취하였다. 동공은 0.5% cyclopentolate, 1% tropica-

<접수일 : 2007년 6월 28일, 심사통과일 : 2008년 3월 18일>

통신저자 : 고희준

서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 신촌세브란스병원 안과  
Tel: 02-2228-3570, Fax: 02-312-0541  
E-mail: hjkoh@yuhs.ac

\* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2004년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호 6-2004-1001).

mid 및 0.25% phenylephrine으로 산동하였다. 흰쥐의 망막을 확인하기 위하여 2.5% hydroxypropyl methylcellulose 용액(Methocel<sup>®</sup>, Ciba Vision, Wessling, Germany) 및 5.4 mm rat fundus laser lens (Ocular Instruments, Bellevue, WA)를 사용하였다. 810 nm 파장을 갖는 다이오드(diode) 레이저(Oculight SLx<sup>®</sup>; Iridex Co., Mountain View, CA)를 사용하여 크기 75  $\mu\text{m}$ , 강도 250 mW, 시간 50 ms의 광응고반을 시신경 주위 주요 망막혈관들 사이에 동심원의 형태로 8군데 만들었다. 브루크막의 파열여부는 맥락막에 공동화 기포(cavitation bubble)가 형성되는 것으로 확인하였다. 모든 절차는 1인의 술자(JHL)에 의해 시행되었다.<sup>12</sup>

## 2. 유리체강내 양막 주입

양막 단백질 추출액은 Shao et al<sup>7</sup>에 의해 보고된 방법으로 추출하였다. 분만 직후에 채취된 양막을 바로 액체질소 냉동고에 보존하였다. 동결 보존되었던 양막 조직을 수기적 방법으로 균질화(homogenize)한 후에 얼음 하에서 15초간 4회 초음파처리(sonicate)하였다. 이렇게 하여 얻어진 양막조직 균질화액을 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 2회 원심분리하여 상층액을 분리한 후에 0.22  $\mu\text{m}$  필터를 통과시켜 멸균시켰다. 양막 단백질 추출액의 단백질 농도는 단백 검량기(Bio-Rad, Hercules, CA)로 측정하였다.

레이저 조사 직후 양막 단백질 추출액(12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 치료군(좌안)에, 인산염완충식염수를 대조군(우안)의 유리체강 내에 주입하였다.

## 3. 형광안저혈관조영술

레이저 조사 2주 후에 공초점 스캐닝레이저 안저카메라(confocal scanning laser ophthalmoscope, HRA<sup>®</sup>, Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA)를 이용하여 형광안저혈관조영술을 시행하였다. 0.15 mL (2 mg)의 sodium fluorescein을 정맥내에 급속히 주입한 후, 초기(2분) 및 후기(10분) 영상을 촬영하였다. Koh et al<sup>12</sup>이 기술한 방법에 의하여 2인의 관찰자(JHL, HJK)가 형광안저영상을 검토하였고, 초기에 과형광 및 후기에 형광누출을 보이는 경우 맥락막신생혈관이 발생한 것으로 정의하였다. 넓은 망막하출혈에 의해 판독이 방해되는 경우는 제외하였다. 모든 영상은 이중맹검법에 의해 판독되었고, 2인 관찰자의 판독의견은 모두 일치하였다.

## 4. 조직병리학적 관찰

모든 치료군과 대조군의 안구에서 레이저 조사에 의해 유도된 맥락막신생혈관의 조직형태학적 두께를 측정하여 비교하였다. 형광안저혈관조영술 검사 후에 흰쥐를 희생하여 안구를 적출하였고 4% phosphate-buffered para-formaldehyde 용액(pH 7.4)에 고정하였다. 안구를 시신경을 중심으로 절개하여 파라핀에 포매한 후 4  $\mu\text{m}$  두께로 조직을 잘라 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 맥락막신생혈관의 두께를 측정하기 위하여, 각각의 그룹에서 5개의 안구를 무작위로 선택하였다. 맥락막신생혈관은 H&E 염색 조직절편 상, 방추형의 망막하 섬유혈관 흉터조직(fibrovascular scar tissue)으로 나타나 주변의 정상적인 조직으로부터 확연히 구분될 수 있었다. 방추형 흉터조직을 통과하는 수직경선의 최대값을 맥락막신생혈관의 두께로 정의하였다.<sup>12</sup> 각 병변의 모든 절편으로부터 측정된 두께 중에서 가장 큰 값을 선택하여 분석 및 비교하였다. 10  $\mu\text{m}$  간격으로 구분된 현미경의 접안렌즈 십자선(eyepiece reticule)을 이용한 미세측정기(micrometer, Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 두께를 환산하여 측정하였다.

## 5. 통계 처리

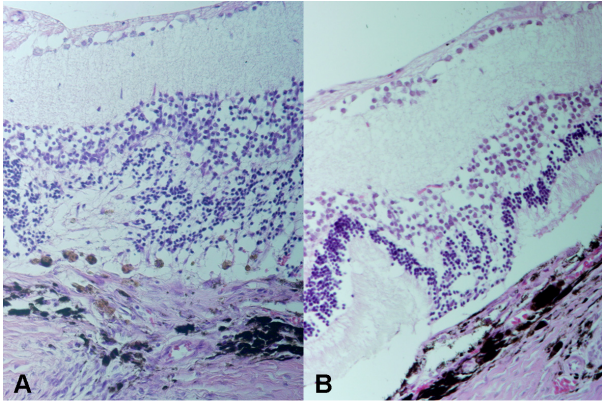
SPSS 프로그램 version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)의 Mann-Whitney U 검정을 이용하여 두 그룹간의 망막신생혈관 두께를 비교하였으며,  $P < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 해석하였다.

## 결 과

모든 흰쥐들은 전 실험을 거치는 동안 체중과 행동패턴에서 차이를 보이지 않았다. 맥락막신생혈관의 최대 두께를 비교해 보았을 때, 양막단백질추출액 주입군은 141.54 $\pm$ 8.12  $\mu\text{m}$ 였으며, 대조군은 65.23 $\pm$ 16.90  $\mu\text{m}$ 였다( $p=0.010$ ). 양막을 처리한 그룹에서 통계적으로 유의하게 맥락막신생혈관의 두께가 증가한 것을 보여 주었다(Fig. 1).

## 고 찰

안구에서의 혈관형성(angiogenesis)은 다음 2가지 시스템, 즉 VEGF (vascular endothelial growth factor)와 같이 혈관내피세포의 증식을 일으키는 혈관형성 촉진자(angiogenic stimulator)와, PEDF



**Figure 1.** Histopathologic sections in hematoxylin-eosin (H&E) staining showing choroidal neovascularization induced by laser. (A) Amniotic membrane treatment group; (B) Experimental control group (400 times magnification, high power field view, light microscope).

(pigment epithelium-derived factor)와 같이 혈관내피세포의 증식을 억제하는 혈관형성 억제자(angioinhibitor) 시스템이 서로 견제하며 동적인 평형(dynamic equilibrium)을 유지함으로써 이루어진다고 알려져 있다.<sup>13</sup>

최근 들어 양막은 양막이식술 등을 통해 각결막 상피손상을 치유하며 안구표면 재건에 중요한 지지층의 역할을 하므로 많은 각광을 받고 있다.<sup>14-17</sup> Shao et al<sup>7</sup>은 양막단백추출액이 PEDF의 발현을 통해 각막의 혈관내피세포 증식을 억제하지만 반면에 상피세포의 성장은 촉진한다고 보고하였다. 양막의 전안부 질환에서 보이는 여러가지 사이토카인의 효과에 관한 연구는 비교적 활발하지만, 후안부에서의 역할에 관한 연구는 현재까지 잘 이루어지지 않았다.

저자들이 아는 바로는, 양막은 후안부에서의 역할에 관한 동물실험모델에서 맥락막신생혈관을 촉진하는 기저막의 기능을 하는 것으로 알려져 왔다.<sup>9,10</sup> 더욱 최근에는 Alviano et al<sup>18</sup>의 혈관형성 실험모델에 의하면 양막에는 시험관 내에서 혈관내피세포로의 분화능력이 있는 다능성 중간엽 줄기세포(multipotent mesenchymal stem cells)가 풍부하다고 보고되어 있다. 그리고, 이러한 분화능력은 VEGF 유전자의 발현에 의해 더욱 촉진된다고 증명하였다. 또한 태아막(fetal membrane)에 의해 VEGF 유전자의 발현이 증가되었다는 보고도 있다.<sup>19</sup>

따라서 인체 태아막의 하나인 양막은 VEGF에 의해 혈관내피세포로 분화할 수 있는 다능성 중간엽 줄기세포가 풍부하며, 또한 VEGF 유전자의 발현은 임신주수가 증가함에 따라 태아막에 의해 동시에 증가한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는, 양막을 유리체강 내에 주입한 그룹과 대조군 간에 혈관형성의 차이를 비교해 보았다. 조직병리학적 분석결과 양막을 주입한 그룹에서 통계학적으로 유의하게 신생혈관의 두께가 증가한 것을 보여주었다. 본 결과는 양막 단백질 추출액과 추출액 내의 특정한 성분이 맥락막신생혈관의 두께를 증가시킨 혈관형성 촉진 효과(pro-angiogenic effect)를 나타내었음을 의미한다. 하지만 양막의 어떠한 성분이 혈관형성 촉진을 일으키며 이의 정확한 기전에 관하여는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

- 1) Lu M, Adamis AP. Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmol Clin North Am* 2006;19:323-34.
- 2) Sun JK, Miller JW. Medical treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 2005;45:115-32.
- 3) Rakic JM, Lambert V, Munaut C, et al. Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1732-9.
- 4) Heiligenhaus A, Li HF, Yang Y, et al. Transplantation of amniotic membrane in murine herpes stromal keratitis modulates matrix metalloproteinases in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4079-85.
- 5) Lee JH, Lee HK, Kim JK, et al. Expression of laminin-5 with amniotic membrane transplantation in excimer laser ablated rat corneas. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2192-9.
- 6) Saw VP, Minassian D, Dart J, et al. Amniotic membrane transplantation for ocular disease: a review of the first 233 cases from the UK user group. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1042-7.
- 7) Shao C, Sima J, Zhang SX, et al. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1758-62.
- 8) Takahashi H, Igarashi T, Fujimoto C, et al. Immunohistochemical observation of amniotic membrane patching on a corneal alkali burn in vivo. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:3-9.
- 9) Kiilgaard JF, Prause JU, Prause M, et al. Subretinal posterior pole injury induces selective proliferation of RPE cells in the periphery in in vivo studies in pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:355-60.
- 10) Lassota N, Kiilgaard JF, Prause JU, la Cour M. Correlation between clinical and histological features in a pig model of choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:394-8.
- 11) Lee MS, Lee KM, Kim SH, Kwon OW. Adhesion between amniotic membrane and retinal tissue and inhibition of amniotic membrane on cell transformation. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:459-71.
- 12) Koh HJ, Bessho K, Cheng L, et al. Inhibition of choroidal

- neovascularization in rats by the urokinase-derived peptide A6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:635-40.
- 13) Campochiaro PA. Ocular neovascularisation and excessive vascular permeability. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1395-402.
- 14) Kobayashi N, Kabuyama Y, Sasaki S, et al. Suppression of corneal neovascularization by culture supernatant of human amniotic cells. *Cornea* 2002;21:62-7.
- 15) Ha HS, Song KY, Kim JC. Ultrastructural Analysis of in vivo Expanded Corneal Epithelium on Amniotic Membrane. *J Korean Med Sci* 2006;21:544-9.
- 16) Kim MK, Lee JL, Wee WR, Lee JH. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after transplantation into chemical burn model. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:1731-41.
- 17) Park GS, Je J, Kim JC. Stepwise surgical approach for in vivo expansion of epithelial stem cells to treating severe acute chemical burns with total limbal deficiency. *Korean J Ophthalmol* 2003;17:75-82.
- 18) Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:11.
- 19) Cheung CY, Brace RA. Developmental expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in ovine placenta and fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:179-85.

**=ABSTRACT=**

## **Effects of Intravitreal Amniotic Membrane Injection in a Rat Model of Choroidal Neovascularization**

**Jong Hyun Lee, M.D.<sup>1</sup>, Jae Lim Chung, M.D.<sup>2</sup>, Samin Hong, M.D.<sup>2</sup>, Hyoung Jun Koh, M.D.<sup>2</sup>**

*Department of Ophthalmology, Ilsan Paik Hospital, Inje University<sup>1</sup>, Goyang-si, Korea*

*Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine, The Institute of Vision Research<sup>2</sup>, Seoul, Korea*

**Purpose:** To evaluate the effects of an intravitreal amniotic membrane (AM) injection on a rat model of laser-induced choroidal neovascularization (CNV).

**Methods:** Intravitreal injection of AM (12.5 µg/mL) into the left eyes and phosphate-buffered saline into the fellow eyes of 15 rats was performed immediately after laser injury. At week 2, after angiography, the rats were sacrificed, and histopathologic analysis was performed. Angiographic and histopathologic assessments of the effects of AM injection on CNV growth were compared between the two groups.

**Results:** CNV thickness was found to have increased more in the AM treatment group (141.54±8.12 µm) than in the experimental control group (65.23±16.90 µm) ( $p=0.010$ ).

**Conclusions:** Intravitreal AM injection demonstrated histopathologic pro-angiogenic properties in a rat model of CNV.

J Korean Ophthalmol Soc 49(7):1154-1158, 2008

**Key Words:** Amniotic membrane, Angiogenesis, Choroidal neovascularization

---

Address reprint requests to **Hyoung Jun Koh, M.D.**

Department of Ophthalmology, Severance Hospital, College of Medicine, Yonsei University

#134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: 82-2-2228-3570, Fax: 82-2-312-0541, E-mail: hjkoh@yuhs.ac