

## TGF- $\beta_2$ 및 bFGF가 망막색소상피세포 증식에 미치는 영향

윤희성 · 노세현 · 이성철\* · 정진희\*\* · 유영현\*\*

= 요약 =

Transforming growth factor- $\beta_2$ (TGF- $\beta_2$ )와 basic fibroblast growth factor(bFGF)가 돼지 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향을 연구하였다. TGF- $\beta_2$ 는 대조군에 비하여 세포 증식을 억제한 반면 bFGF는 증식시켰다. 10ng 농도의 bFGF를 배지에 첨가하여 계대배양한 세포에서는 TGF- $\beta_2$ 에 의한 증식억제효과가 사라졌다. TGF- $\beta_2$  및 bFGF-specific antisense oligonucleotide를 transfection시키니 이들 성장인자들의 autocrine 효과가 부분적으로 차단되었다. PLC- $\gamma$ 1-specific antisense oligonucleotide는 TGF- $\beta_2$  및 bFGF군 모두에서 이들 성장인자의 작용을 차단하였다. Genistein으로 처리하니 TGF- $\beta_2$  및 bFGF군 모두에서 농도와 시간에 비례하여 세포의 증식이 억제되었다. 이러한 결과는 돼지 망막상피세포에서 PLC- $\gamma$ 1 및 tyrosine kinase에 의존하여 신호가 전달됨을 시사한다(한안지 39:1192~1203, 1998).

= Abstract =

### The Effects of TGF- $\beta_2$ and bFGF on the Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cells

Hee Seong Yoon, M.D., Sae Heun Roh, M.D., Sung Chul Lee, M.D.\*,  
Jin Hee Jeong\*\*, Young Hyun Yoo, M.D.\*\*

<접수일 : 1997년 12월 19일, 심사통과일 : 1998년 2월 16일>

동아대학교 의과대학 안과학교실  
Department of Ophthalmology, Dong-A University College of Medicine

연세대학교 의과대학 안과학교실\*  
Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine\*

동아대학교 의과대학 해부학교실\*\*  
Department of Anatomy, Dong-A University College of Medicine\*\*

\* 본 내용은 1997년 10월 경주교육문화회관에서 개최된 제 47회 대한해부학회에서 포스터전시되었음.  
\* 본 연구는 1996 보건복지부 보건과학기술연구개발사업에 의하여 연구지원되었음.

This study was undertaken to document the effect of transforming growth factor- $\beta_2$ (TGF- $\beta_2$ ) and basic fibroblast growth factor(bFGF) on the proliferation of pig retinal pigment epithelial cells(RPE). Whereas bFGF increased the proliferation, TGF- $\beta_2$  showed the inhibitory effect on the proliferation. The inhibitory effect of TGF- $\beta_2$  disappeared in RPE subcultured with 10ng/ml of bFGF. Both TGF- $\beta_2$ - and bFGF-specific antisense oligonucleotides blocked the autocrine effect of the growth factors. PLC- $\gamma_1$ -specific antisense oligonucleotide inhibited the effect of TGF- $\beta_2$  and bFGF. Genistein inhibited the effect of TGF- $\beta_2$  and bFGF in dose-dependent manner. The data suggest the involvement of in PLC- $\gamma_1$  and tyrosine kinase in signalling(J Korean Ophthalmol Soc 39:1192~1203, 1998).

**Key Words** : bFGF, PLC- $\gamma_1$ , retinal pigment epithelial cell, TGF- $\beta_2$ , tyrosine kinase

조직의 섬유화는 오래된 의생물학적 주제로 많은 연구가 있었는데 최근에는 조직의 섬유화를 조절하는 인자로 성장인자(growth factor)에 관한 관심이 높다<sup>1,2</sup>. 조직의 섬유화와 관계하여 특히 관심을 끌어난 성장인자는 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )와 basic fibroblast growth factor(bFGF)이다. 이들은 생체내(in vivo) 및 생체외(in vitro) 실험을 통하여 조직의 섬유화를 유발하는 단백질인자임이 널리 받아들여지고 있다<sup>3-6</sup>.

TGF- $\beta$ 는 세포나 조직의 종류에 따라 다양한 기능을 가지고 있는 성장인자이다. 특히 창상치유와 관계하여 TGF- $\beta$ 가 직접적으로 관여하고 있다는 것은 생체내 및 생체외 실험을 통하여 잘 알려져 있다. TGF- $\beta$ 는 창상회복 과정에 관여하면서 림프모세포, 상피 또는 내피세포의 증식은 억제하지만 반대로 섬유모세포의 증식은 촉진시킨다고 알려졌다<sup>7-9</sup>. TGF- $\beta$ 는 내피세포나 근육세포의 이동은 억제하지만 단핵세포와 섬유모세포에 대하여는 주화성(chemotaxis)을 가지고 있다고 한다. 더 나아가 TGF- $\beta$ 는 세포외기질(extracellular matrix : ECM)의 주성분으로 섬유성 collagen인 type I, III, V collagen과 fibronectin의 합성을 증가시키는 반면 세포외기질을 분해하는 기능을 가진 plasminogen activator(PA)와 metalloproteinase의 합성을 감소시키고 이들 효소의 억제제인 PA inhibitor(PAI)와 tissue inhibitor of

metalloproteinase(TIMP)의 합성은 증가시킨다<sup>8-10</sup>. 따라서 TGF- $\beta$ 가 조직내에서 작용을 한다면 그 복합적 기전의 결과로 섬유성 세포외기질의 증가가 수반되는 섬유화가 초래되게 된다.

bFGF는 현재까지 알려진 fibroblast growth factor(FGF)의 9구성원들 중의 하나로 FGF-2라고도 불린다. 이 성장인자는 다양한 조직에서 존재하며 autocrine growth factor로서 heparin-binding 성장인자들 중의 하나이다<sup>11</sup>. bFGF는 스스로를 합성한 세포들의 증식과 이동에 직접 관여하며 강력한 혈관유도인자(angiogenetic factor)이고 혈관내피세포 및 각막내피세포의 증식을 증가시키고 세포형태를 섬유모세포의 형태로 변화시키는 것으로 알려져 창상치유와 관련하여 섬유화를 유도하는 중요한 인자로 생각되고 있다<sup>3,5</sup>.

TGF- $\beta$ 나 bFGF는 다른 모든 성장인자들처럼 세포막에 있는 kinase receptor에 의해서 그 신호를 세포 내로 전달한다<sup>1,6,12,13</sup>. 이 과정에서 FGF 수용체나 TGF- $\beta$  수용체는 phospholipase C- $\gamma$  1(PLC- $\gamma$ 1)을 인산화시켜 활성화시킴으로써 이 활성화된 효소에 의해 제2전령(second messenger)들인 diacylglycerol과 inositol phosphate가 만들어지며 이들 전령들에 의해 활성화된 protein kinase C는 세포내 calcium level을 증가시킴으로써 세포 증식을 유도한다<sup>14-17</sup>. Kinase receptor 중 PLC- $\gamma$ 1을 세포내 신호물질(cytoplasmic effector protein)로 이용하는 경우 genistein은

세포질에 있는 PLC- $\gamma$ 1이 세포막 수용체로 이동하는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그 결과 세포 밖에서 신호가 수용체로 전달되어도 신호전달 체계의 이상이 생겨 그 신호의 생리적 기능은 차단된다고 볼 수 있다.

Antisense oligonucleotide는 표적유전자의 발현을 특이적으로 억제하기 위하여 사용되고 있다. 표적 mRNA의 염기서열에 상보적인 oligonucleotide를 약 15개의 염기로 구성되게 제작하여 투여하면 이는 특이적인 억제기능을 보인다.

섬유성 조직의 창상치유과정에는 주변의 섬유모세포가 창상주위로 이동하고 증식하여 섬유화를 초래하지만 비섬유성조직의 섬유화는 먼저 비섬유성세포들인 상피, 내피, 또는 신경세포들이 섬유모세포로 변형되고 이들 변형된 세포들이 증식 및 활성화로 섬유화가 이루어진다. 망막의 경우 망막색소상피세포가 망막의 섬유화에 관여한다고 생각되지만 섬유화와 관련이 있는 TGF- $\beta$ 나 bFGF가 망막색소상피세포의 증식에 관여하는지 여부와 이들의 신호전달체계에 관한 연구는 부족하다.

본 연구는 섬유화에 관여하는 대표적인 성장인자인 TGF- $\beta$ 나 bFGF가 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향을 섬유모세포의 영향과 비교 연구하고 TGF- $\beta$ 와 bFGF에 대한 antisense oligonucleotide를 transfection시켜 증식효과가 억제되는지를 연구하고 이들의 신호전달에 관여하는 기전을 억제함으로써 이들의 증식효과가 억제되는가를 연구하고자 고안되었다. 신호전달은 genistein으로 억제하기도 하고 PLC- $\gamma$ 1에 대한 antisense oligonucleotide를 transfection시켜 억제하기도 하였다. 망막색소상피세포의 주된 TGF- $\beta$ 는 TGF- $\beta_2$ 이므로<sup>18)</sup> 이의 효과를 연구하였다. 아울러 상피세포를 간엽세포로 변형시키는 인자로 알려진 bFGF를 투여하여 망막색소상피세포가 변형되어 간엽세포의 특성을 보이는데도 동일한 연구내용으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물

돼지의 안구를 얻어 70% alcohol로 소독하고

penicillin-streptomycin 용액에 담구어 6시간 이내에 실험실로 운반하였다.

### 2. 세포의 배양

#### 1) 망막색소상피세포 배양

가장자리의 근육을 가위로 완전히 제거한 후 petri dish에 povidon을 묻힌 거즈를 깔고 적도부의 공막을 원주를 따라 절개하였다. 초자체를 제거하고 망막을 forceps으로 집어내었다. 컵모양의 안구 후반부에 망막편을 제거하기 위해 DMEM으로 조심스럽게 씻어내었다. 안구를 0.05% trypsin + 0.02% EDTA 용액으로 채워 37°C incubator에서 1시간 정도 두었다. 안구 내의 용액을 뽑아내어 conical tube로 옮겨 DMEM-20(with antibiotics)을 3배로 섞어 원심 분리하여 6 well 접시에 2~5개에 나누어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 하루가 지난 뒤 DMEM-10으로 바꾸어 주고 세포가 70% 단막을 이루면 분리비가 1:3이 되도록 하여 DMEM-10으로 계대배양하였다. 2-3대 세포를 실험에 사용하였다.

#### 2) bFGF의 지속적인 영향 하에 망막색소상피세포 배양

제 1대 세포를 계대배양하면서 bFGF를 10ng/ml 농도로 배양액에 첨가하여 지속적으로 bFGF의 영향 하에 배양하여 제 3대 세포를 실험에 사용하였다.

#### 3) 섬유모세포 배양

결막의 진피 만을 도려내서 잘게 잘랐다. 20% fetal calf serum이 포함된 Dulbecco's modified minimal essential medium(DMEM-20) 배양액 10ml을 100mm 세포배양 접시에 붓고 잘게 자른 조직을 넣었다. Penicillin(50U/mL)-streptomycin(50 $\mu$ g/mL)을 넣어 주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 정온기에서 배양하였다. 48시간 후 상층액을 버리고 동일한 배양액으로 갈아준 후 계속 배양하였다. 세포가 50% 단층의 막을 이루면 세포를 0.25% trypsin-5mM EDTA 용액에 노출시켜 배양접시로부터 분리하여 분리비가 1:3이 되도록 하여 계대배양을 하였다. 배양액은 FCS를

10% 포함한 동일배지(DMEM-10)에 동일량의 항생제를 넣은 것으로 하였다. 제 5-6대의 섬유모세포를 실험에 사용하였다.

### 3. TGF- $\beta_2$ 와 bFGF의 세포증식에 관한 효과

세포를 hemocytometer로 계측하여 96 well 배양접시에  $5 \times 10^4$ 개씩 넣고 DMEM-10으로 배양하였다. 세포가 약 70%의 단막을 이루었을 때 FCS를 포함하지 않은 DMEM에서 24시간 계속 배양하였다. TGF- $\beta_2$ 의 증식효과를 관찰하기 위하여 배양액을 바꾸지 않고 세가지 농도(1ng/ml, 5ng/ml 및 10ng/ml)의 porcine TGF- $\beta_2$ (R&D, MN, USA)를 세포에 첨가하여 24, 48, 72시간 더 배양한 후 세포증식을 분석하였다. bFGF의 효과는 10% FCS를 포함한 용액에 역시 세가지 농도(1ng/ml, 5ng/ml 및 10ng/ml)의 bovine bFGF(R&D, MN, USA)를 세포에 첨가하되 heparin을 10 $\mu$ g/mL 농도로 추가하였다. 역시 24, 48, 72시간 더 배양한 후 세포증식을 분석하였다. bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에 TGF- $\beta_2$ 와 bFGF가 세포증식에 미치는 영향을 연구하기 위하여는 성장인자의 농도를 10ng/ml로 고정하여 실험하였다.

### 4. TGF- $\beta_2$ 및 bFGF antisense oligonucleotide를 이용한 억제 효과

TGF- $\beta_2$  및 bFGF의 증식기능을 억제하는 기전을 연구하고자 이들에 대한 antisense oligonucleotide의 효과를 연구하였다. 사용한 antisense oligonucleotide의 서열은 다음과 같다.

TGF- $\beta_2$  antisense:

5' -CAGCACACAGTAGT-3'

bFGF antisense:

5' -TAGCTTGATGTGAGG-3'

효과를 지속시키기 위하여 phosphorothioated nucleotide를 제작하였다(Bio-Synthesis, Lewisville, TX, USA). 음성대조군으로는 각각에 대한 sense를 제작하여 사용하였다. 세포를 hemocytometer로 계측하여 96 well 배양접시에  $5 \times 10^4$ 개씩 넣고 DMEM-10으로 배양하였다. 세포가 약 70%의 단막을 이루면 opti-MEM

(Gifco, Grand Island, NY, USA)으로 세척한 후 lipofectin(Gifco, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 25 $\mu$ M antisense 혹은 sense oligonucleotide를 투여하였다. 6시간 후 DMEM-10으로 48시간 배양한 후 세포증식을 분석하였다. 성장인자 투여군에서는 증식효과에 관한 실험자료에 근거하여 증식효과가 최고로 높은 10ng/ml만을 선택하였다.

### 5. PLC- $\gamma_1$ 에 대한 antisense oligonucleotide를 이용한 억제 효과

PLC- $\gamma_1$ 은 그 구조가 크게 셋으로 나누어 지는데, 효소작용에 관여하는 X box, Y box, 수용체와 물리적 접촉을 통해 인산화를 유도하는 2개의 SH2 domain과 cytoskeleton과 접촉한다고 가정된 한 개의 SH3 domain으로 구성되어 있다. 본 실험에서는 Y box에 대한 antisense를 제작하였다. 사용한 antisense oligonucleotide의 서열은 다음과 같다.

PLC- $\gamma_1$  antisense:

5' -CGGTGTTTCTCATAGCTGAT-3'

효과를 지속시키기 위하여 phosphorothioated nucleotide를 제작하였다(Bio-Synthesis, Lewisville, TX, USA). 음성대조군으로는 sense를 제작하여 사용하였다. 실험조건은 5의 경우와 동일하였다.

### 6. Metabolic inhibitor (genistein)를 이용한 억제 기전

각각 아무런 처치를 하지 않은 대조군, TGF- $\beta_2$  또는 bFGF 단독처치군, TGF- $\beta_2$  또는 bFGF + genistein 처치군으로 나누어 실험하였다. 세포를 hemocytometer로 계측하여 96well 배양접시에  $5 \times 10^4$ 개 씩 넣고 DMEM-10으로 배양하였다. 세포가 약 70%의 단막을 이루었을 때 FCS를 포함하지 않은 DMEM에서 24시간 계속 배양한 후 genistein으로 처치하였다. Genistein 처치시 농도는 각각 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M로 달리하였다. 매일 media를 바꾸어 주면서 투여 후 24, 48, 72시간 배양한 후 세포 증식효과를 분석하였다.

### 7. 세포증식의 분석: MTT assay

배양중인 각 well에서 상층의 배지를 조심스럽게 100 $\mu$ l씩 제거하고 100 $\mu$ l 남겨둔 다음 각 well에 MTT(tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Sigma, MO, USA) 0.5mg/ml of PBS를 100 $\mu$ l씩 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 4시간 배양한 후 상층의 배지를 조심스럽게 제거하되 세포의 손실을 막기 위해 약 30 $\mu$ l정도는 남겨두었다. 각 well에 100 $\mu$ l의 DMSO를 첨가하여 약 20~30분간 plate shaker로 흔들어 준 후 EL 312e microplate reader(BIO-TEK INS., VT, USA)를 사용하여 570nm 및 650nm에서 흡광도를 측정하여 570nm에서 측정된 값에서 650nm에서 측정치를 감하였다<sup>19)</sup>.

### 8. 통계처리

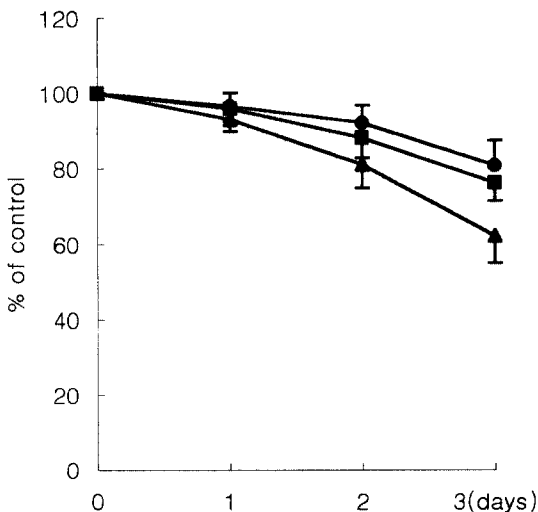
매 실험마다 3개의 well을 측정하여 2개의 자료를 취하고 이의 평균값을 1회 측정값으로 하고 이러한 측정을 각 실험군마다 분리된 3회의 실험을 실시하였다. 각 실험군의 대조군에 대한 백분율을 구하여 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다.

Microsoft Excel을 이용하여 Student's t-test를 실시하였다.

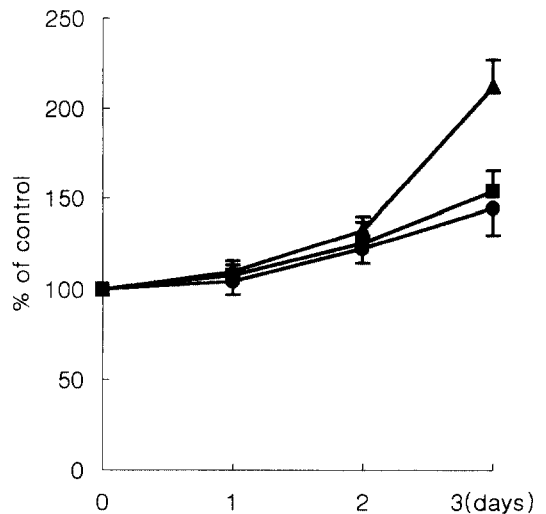
## 결 과

### 1. TGF- $\beta_2$ 가 망막색소상피세포 증식에 미치는 영향

TGF- $\beta_2$  투여군에서는 농도와 투여 기간에 비례하여 대조군에 비하여 세포증식이 억제되었다(Fig. 1). 반면 bFGF 투여군에서는 농도와 투여 기간에 비례하여 대조군에 비하여 세포증식효과가 현저하였다(Fig. 2). 그러나 bFGF 영향없이 계대배양된 망막색소상피세포에 대한 TGF- $\beta_2$ 의 성장억제효과는 bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에서는 1일과 2일째부터 사라지고(p<0.05) 3일째에는 현저히 사라져(p<0.01) 성장인자의 투여가 없이 자란 대조군 세포와 차이가 없었다(p>0.05). 반면 bFGF는 bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에 대하여도 강력한 증식효과를 보였으며 1일 부터 3일군 모두에서 bFGF 영향없이 자란 세포에 대한 영향과 유의한 차이가 없었다(p>0.05) (Fig. 3).



**Fig. 1.** The inhibitory effect of TGF $\beta_2$  on the proliferation of RPE. 1(●), 5(■) and 10(▲) ng/ml of TGF $\beta_2$ .



**Fig. 2.** The proliferative effect of bFGF on the proliferation of RPE. 1(●), 5(■) and 10(▲) ng/ml of bFGF.

## 2. TGF- $\beta_2$ 및 bFGF antisense oligonucleotide를 이용한 억제 효과

bFGF 영향없이 계대배양된 망막색소상피세포에서는 TGF- $\beta_2$  antisense 단독 transfection만으로도 TGF- $\beta_2$ 의 증식억제효과를 부분적으로 차단하였으며 ( $p < 0.01$ ) TGF- $\beta_2$  antisense를 TGF- $\beta_2$ 와 동시에 transfection 하여도 TGF- $\beta_2$ 의 증식억제효과는 부분적으로 차단되었다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에서는 TGF- $\beta_2$  antisense는 세포의 증식에 영향을 미치지 못하였다 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4). bFGF antisense transfection 효과는 계대배양시 bFGF 영향의 유무와 관계없이 유사하였는데 bFGF antisense 단독 transfection만으로도 bFGF의 증식억제효과를 현저히 차단하였으며 ( $p < 0.01$ ) bFGF antisense를 bFGF와 동시에 transfection하여도 bFGF 효과가 부분적으로 차단되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5).

## 3. PLC- $\gamma_1$ 에 대한 antisense oligonucleotide를 이용한 억제 효과

PLC- $\gamma_1$  antisense는 단독 transfection으로 세포증식을 차단하였는데 이러한 효과는 계대배양시 bFGF 영향의 유무와 관계 없었다 ( $p < 0.01$ ). 또한 bFGF와 TGF- $\beta_2$ 를 PLC- $\gamma_1$  antisense와 동시에 투여하니 bFGF의 영향 없이 계대배양된 망막색소상피세포에서는 bFGF의 효과와 ( $p < 0.01$ ) TGF- $\beta_2$ 의 효과가 ( $p < 0.05$ ) 차단되었으며 bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에서는 bFGF의 효과가 ( $p < 0.05$ ) 차단되었지만 TGF- $\beta_2$ 의 효과에는 영향을 미치지 못하였다 ( $p > 0.05$ ).

## 4. Metabolic inhibitor를 이용한 억제 기전

Genistein은 농도와 투여 기간에 비례하여 세포증식을 억제하였으며 이러한 효과는 계대배양시 bFGF의 영향과 무관하게 유사하였다 (Fig.

**Fig. 3.** The differential effects of TGF- $\beta_2$  and bFGF on the proliferation of RPE. Ctrl RP, RPE subcultured in the absence of bFGF; bFGF RP, RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF.

**Fig. 4.** The effects of TGF- $\beta_2$  antisense oligonucleotide on the proliferation of RPE. Ctrl RP, RPE subcultured in the absence of bFGF; bFGF RP, RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF; TGF- $\beta_2$ ; As, antisense; S, sense.

6A and B). TGF- $\beta_2$ 와 genistein을 동시에 투여하면 bFGF 영향없이 계대배양된 망막색소상피세포에서는 TGF- $\beta_2$ 의 증식억제효과가 차단되었으며 bFGF의 영향 하에 계대배양된 망막색소상피세포에서는 genistein 단독 투여효과와 유사한 증식감소를 보였다(Fig. 7A and B). bFGF와 genistein을 동시에 투여하면 계대배양시 bFGF의 영향과 관계없이 모든 세포에서 bFGF의 증식효과가 부분적으로 차단되는 경향을 보였다(Fig. 8A and B).

### 고 찰

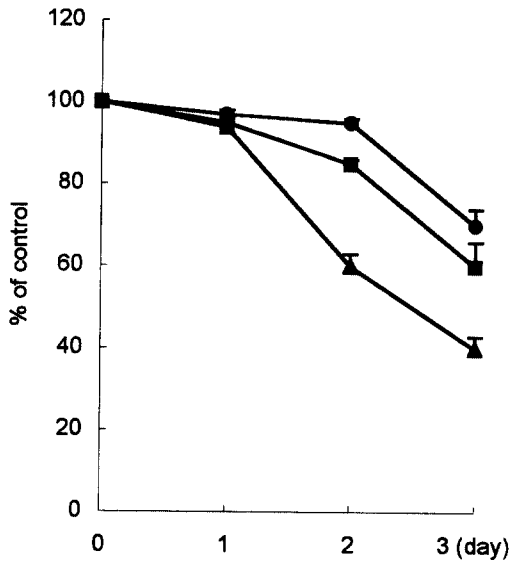
섬유화를 유도 촉진하는 인자로서는 TGF- $\beta$ , bFGF, 또는 epidermal growth factor 등의 성장인자가 알려져 있다.

TGF- $\beta$ 는 세포나 조직의 종류에 따라 많은 기능을 가지고 있는 25kDa의 단백질로서 적어도

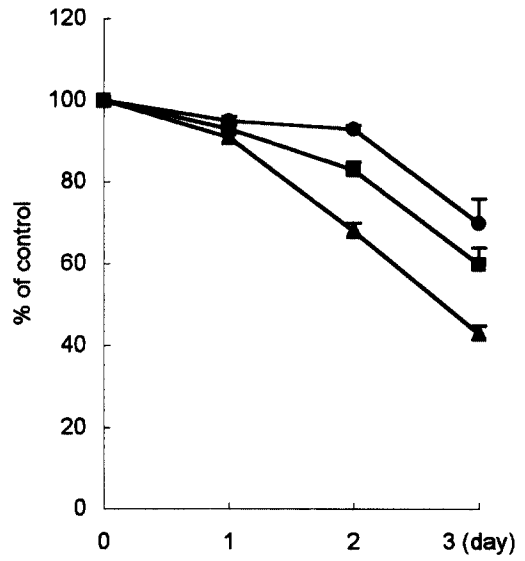
여섯가지 이상의 아형으로 존재하는 것으로 생각되는데 그중 세가지(1, and 3)가 포유류에서 발견되었다<sup>20)</sup>. TGF- $\beta$ 는 세포내에서 전구물질(precursor)로서 합성되며 세포외로 분비된 후 C-terminal domain이 분리되어 활성(mature)형태로 변화된다. 이 전구물질 형태의 TGF- $\beta$ 는 latent TGF- $\beta$ (LTGF- $\beta$ ) 또는 latency associated protein(LAP)으로 불리워지며 이것은 TGF- $\beta$  수용체(receptor)와 상호작용을 하지 못하는 불활성의 형태이다. 이 LAP 외에도, LTGF- $\beta$ 는 다른 유전자에서 합성된 latent TGF- $\beta$  binding protein(LTBP)이라는 단백질과 disulfide 결합으로 연결되어져 있다. LTGF- $\beta$ 는 여기기전(효소 및 bFGF)에 의해서 propeptide domain이 분리되어 활성화된다. TGF- $\beta_1$ 과  $\beta_2$ 는 정상섬유모세포의 주화성이동을 유도하고<sup>21)</sup> 부착비의존성(anchorage-independent) 성장을 유도하는 것으로 알려졌다<sup>22)</sup>. 또한 흰쥐나 생쥐에 피하주사를 하면

**Fig. 5.** The effect of bFGF anti-sense oligonucleotide on the proliferation of RPE. Ctrl RP, RPE subcultured in the absence of bFGF; bFGF RP, RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF; AS, antisense; S, sense.

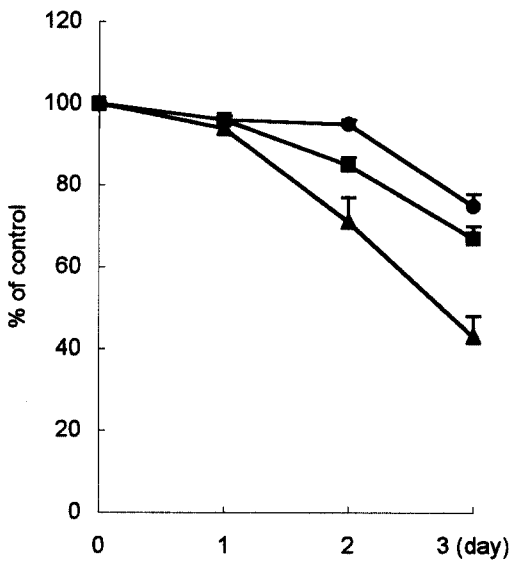
**Fig. 6.** The effects of PLC- $\gamma_1$  anti-sense oligonucleotide on the proliferation of RPE. Ctrl RP, RPE subcultured in the absence of bFGF; bFGF RP, RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF; PLC, PLC- $\gamma_1$ ; TGF, TGF- $\beta_2$ ; AS, antisense; S, sense.



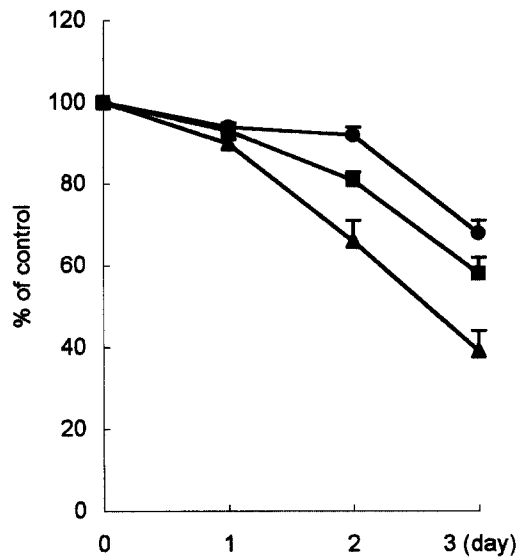
(A)



(A)



(B)

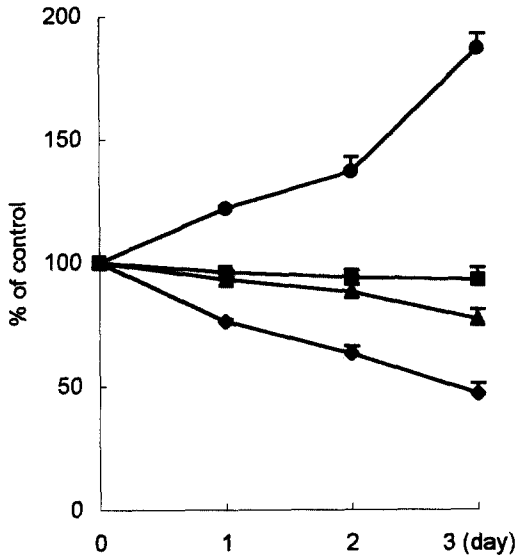


(B)

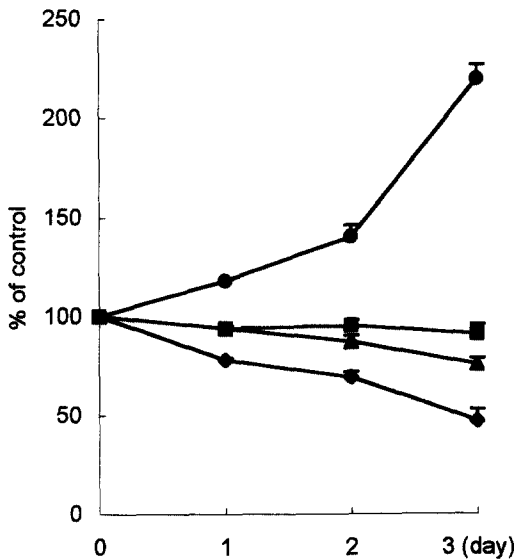
**Fig. 7.** The effect of genistein on the proliferation of RPE. The cell was treated with genistein at 10(●), 50(■) and 100(▲)μM (A) RPE subcultured in the absence of bFGF. (B) REP subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF.

**Fig. 8.** The effect of genistein on the inhibitory effect of TGFβ<sub>2</sub> on RPE. The cell was treated with genistein at 10(●), 50(■) and 100(▲) with 10ng/ml of TGF-β<sub>2</sub> (A) RPE subcultured in the absence of bFGF. (B) RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF.





(A)



(B)

Fig. 9. The effect of genistein of the proliferative effect of bFGF on RPE. The cell was treated with genistein at 0(●), 10(■) 50(▲) and 100(◆)μM with 10ng/ml of bFGF. (A) RPE subcultured in the absence of bFGF. (B) RPE subcultured in the presence of 10ng/ml of bFGF.

이들은 섬유화와 혈관신생을 자극한다고 알려졌다<sup>9, 20, 23, 24</sup>. 또 TGF-β는 세포외기질인 collagen과 fibronectin의 합성을 증가시키는 반면 세포외기질을 분해하는 기능을 가진 plasminogen activator(PA)와 효소(matrix metalloproteinase :MMP)들의 합성을 억제시키고 이들 효소의 억제인자인 TIMP의 합성은 증가시킨다. 이러한 복합적인 TGF-β의 여러 기전의 결과는 섬유성세포외기질을 증가시킴으로써 촉진된 섬유화현상이다. 왜냐하면 섬유화는 섬유성 세포외기질이 과다하게 증가한 결과로 볼 수 있기 때문에 TGF-β가 직접 또는 간접으로 관련되어 있을 것이라 추측을 할 수 있다<sup>25, 26</sup>. 현재 알려진 TGF-β중에서 TGF-β<sub>3</sub>는 창상 치유과정에서 부작용으로 일어나는 반흔형성을 억제하여 창상치유의 질(quality)을 높여 조직의 구조적 재생에 큰 역할을 하고 있음이 알려져 있다. 즉 TGF-β<sub>3</sub>는 TGF-β<sub>1</sub>과 TGF-β<sub>2</sub>의 기능을 억제한다. 그러나 반대되는 보고도 있어 아직 TGF-β<sub>3</sub>의 기능은 명확하지 않다.

bFGF 역시 많은 조직에 존재하는 성장인자로서 여러조직과 세포에서 다양한 생리기능을 가지고 있다. 특히 여러 세포외기질에 저장된 bFGF는 autocrine growth factor로써 그것을 스스로 합성한 세포들의 증식과 이동에 관여하고 있다. 현재까지 18kDa, 22kDa, 22.5kDa와 24kDa등 네 개의 bFGF isoform들이 알려져 있으며 이 네 isoform들은 모두 한 mRNA에서 만들어졌으나 세포내에서의 분포가 다른 것으로 알려져 있다<sup>27-29</sup>. 이들은 섬유모세포를 증식시킴으로써 섬유화에 관여함은 물론이고 흥미롭게도 세포외기질에 저장되어 있는 signal peptide가 결여된 18kDa인 bFGF isoform은 각막내피세포 등에서 비정상적인 창상치유의 경우에 세포의 변형에 관여하는 것으로 생각된다. 특히 사람 각막의 경우 Descemet막에 저장된 bFGF가 비정상적인 창상치유의 경우에 내피세포를 섬유모세포로 변형시켜 섬유화를 유도한다고 알려져 있다<sup>26</sup>. 즉 염증이 수반된 비정상적인 창상치유에서는 염증세포가 분비한 단백질인자에 의해서 새로운 bFGF의 합성이 유도되고 이렇게 생성된 bFGF는 무반응성 표적세포를 반응성 표적세포로 만든

다. 즉 autocrine기능을 함으로써 세포를 섬유모세포로 변형시켜 섬유성 type I collagen의 합성을 유도 및 촉진하여 궁극적으로 섬유화를 유도하는 것이다.

bFGF는 FGF 수용체를 통한 신호전달체계의 예도 세포외에 있던 FGF가 핵안으로 이동되거나 또는 FGF를 합성한 세포내에서도 어떤 isoform들은 세포외로 분비되지 않고 직접 핵안으로 이동되었다는 보고가 있다<sup>4,5</sup>. 이것은 bFGF가 세포막의 수용체를 통하여 신호를 전달하는 체계외에도 생성된 후 분비되지 않은 bFGF가 세포내에서의 이동을 통하여 직접 생리적기능을 한다는 가능성을 시사한다. 즉 신경교세포와 쥐의 말초신경에서 bFGF는 정상적으로 핵안에서 발견되어지나 중추신경계병변에서는 세포질에서 발견된다는 보고가 있다<sup>5</sup>.

TGF- $\beta$ 는 일반적으로 상피세포의 증식은 억제하고 간엽세포의 증식은 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 결막하섬유모세포는 TGF- $\beta_2$ 에 의하여 증식이 촉진되었으나 배양 중인 망막색소상피세포의 증식은 억제한다는 자료가 나왔다. 그러나 bFGF 영향 하에 계대배양을 하면 상피세포가 섬유모세포의 특성을 가진 세포로 변형될 것이라는 가정 하에 실시한 TGF- $\beta_2$  증식효과는 실험 결과는 예상과는 달리 증식에 미치는 영향이 없었다. 이러한 자료를 해석하는 것은 본 연구의 범위를 벗어나지만 본 연구진이 현재 연구진행 중인 자료에 의하면 망막색소상피세포는 bFGF에 의하여 간엽세포로 변형되지 않는 것 같다. 반면 bFGF는 결막하섬유모세포 및 망막색소상피세포 모두에 증식효과를 보였으며 bFGF 영향 하에 계대배양한 망막색소상피세포에서도 분명한 증식효과를 보여주었다. 아울러 본 실험에서는 TGF- $\beta_2$ 와 bFGF antisense oligonucleotide를 transfection시켜 이들의 autocrine function을 억제하여 보았다. 섬유모세포는 이미 TGF- $\beta$ 와 bFGF를 발현이 알려졌고 이들의 autocrine function이 antisense oligonucleotide를 transfection으로 차단된다는 연구가 있었으며 본 연구도 이와 일치하는 자료를 얻을 수 있었다. 한편 과거의 보고에 의하면 망막색소상피세포에서도 TGF- $\beta_2$ 와 bFGF

는 발현되는 것으로 알려졌지만<sup>18,30,31</sup> antisense oligonucleotide를 transfection으로 차단하여 autocrine function을 억제한 연구는 없었는데 본 실험결과는 섬유모세포에서처럼 이들의 기능이 차단된다는 결과를 얻을 수 있었다.

다른 성장인자들처럼 TGF- $\beta$ 나 bFGF도 세포막에 있는 kinase receptor에 의해서 그 신호를 세포 내로 전달한다. 현재까지 알려진 bFGF의 신호전달체계를 보면 두 개의 bFGF 수용체 (receptor)가 이합체화(dimerization)되면 수용체 자체의 tyrosine residue가 스스로 인산화 (autophosphorylation)됨으로서 수용체가 활성화된다. 이 활성화된 수용체는 곧이어 세포질내에 있는 src homology 2(SH2) domain을 구조적으로 포함하고 있는 신호전달체계에 관여하는 단백질들을 동원한다. 이 과정에서 bFGF 또는 TGF- $\beta$  수용체는 phospholipase C- $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ 1)을 인산화시켜 활성화시킴으로써 이 활성화된 효소에 의해 제2전령들인 diacylglycerol과 inositol phosphate가 만들어지며<sup>17,32</sup> 이 제2 전령들에 의해 활성화된 protein kinase C로 인하여 세포내 calcium양이 증가되고 그 결과로 세포증식을 유도한다<sup>33</sup>. 현재까지 생리적으로 활성화된 PLC- $\gamma$ 1의 세포내분포는 정확히 알려지지 않으나 세포골격(cytoskeleton)인 actin이 관여되어 있다는 보고가 있다. 즉 kinase receptor가 인산화되면 세포질내에 있던 PLC- $\gamma$ 1이 수용체와 자체 구조의 SH2 domain을 통하여 물리적 접촉을 하고 수용체에 의해 인산화가 된다. 이 활성화된 PLC- $\gamma$ 1은 세포막에 연결되어 있는 세포골격(특히 actin)과 자체구조중의 SH3 domain을 통하여 물리적 접촉을 하여 세포막에 있는 기질(substrate)를 분해하여 제2전령을 만든다고 알려졌으며 각막내피세포에서 PLC- $\gamma$ 1은 actin과 vinculin과 cytoskeleton complex를 만들며 cytochalasin B는 이 complex에서 PLC- $\gamma$ 1의 참여를 방지하는 것으로 알려지고 있다. 또한 PLC- $\gamma$ 1이 매우 안정된 단백질이며 세포질내에 다량 함유되어 있고 bFGF에 의해 활성화된 세포에서도 수용체에 물리적으로 접촉된 PLC- $\gamma$ 1의 인산화현상을 거의 발견할 수 없기 때문에 PLC- $\gamma$ 1과 수

용체의 접촉은 매우 일시적인 현상이라고 할 수 있다.

본 연구에서 망막색소세포에서 TGF- $\beta_2$ 나 bFGF의 신호전달체계를 확인하고자 PLC- $\gamma$ 1의 antisense oligonucleotides와 genistein을 이용하여 억제효과를 관찰하였다. 본 연구진은 과거 PLC- $\gamma$ 1의 antisense oligonucleotides를 이용하여 각막내피세포에서 행한 실험에서 증식을 억제한다는 결과를 얻은 바 있으며 본 실험에서도 TGF- $\beta_2$  및 bFGF가 망막색소상피세포의 증식에 미치는 영향은 PLC- $\gamma$ 1의 antisense oligonucleotide에 의하여 차단된다는 결과를 얻었으며 이는 이들 성장인자들의 신호가 PLC- $\gamma$ 1에 의하여 매개된다는 것을 의미한다. 또한 본 실험에서는 비인산화된(unphosphorylated) PLC- $\gamma$ 1이 세포증식을 촉진하는지를 실험하기 위하여, 망막색소상피에 tyrosine kinase 억제인자인 genistein을 투여하여 실험하였다. Genistein은 세포질 내에 존재하는 PLC- $\gamma$ 1을 수용체로 이전되는 것을 억제하여 PLC- $\gamma$ 1의 인산화를 억제하고 그 결과로 세포증식을 억제한다고 보고된 물질이다<sup>1,14)</sup>. 본 실험에서도 genistein은 시간과 농도에 비례하여 증식을 억제하는 효과를 보였다. 따라서 망막색소상피세포에서도 TGF- $\beta_2$  및 bFGF의 신호가 tyrosine kinase에 의하여 매개된다는 자료를 얻을 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Massague J : *The transforming growth factor- $\beta$  family*. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641, 1990.
- 2) Raghov R : *The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis*. *FASEB* 8:823-841, 1994.
- 3) Burgess WH, Maciag T : *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of protein*. *Annu Rev Biochem* 58:575-606, 1989.
- 4) Rifkin DB, Moscatelli D : *Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor*. *J Cell Biol* 109:1-6, 1989.
- 5) Mason IJ : *The ins and outs of fibroblast growth factors*. *Cell* 78:547-552, 1994.
- 6) Conner TB, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, Hayashi H, Glaser BM : *Correlation of fibrosis and transforming growth factor- $\beta$  type I levels in the eye*. *J Clin Invest* 83:1661-1666, 1989.
- 7) Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR : *Collagens in ocular tissues*. *Br J Ophthalmol* 77:515-524, 1993.
- 8) Ignatz BA, Massague J : *Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. *J Biol Chem* 261:4337-4345, 1986.
- 9) Roberts AB, Sporn M, Assoian RK, Smith JM, Rpeche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS : *Transforming growth factor type: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen function in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4167-4171, 1986.
- 10) Lawrence R, Hartmann DJ, Sonenshein GE : *Transforming growth factor- $\beta_1$  stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem* 269:9603-9609, 1994.
- 11) Rifkin DB, Moscatelli D : *Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor*. *J Cell Biol* 109:1-6, 1989.
- 12) Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA : *Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction*. *Biochem Biophys Acta* 1135:185-199, 1992.
- 13) Johnson DE, Williams LT : *Structural and functional diversity in the FGF receptor multi-gene family*. *Adv Cancer Res* 60:1-41, 1993.
- 14) Rhee SG : *Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the 1 isoform with tyrosine kinase*. *TIBS* 16:297-301, 1991.
- 15) Smith MR, Ryu SH, Suh PG, Rhee SG, Kung HF : *S-phase induction and transformation of quiescent NIH3T3 cells by microinjection of phospholipase C*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3659-3663, 1989.
- 16) Nishizuka Y : *The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulations*. *Nature* 334:661-665, 1988.
- 17) Meisenhelder J, Suh PG, Rhee DG, Hunter T

- : Phospholipase C- $\gamma$  is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57:1108-1122, 1989.
- 18) Pfeffer BA, Flanders KC, Guerin CJ, Daniel-pour D, Anderson DH : Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Exp Eye Res* 59:323-333, 1994.
  - 19) Wadhwa M, Bird C, Page L, Mire-Sluis A, Thorpe R : Quantitative biological assays for individual cytokines. In: Balkwill FR, ed. *Cytokines*, Oxford, IRL, 1995, pp. 357-391.
  - 20) Roberts AB, Sporn M : The transforming growth factor- $\beta$ s. In : Sporn MB and Roberts AB, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Heidelberg, Springer-Verlag, 1990, pp. 419-472.
  - 21) Postlethwaite AE, Koski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ . *J Exp Med* 165:251-256, 1987.
  - 22) Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB : New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from nonneoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5339-5343, 1981.
  - 23) Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- $\beta$ . *Science* 237:1333-1336, 1987.
  - 24) Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J : Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219:1329-1331, 1983.
  - 25) Lee SC, Kwon OW, Yoon YD : Effects of TGF- $\beta$  and PDGF on RPE-mediated vitreous contraction. *ARVO abstract S387*, 1996.
  - 26) Kay EP, Gu X, Ninomiya Y, Smith RE : Corneal endothelial modulation: A factor released by leukocytes induces basic fibroblast growth factor that modulates cell shape and collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:663-672, 1993.
  - 27) Hawker JR Jr, Granger HJ : Nuclear accumulation of exogenous fibroblast growth factor in endothelial, fibroblast, and myoblast cell lines results in diverse biological responses. *In vitro Cell Dev Biol* 30A:653-663, 1994.
  - 28) Li Y, Koga M, Kasayama S, Matsumoto K, Arita N, Hayakawa T, Sato B : Identification and characterization of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor in human pituitary adenoma. *J Clin End Met* 75:1436-1441, 1992.
  - 29) Quarto N, Finger FP, Rifkin DB : The NH<sub>2</sub>-terminal extension of high molecular weight basic fibroblast growth factor is a nuclear targeting signal. *J Cell Physiol* 147:311-318, 1991.
  - 30) Rakoczy PE, Humphrey MF, Cavaney DM, Chu Y, Constable IJ : Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in the retina of Royal College of Surgeons rats. A comparative study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:1845-1852, 1991.
  - 31) Ishigooka H, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM : Subcellular localization of bFGF in human retinal pigment epithelium in vitro. *Exp Eye Res* 55:203-214, 1992.
  - 32) Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Rhee SG : Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase. *Cell* 54:161-169, 1988.
  - 33) Burgess WH, Dionne CA, Kaplow J : Characterization and cDNA cloning of phospholipase C- $\gamma$ , a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 10:4770-4777, 1990.