대한안과학회지 : 제 39 권 제 8 호 1998
J Korean Ophthalmol Soc Vol. 39, No. 8

증식초자체망막병증에서 망막색소상피세포의 콜라젠합성에 관한 연구

이성철 · 권오웅 · 김순현

= 요 약 =

콜라젠은 증식성 초자체망막질환에서 섬유막을 구성하는 세포가 합성하는 세포외기질의 주성분이다. 저자들은 콜라젠합성에 대한 TGFβ의 영향을 연구하였다. 증식초자체망막병증의 섬유막을 무혈청조건에서 TGFβ를 포함하거나 포함하지 않고 19시간 동안 조직배양하였다. 조직배양 후 섬유막에 새로이 합성된 콜라젠의 양을 콜라젠분해효소를 이용한 방법으로 측정하였다. 아울러 SDS-polyacrylamide젤 전기영동으로 콜라젠을 phenotyping하였다. 콜라젠합성은 TGFβ의 농도에 따라 증가하였다. TGFβ_1과 β_2는 1ng/*ml*의 농도에서 콜라젠합성을 자극하여 콜라젠의 양이 10-30% 증가하였으며 10ng/*ml*의 농도에서는 콜라젠의 양이 90-125% 증가하였다. 세포성 섬유막은 조직배양에서 섬유성 콜라젠인 type Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ를 합성하였다. 결론적으로 TGFβ는 섬유성콜라젠의 합성을 자극하였다(한안지 39:1801~1807, 1998).

= **Abstract** =

Collagen Synthesis by RPE Cells Associated with Proliferative Vitreoretinopathy

Sung Chul Lee, M.D., Oh Woong Kwon, M.D., Soon Hyun Kim, M.D.

Collagen, which is newly synthesized by the cellular component, is the major component of extracellular matrix in PVR membranes. The effects of transforming growth factor(TGF)-β on the synthesis of collagen were evaluated. Tissue culture of PVR membrane was incubated for 19 hours with or

< 접수일 : 1998년 3월 16일, 심사통과일 : 1998년 5월 21일 >

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능개발 연구소
Institute of Vision Research and Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

* 이 연구는 1996년 연세대학교 의과대학 교수연구비 지원에 의해 이루어짐.

without TGF-β in the absence of serum. Newly synthesized collagen in the membrane were measured by a collagenase-digestion assay. The biosynthetically labeled collagens were analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Collagen synthesis was dose-dependently stimulated by TGFβ. At a concentration of 1ng/ml of TGFβ_1 or TGFβ_2, a 10-30% increase in collagen synthesis was seen over that of controls. TGFβ_1 or TGFβ_2, at a concentration of 10ng/*ml*, induced a 90-125% increase in collagen synthesis over that of controls. PVR membranes in culture synthesized predominantly type Ⅰ, Ⅲ and Ⅴ collagen. In conclusion TGFβ are potent stimulants of collagen(J Korean Ophthalmol Soc 39:1801~1807, 1998).

Key Words : Collagen, Proliferative vitreoretinopathy, Retinal pigment epithelium, TGFβ

안조직 특히 초자체와 망막의 섬유화(fibrosis)는 투명성이 요구되는 안조직의 특성 때문에 실명의 직접적인 원인이 된다. 증식초자체망막병증은 초자체와 망막의 섬유화를 뜻하며 형성된 섬유조직이 기능회복은 물론 구조적인 회복마저도 어렵게 만든다. 실명예방이란 측면에서 증식초자체망막병증의 발생과정을 이해하는 것이 중요하나 밝혀진 부분은 매우 작으며 안구내에서 발생한 과도한 상처치유기전으로 생각할 뿐이다[1].

TGFβ는 섬유아세포의 증식을 촉진시키며 세포외기질(extracellular matrix : ECM)인 콜라젠과 fibronectin의 합성을 증가시키는 반면 세포외기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinase(MMP)의 합성을 억제시키고 이들 MMP의 억제효소인 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)의 합성을 증가시켜 결과적으로 세포외기질을 증가시킴으로서 섬유화를 자극하고 창상치유(wound healing)를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[2]. 눈에서는 방수를 생성하는 모양체 상피세포에서 TGFβ가 생산되어 각막의 창상치유에 관계하는 것으로 보고되어 있으며[3,4] 망막색소상피세포도 TGFβ를 생산하는 것으로 알려져 있다[5]. 증식초자체망막병증은 망막색소상피세포의 증식에서 비롯된 과도한 섬유화의 결과이기 때문에 TGFβ가 직접 또는 간접으로 관련되어 있을 것이란 추측을 할 수 있다. 실지로 증식초자체망막병증 눈의 초자체에서 측정한 TGFβ의 농도는 정상눈보다 3배 정도 증가되어 있다[6]. 또한 황반부열공의 수술적 치료에 TGFβ를 사용하여 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있으며[7,8] 이것은 TGFβ가 국소적으로 섬유조직형성을 촉진하여 망막과 맥락막의 유착을 강하게 하였기 때문으로 생각할 수 있다.

저자의 연구에서 TGFβ는 망막색소상피세포의 증식을 억제하여 증식초자체망막병증의 발생과는 다소 상반된 결과를 보였으나 망막색소상피세포에 의한 젤 수축을 뚜렷하게 증가시키고 초자체젤을 수축하여 견인선을 형성하고 있음을 관찰하였다. 이것은 망막색소상피세포가 일정수 이상 초자체강으로 유리된다면 증식초자체망막병증의 발생에 세포수가 절대적으로 중요하지 않음을 암시하는 것으로 생각할 수 있으며 증식초자체망막병증은 형성된 섬유막의 수축이 크게 관여할 것이란 추측을 할 수 있다. 증식초자체망막병증에서 망막표면과 후초자체막을 따라 섬유막이 일단 형성되면 섬유조직이 초자체와 망막을 강한 고리로 연결하여 초자체가 망막견인의 근거를 제공한다 할 수 있으며 견인망막박리는 섬유조직과 초자체의 수축에서 시작되는 것으로 생각할 수 있다. 그러므로 TGFβ가 초자체 젤의 수축을 촉진시킬 수 있는 것은 TGFβ에 의하여 망막색소상피세포가 새로운 형태의 섬유성 콜라젠의 합성을 촉진하기 때문이며 망막색소상피세포는 자신이 합성한 콜라젠섬유를 잡아당기기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구는 망막색소상피세포에 의해 새로이 합성한 콜라젠의 형태를 조사하고 TGFβ의 영향하

에 콜라젠의 세포외기질로의 침착에 대한 효과를 측정함으로서 TGFβ에 의해 망막의 섬유화가 유도되는가를 규명하여 증식초자체망막병증 발생의 중요과정을 설명하고 그 예방법을 찾고자 한다.

재료 및 방법

증식초자체망막병증의 섬유막을 만들기 위하여 토끼눈의 초자체에 5×10^5개/0.1㎖의 동종의 배양된 망막색소상피세포를 주입하였다. 세포주입 약 2주 후 망막표면과 초자체에 섬유조직이 형성되면 해부현미경하에서 섬유조직을 분리한 후 조직배양을 하였다. 이들로부터 콜라젠을 분리하여 콜라젠구조와 특성을 밝히고 TGFβ가 콜라젠합성에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 실험은 아래와 같이 진행하였다.

1. 망막색소상피세포의 배양

망막색소상피세포의 수집은 Edwards[9]의 방법을 응용하여 다음 순서로 진행하였다. 토끼를 사망시킨 직후 안구를 적출하고 안구주위조직을 제거한 후 젖은 거즈로 감고 4℃ 냉장고에서 8시간 동안 보관하여 망막의 감각층이 망막색소상피세포부터 자연 박리되도록 하였다. 적도부의 공막을 원주를 따라 절개하고 초자체와 망막을 제거하여 망막색소상피세포가 노출된 컵 모양의 안구후반부를 만들었다. 노출된 망막색소상피세포 위에 남아있는 망막편을 제거하기 위하여 Dulbecco's modified Eagle's medium(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 조심스럽게 씻어내었다. 망막색소상피세포를 부루크막으로부터 분리시키기 위하여 37℃에서 30분간 0.5% trypsin에 처리한 후 망막색소상피세포의 분리가 끝날 때까지 위의 과정을 3, 4차례 되풀이하였다. 수집된 망막색소상피세포는 곧 혈청이 포함된 DMEM 배양액을 추가하여 원심분리하였다.

DMEM 배양액으로 $1\sim10\times10^4$/㎖ 농도의 세포현탁액을 만든 후 24well 배양접시에 접종하고 37℃, 5% CO_2 정온기에서 세포배양을 하였다. 계대배양은 배양접시가 망막색소상피세포로 채워졌을 때 0.1% trypsin에 노출시켜 망막색소상피세포를 배양접시로부터 분리하여 분리비가 1:3 또는 1:5가 되도록 하였으며 2차 계대배양세포를 사용하였다.

2. 초자체의 섬유화(증식초자체망막병증의 유발)

마취 1시간 전에 1% tropicamide(상품명 Mydrin-P, Santen, Osaka, Japan)와 1% cyclopentolate hydrochloride(상품명 Cyclogyl, Bausch & Lomb, Tempa FL, U.S.A.)를 점안하여 동공을 충분히 산대시키고 pentobarbital sodium(상품명 Entobar, 한림제약, 서울) 20㎎/㎏를 이개 정맥주사하고 보조적으로 ketamine hydrochloride(상품명 케타라, 유한양행, 서울) 20㎎/㎏을 근육주사하여 마취하였다. 안구를 고정하기 위하여 하직근에 고정봉합을 하였고 각공막윤부에서 상이측으로 3㎜ 후방에 결막을 절개한 후 공막에 5-0 dacron으로 봉합자리를 마련한 후 sulfur hexafluoride(SF_6) 가스 0.2cc를 26게이지 주사침으로 초자체강내로 주입하였다. 안구마사지 후 안압이 5㎜Hg 이하로 떨어지면 같은 방법으로 SF_6 0.2cc를 추가로 주입하고 봉합하였다. 일주일 후 초자체강내의 젤이 가스에 의해 압축되고 후초자체박리가 발생하고 젤이 액화된 것으로 판단되었을 때 다시 토끼를 마취하고 가스 주입시 사용하였던 봉합실을 풀고 토끼의 안구보다 1m 높은 곳에 위치한 balanced salt solution(BSS)액에 26게이지 주사침을 연결하고 초자체강에 삽입하여 중력에 의해 BSS액이 초자체강으로 들어가게 하여 밀려나온 가스가 주사침 주위로 빠져나오도록 한 후 주사침이 들어간 자리를 봉합하였다. 초자체강내 망막색소상피세포의 주입은 튜버큘린 주사기에 26게이지 주사침을 연결하고 초자체강에 삽입하여 망막에 손상이 가지 않도록 천천히 수술현미경하에서 망막의 유수신경섬유(medullary ray) 위에 주입하고 토끼가 마취에서 깰 때까지 주입한 세포가 혈관이 풍부한 망막유두부 주위에 가라앉도록 안구의 위치를 조정하였다. 초자체강에 주입한 세포의 양은 0.1㎖ DMEM 배양액에 계대배양한 망막색소상피세포 5×10^5 이 되도록 하였다.

3. 조직배양에서의 collagen 합성

위의 실험에서 증식초자체망막병증이 발생한 토끼를 사망시킨 후 안구를 적출하였다. 적도부에서 안구를 절개하고 해부현미경하에서 초자체와 망막표면에 생성된 섬유조직을 절제하였다. 섬유조직구성세포의 콜라겐합성을 방사성표지방법을 이용하여 분석하였다. 채취한 조직을 50㎍/㎖ ascorbic acid, 50㎍/㎖ B-APN, 4% FCS을 포함하고 있는 DMEM 배양액 속에 100㎌ ^{3}H-proline을 넣고 19시간 동안 배양을 계속하였다. 동질화기에 1.0N NaCl, 0.05M Tris, 0.1% Triton-X-100 500㎕와 조직을 넣고 얼음 속에서 10회 정도 움직여 조직을 분쇄하였다. 분쇄조직현탁액을 10,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 침전물을 보관하고 상층액중 200㎕는 pepsin (100㎍/㎖)으로 4℃에서 17시간 처리한 후 pepsin은 4N NaOH로 PH를 올려 효소활동을 멈추게 하였다. 각 시료중 1㎕ 또는 2㎕씩 β계수기에서 방사능을 측정하여 같은 cpm의 시료를 SDS-polyacrylamide젤 전기영동법(PAGE)으로 전기영동하여 콜라겐형에 따라 분리하였다.

4. Polyacrylamide젤 전기영동

1% agarose + 0.1% SDS 용액으로 두장의 유리판 사이 가장자리를 봉합하였다. 6% acrylamide젤을 유리판 사이에 붓고 젤이 굳으면 stacking젤을 부었다. 시료는 100℃에서 5분간 가열하여 단백질을 변성시키었다. 젤이 굳으면서 만들어진 홈에 시료를 가하였다. 전기영동기구를 전원에 연결하였다. 전기영동된 젤을 dimethyl sulfoxide(DMSO), PPO로 처리한 후 x-ray 필름에 노출시키고 일정한 시간 후 필름을 현상하였다.

5. TGFβ에 의한 콜라겐합성의 양적 변화

콜라겐합성에 대한 TGFβ의 효과는 (^{3}H)proline을 이용한 생합성방법으로 측정하였다. 망막색소상피세포를 초자체강에 주입하여 증식초자체망막병증을 발생시키고 섬유조직을 채취한 후 '3'에 서술된 방법으로 조직배양을 진행하였다. TGFβ의 콜라겐합성에 대한 효과는 bacterial collagenase를 이용하여 시료를 분석하였다. 5mM $CaCl_2$, 1mM N-ethylmaleimide (NEM)을 포함한 buffer I에 준비된 bacterial collagenase로 37℃에서 90분간 시료를 효소분해한 후 분해되지 않은 콜라겐을 제외한 단백질을 TCA로 침전시켰다. 효소에 의해 파괴된 soluble fraction의 계수와 침전된 non-collagen의 계수를 이용하여 TGFβ의 전체 콜라겐합성에 대한 효과를 양적으로 비교하였다.

결 과

초자체강내 섬유화는 유수신경섬유 위에 망막색소상피세포 5×10^{5}개를 주입하여 세포증식과 세포외기질 생성을 유도함으로서 얻을 수 있었다. 망막색소상피세포 주입 1주일 후에는 망막전막이 형성되었고 2주 후에는 망막 또는 망막전막의 융기가 관찰되었다(Fig. 1). 적도부를 절개하고 해부현미경하에서 섬유조직을 절제하였다. 콜라겐 생성에 대한 TGFβ의 영향을 알기 위하여 섬유조직을 배양하고 합성한 콜라겐의 양을 TGFβ가 처리되지 않은 대조군에 대하여 TGFβ 각각을 처리한 실험군을 비교하였다. TGFβ는 0.1ng/㎖의 농도에서도 콜라겐의 생성을 자극하여 대조군의 110-130%까지 양적인 증가가 있었으며 1ng/㎖에서는 섬유조직에 대조군의 190-225%까지 증가

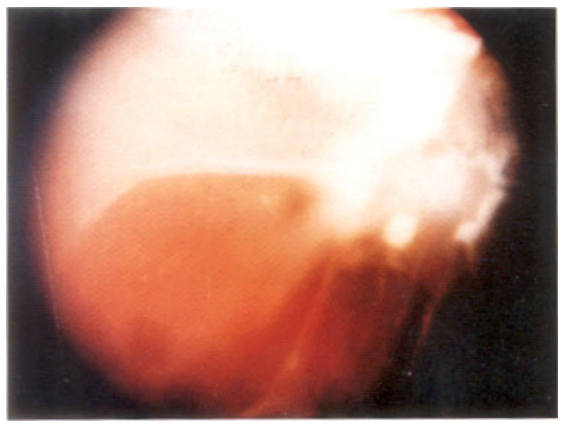

Fig. 1. Fundus photograph shows epiretinal fibrous tissue with elevation of retina.

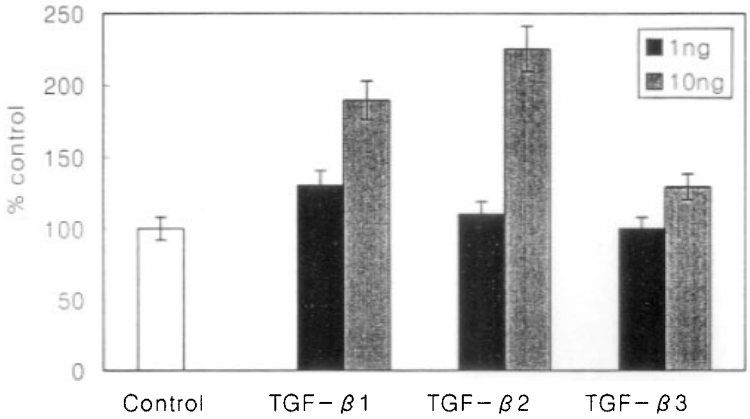

Fig. 2. Effect of TGFβ on collagen synthesis by PVR membrane. Fibrous membrane were incubated with TGFβ in the medium for 19 hours with ^{3}H-proline, ascorbic acid and β-aminopropionitrile. Radiolabelled collagens in the membrane were assessed by collagenase digesition. Each data point represents mean±SEM of data from three different experiments, each done in triplicate.

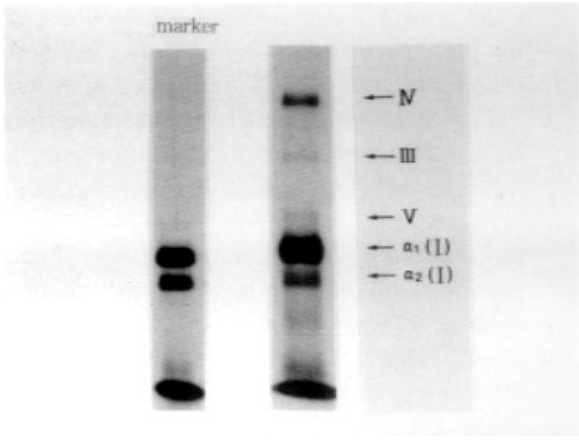

Fig. 3. Collagen phenotypes synthesized by PVR membrane in culture. Cells on Day 7 were labeled with ^{3}H-proline for 17 hours. The medium fraction was treated with pepsin prior to electrophoresis on 4.5% SDS-PAGE under non reduced conditions.

된 콜라젠을 가지고 있었다(Fig. 2). 그러나 전체단백질에 대한 %콜라젠은 9-30% 사이에서 통계학적으로 의의없는 분포를 보여 TGFβ가 콜라젠의 생성을 특이하게 자극하였다기보다 전체 단백질의 합성을 자극하였다. 증식초자체망막증을 유발시킨 망막색소상피가 합성하는 콜라젠을 질적으로 측정한 결과는 type Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ가 합성되고 type Ⅳ콜라젠도 합성되어지는 것을 보여준다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 TGFβ가 섬유성 막에서 콜라젠합성을 질적으로 변화시키는지가 조사되었으나 콜라젠의 type에는 변화가 없었다.

고 찰

망막색소상피의 외층인 Bruch막은 type Ⅳ 콜라젠으로 구성되어 있으며 내층인 초자체에서는 type Ⅱ와 type IX 콜라젠이 발견된다. 정상구조에서는 이들 콜라젠과 망막색소상피의 관련성을 생각할 수 있으나 증식초자체망막병증의 섬유막에서 망막색소상피세포가 어떠한 활동성을 가지는지 알 수 없다. 망막색소상피세포가 증식초자체망막병증의 주요세포라는 사실은 밝혀져 있으며[10] 콜라젠 생성에도 망막색소상피세포가 주된 역할을 할 것은 확실하다. 저자의 실험결과에서 망막색소상피세포가 type Ⅰ, Ⅲ 그리고 Ⅴ의 콜라젠을 합성하는 것으로 밝혀졌으며 이들이 섬유성 콜라젠이란 것을 고려할 때 세포섬유막의 수축에도 관계할 것으로 생각된다.

조직의 섬유화를 유발하는 인자들로는 여러 성장인자가 알려져 있으며 그 중에서도 TGFβ는 생체내 및 생체외실험을 통하여 안조직의 섬유화를 유발하는 단백질인자로 알려져 있다. TGFβ는 세포나 조직의 종류에 따라 많은 기능을 가지고 있으며 25kDa의 단백질로서 현재까지 다섯가지가 (β_1-β_5) 발견되어 있다[11,12]. TGFβ는 상피 또는 내피세포의 증식을 억제하나 반대로 섬유아세포의 증식은 촉진시킨다. TGFβ는 단핵세포와 섬유아세포에 대하여 주화성을 가지고 있으나 내피세포나 근육세포의 이동은 억제한다. TGFβ는 세포외

기질인 콜라젠과 fibronectin의 합성을 증가시키는 반면 세포외기질을 분해하는 기능을 가진 plasminogen activator(PA)와 metalloproteinase의 합성을 감소시키고 이들 효소의 억제자인 PA inhibitor와 tissue inhibitor of metalloproteinase의 합성은 증가시킨다. 이러한 TGF β의 복합적 기전의 결과는 섬유성 세포외기질을 증가시킴으로서 섬유화가 촉진되는 것이다[13].

안조직에서 합성되는 TGFβ에 대한 보고로는 방수를 생성하는 모양체상피세포에서 TGFβ가 생산되어 각막의 창상치유에 관계하는 것과[14,15] 망막색소상피세포에서 TGFβ가 생산되는 것이 알려져 있다[16]. 또한 각막내피세포와 각막섬유아세포가 TGFβ를 합성분비하는 것이 밝혀져 있다. 임상적으로 안조직의 섬유화는 섬유성 세포외기질이 과다하게 증가한 결과로 볼 수 있기 때문에 TGFβ가 직접 또는 간접으로 관련되어 있을 것이란 추측을 할 수 있다. 저자의 연구결과는 TGFβ가 콜라젠합성을 자극하는 효과가 있음을 보여주었다. TGFβ_3가 생체실험에서 섬유화를 억제한다는 보고가 있으나 이번 실험에서는 TGFβ_1과 TGFβ_2는 물론 TGFβ_3도 콜라젠생성이란 측면에서 같은 효과를 보여주었다. 실지로 피부에서도 TGFβ가 콜라젠생성을 자극하고 상처치유기전을 촉진시키는 것이 보고되어 있다[17]. TGFβ는 콜라젠생성을 자극할 뿐 아니라 세포의 증식과 수축에도 영향을 미치므로 섬유막형성에의 효과는 더욱 뚜렷하게 나타날 것으로 생각된다.

저자들의 연구결과는 망막색소상피세포가 증식초자체망막병증에서 섬유성 콜라젠을 합성하고 TGFβ는 콜라젠합성을 증가시킴으로서 증식초자체망막병증의 발생에 중요한 역할을 하고 있음을 보여준다.

REFERENCES

1) Aaberg TM : *Management of anterior and posterior proliferative vitreoretinopathy. XI V Edward Jackson Memorial Lecture. Am J Ophthalmol* 106:519-532, 1988.
2) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM : *Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J Cell Biol* 105: 1039-1045, 1987.
3) Hayashi K, Frangieh G, Wolf G : *Expression of transforming growth factor-beta in wound healing of vitamin A deficient rat corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 239-247, 1989.
4) Helbig H, Kittredge K, Coca-Prados M : *Mammalian ciliary body epithelial cells in culture produce transforming growth factor-beta. Graefes Arch Ophthalmol* 229:84-87, 1991.
5) Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M : *Idenification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:413-419, 1993.
6) Connor TB, Roberts AB, sporn MB : *Correlation of fibrosis and transforming growth factor-β type 2 levels in the eye. J Clin Invest* 83:1661-1666, 1989.
7) Smiddy WE, Glaser BM, Gree R : *Transforming growth factor beta-a biologic chorioretinal glue. Arch Ophthalmol* 107:577-580, 1989.
8) Glaser BM, Michels RG : *Induction of a retinal patch by transforming growth factor-beta in the treatment of full tickness mcular holes. Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(Suppl): 713, 1993.
9) Edwards RB : *Culture of mammalian retinal pigment epithelium and neural retina. Methods Enzymol* 81:39-43, 1982.
10) 김태연, 권오웅, 이성철 : 망막내면과 외면에 발생한 증식성막의 형태에 관한 전자현미경적 연구. 한안지 30:225-234, 1989.
11) Massague J : *The transforming growth factor-β family. Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641, 1990.
12) Rifkin DB, Kojima S, Abe M : *TGFβ : Structure, function and formation. Thrombosis & Hemostasis* 78:177-179, 1993.
13) Raghow R : *The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. FASEB* 8: 823-841.
14) Rasquale LR, Dorman-Pease ME, Lutty GA : *Immunolocalization of TGFβ_1, TGFβ_2 and TGF β_3 in the anterior segment of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:23, 1993.

15) Jampel HB, Roche N, Stark WJ : *Transforming growth factor β in human aqueous humour. Curr Eye Res* 9:963, 1990.
16) Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N : *Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:413-419, 1993.
17) Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF : *Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by TGFβ. Science* 237:1333-1336, 1987.