

지속성 각막상피결손 환자에서 autologous fibronectin 국소점안의 효과

김기산 · 남문진 · 오준섭 · 박낭운* · 김인산* · 조준승*

=Abstract=

Topical Autologous Fibronectin in the Treatment of Persistent Corneal Epithelial defects

Ki San Kim, M.D., Moon Jin Nam, M.D., Joon Sup Oh, M.D.
Rang Woon Park, M.D.*., In San Kim, M.D.*., and Joon Seung Jo, M.D.*.

Fibronectin, a glycoprotein, is present in plasma and extracellular matrix and is responsible for cellular adhesion. Fibronectin was purified from autologous plasma of two persistent corneal epithelial defect patients by affinity chromatography and administered topically 500 μ g/ml, 2 drops per time, five times a day for 3 weeks. Reepithelialization began three to seven days after initiation of treatment with autologous purified fibronectin eyedrops, and epithelial defects healed nearly completely and subjective symptoms were relieved. No side effects were observed. Over a follow-up period of 4 to 23 wks, no recurrences were noted.

Key Words : fibronectin, persistent corneal epithelial defect.

서 론

Fibronectin은 면역학적 특성과 구조적 특성이 유사한 일단의 고분자 당단백질을 지칭하는 것으로서 세포의 표면, 혈장, 각종체액, 결체조직 그리고 대부분의 기저막에 분포하고 있으며 교원질, glycosa-minoglycan, fibrinogen, polyamine 등의

계명대학교 의과대학 안과학교실

*경북대학교 의과대학 생화학교실

Department of Ophthalmology, Keimyung University School of Medicine

*Department of Biochemistry, Kyungpook University School of Medicine, Daegu, Korea

본 논문의 요지는 1988년 11월 4일 제 61차 대한안과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

여러가지 세포의 물질과 결합하는 능력이 있다. 따라서, fibro-nectin은 매우 다양하고 중요한 생리적 기능을 가지고 있다¹⁾.

Fibronectin은 1984년 Morrison 등²⁾에 의해 혈장의 cryoprecipitate내에 fibrinogen과 다른 cold-insoluble globulin이 있음을 밝히고 이를 cold-insoluble globulin(CIG)으로 명명하면서 처음으로 발견되었다. 그후 1970년 Mosesson과 Umfleet 등³⁾이 혈장에서 fibronectin을 분리 정제하는데 성공하였으며 1982년 Nishida 등⁴⁾에 의해 autologous fibronectin 점안액을 만드는데 성공하였다.

Fibronectin은 혈장과 세포의 기질의 당단백질로서 각막창상 치유에서의 역할에 대해서는 여러가지 기전으로 설명되고 있으나 아직까지 완전히 밝

혀지지는 않고 있다.

저자들은 지속성 각막상피결손이 있는 2명의 환자 3안을 대상으로 autologous fibronectin 점안액을 분리 정제하여 국소점안 후 임상증상의 호전, 각막상피결손의 호전, 시력의 회복 및 부작용의 유무 등을 관찰하였다.

대상 및 방법

제명대학교 의과대학 안과학교실에 래원한 류마チ스성 관절염이 병력과 지속적이고 반복 악화되는 각막찰과상과 미란을 동반한 건성각막염으로 진단된 49세 여자환자(증례 1, 양안)와 각막혼탁과 각막상피결손을 동반하고 있는 재발성단순수포성 각막염으로 진단된 56세 남자환자(증례 2, 우안)를 대상으로 하였다.

초진시 증상은 안통, 누루, 수명, 시력장애 등을

호소하였고 각막상피의 결손 기간은 12주에서 27주 간이었으며 고식적인 치료에는 거의 호전을 볼 수 없었다(Table 1).

저자들은 환자의 자가혈장으로부터 autologous fibronectin 점안액을 만들어 500 μ g/ml, 1회 2작씩, 1일 5회의 방법으로 21일간 국소점안하였으며 동시에 기왕에 사용하던 국소점안약을 병행하였다.

3주간의 fibronectin 투여기간동안 3, 5, 7, 12, 17, 21일에 각각 검사를 하였고 투여중단 후에는 매주 경과관찰을 하였다. 검사시에는 시력, 임상증상의 호전 유무, 부작용의 유무등을 관찰하였고 세극등 현미경 하에서 fluorescein 염색 후에 사진을 찍어 각막상피결손의 변화를 관찰하였다.

Autologous fibronectin의 분리 정제방법

부작용을 최소화 하기위해 환자의 자가혈장으로부터 무균상태 하에서 분리 정제하였다. 환자의 혈액 약 40CC를 채취하여 3.8% citrate 용액과 부피

Table 1. Summary of clinical data

Patient	Case 1(OU)	Case 2(OD)
age/sex	49/F	56/M
underlying condition	keratoconjunctivitis sicca (KCS) rheumatoid arthritis	recurrent herpetic keratitis
previous treatment	eyelid taping lubricants topical CM T-lens artificial tears	eyelid taping lubricants topical CM topical steroid TFT, IDU, Zovirax
duration of epithelial defect(wk)	14(OD) 27(OS)	12
duration of FN-therapy(wk)	3	3
follow up period(wk)	23(OD) 8(OS)	4
visual acuity*		
pre-FN	OD : 0.4+ OS : 0.5+	OD : 0.04+
post-FN	OD : 1.0 OS : 0.9	OD : 0.4+

* : uncorrected visual acuity

+ : uncorrectable

Table 2. Schematic draw of schedule purifying plasma fibronectin

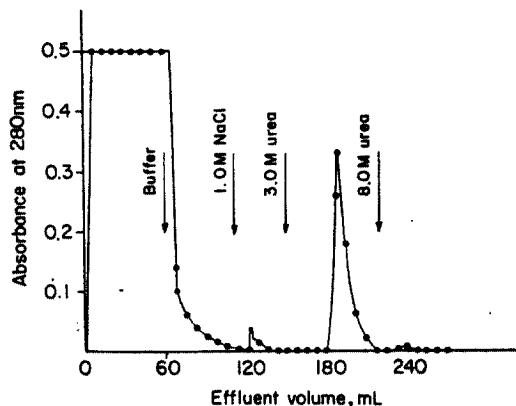
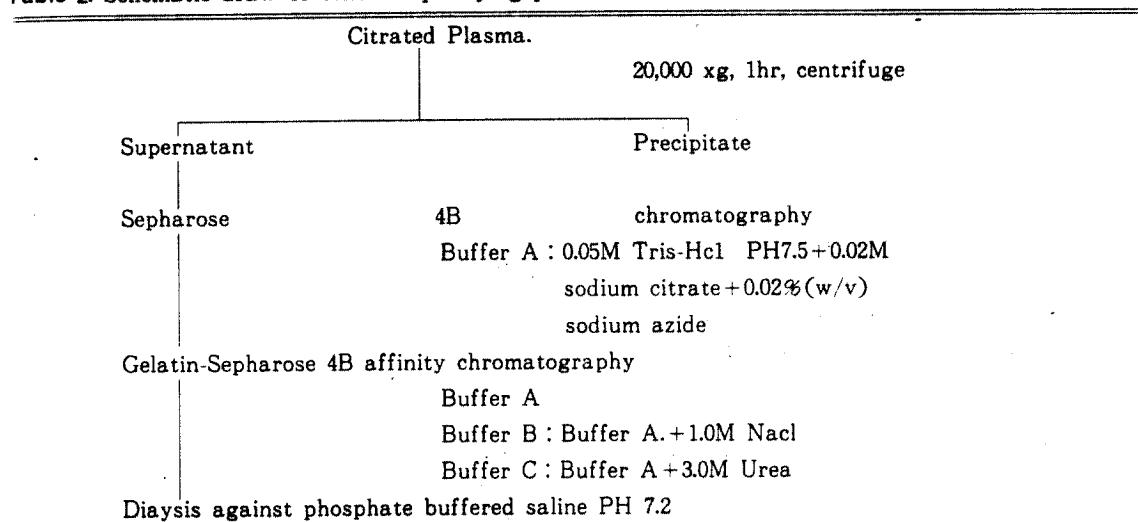


Table 3. Elution profile by gelatin-coupled Sephadex 4B affinity chromatography. Protein concentration was monitored by absorbance monitor at 280nm.

비가 9대 1이 되게끔 혼합하여 원침하고 그 상층액을 분리한 다음 20,000g로 다시 1시간동안 원심분리하여 상층을 얻은 후 sephadex 4B 필터용 column에 부과한 후 통과한 시료를 gelatin-sephadex 4B column에 부과하였다. 그후 용액 A(0.05M Tris-HCl PH 7.5+0.02M-sodium citrate+0.02% (W/V) sodium azide)를 통과시킨후 280nm의 자외선으로 단백질을 추적하여 column과 결합하지 않은 단백질이 완전히 유출될 때 까지 씻어내었다. 순도가 높은 fibronectin을 얻기 위해 용액 B(용액A + 1M-sodium azide)를 다시 column에 통과시켜 비특이적

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
1 : Starting plasma 2 : Fibronectin depleted plasma 3 : Purified fibronectin, dimer form indicated by arrow 4 : Purified fibronectin, monomer form indicated by arrow

으로 결합되어 있는 단백질을 제거시켰다. column에 부착되어 있는 fibronectin을 추출해 내기 위하여 용액 C(용액 A + 3M urea)를 통과시켰으며 자외선 검출기로서 유리되어 나오는 fibronectin을 확인하여 그 분획들을 받았다. 얻어진 fibronectin을 한곳에 모아 phosphate buffered saline(PH 7.2)에서 48시간에 걸쳐 투석하여 fibronectin을 정제하였다(Table 2, Table 3).

Fig. 2. Immunoelectrophoresis of purified plasma fibronectin. Electrophoresis was carried out for 1 hour with 100V, and then antiserum against human plasma fibronectin was applied into lower trough and antiserum against human serum into upper trough.

분리한 fibronectin의 순도를 증명하기 위해 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 하였으며 분리된 fibronectin이 single band를 형성함으로써 분리한 fibronectin이 순수한 것임을 증명해준다(Fig. 1.). 다시 immunoelectrophoresis를 실시하였으며 항인간혈청 항체와는 침착선이 형성되지 않고 항 fibronectin 항체와는 한개의 침착선이 형성되어 분리한 fibronectin이 순수한 것임을 증명하였다(Fig. 2).

결 과

증례 1

우안 : Fibronectin 투여후 3일째 안통, 누루, 수명 등의 임상증상이 현저히 호전되었고 7일째 부터 각막상피결손의 회복을 관찰할 수 있었으며 투여 중단후 1주째에는 시력이 1.0으로 호전이 되었고 각막하부 1/3부위를 제외하고는 전반적으로 각막상피 결손의 회복을 보였다. 투여중단 16주째에는 각막의 안검열 비축부위를 제외한 전반부에 각막 상피결손의 거의 완전한 회복을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

좌안 : 투여후 5일째 부터 임상증상의 현저한 호전을 보였고 각막상피 결손의 회복은 투여 3일째 부터 관찰되었으며 투여중단후 1주째에는 시력이 0.9로 호전되었다. 투여중단후 8주째에는 각막하부 1/4부위를 제외하고는 전반적으로 각막 상피결손의 거의 완전한 회복을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

환자는 우안 23주, 좌안 8주의 경과관찰기간동안 autologous fibronectin 투여에 따른 감염, 충혈, 과민반응등의 부작용은 없었으며 재발의 소견도

Fig. 3. case 1(OD) Fibronectin 투여전

Fig. 3-1. Fibronectin 투여중단 16주후

Fig. 4. case 1(OS) Fibronectin 투여전

Fig. 5. case 2(OD) Fibronectin 투여전

Fig. 4-1. Fibronectin 투여증단 8주후

보이지 않았다.

Fig. 5-1. Fibronectin 투여증단 4주후

고 찰

증례 2

Fibronectin 투여후 21일째 부터 임상증상의 현저한 호전을 보였고 투여 5일째 부터 각막상피결손의 회복을 관찰할 수 있었다. 투여후 21일째 검사에서 시력이 0.1로 호전되었고 각막상부 1/2부위에 현저한 각막상피결손의 회복을 관찰할 수 있었고 투여증단후 2주째 시력이 0.4로 호전되었으며 증단 후 4주째에는 기존의 각막흔탁부위를 제외하고는 각막 상피결손의 현저한 회복을 관찰할 수 있었다. 환자는 투여증단후 4주간의 관찰기간동안 부작용이나 재발의 소견은 보이지 않았다(Fig. 5).

Fibronectin 은 혈장 및 세포외기질의 당단백질로서 세포와 교원질에 결합하는 능력이 있으며 세포의 유착과 성유아세포가 기질에 부착하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있는 물질로서 1948년 Morrison에 의해 처음 발견되어 CIG(cold-insaluble globulin)으로 명명된 후 여러 학자들에 의해 CSP(cell surface protein), LETS(large external transformation sensitive protein), CAF(cell adhesive factor), Gap A(galactoprotein A), zeta protein, opsonic factor, antigelatin factor 등의 다양한 이름으로 불리어왔다⁵⁾.

Fibronectin은 cellular fibronectin과 plasma fibronectin의 두 가지 형태가 있으며 cellular fibronectin은 plasma fibronectin보다 생물학적 역기는 높은 반면 분리하기가 용이하지 않다. plasma fibronectin은 220,000달톤의 poly-peptide가 dimer를 형성하고 있으며 분자량은 440,000이다.

Fibronectin의 기능은 세포의 유착 및 화산에의 증개역할, 세포의 운동성 증가, 세포의 분화 및 형태발생학적 운동성의 증가, 식작용을 향상시키는 능력이 있어 혈장내에서 비특이적인 opsonin으로서의 작용 등으로 생각되어진다.

Fibronectin은 섬유아세포에서 처음 발견되었고 그후 시험관상에서 간과 신장의 상피세포, 근원세포, 미분화연골세포, 대식세포, Schwann세포, 후혈구, 대신경교세포, 혈소판, 혈관내피세포 등에서 fibronectin을 생산한다는 것이 밝혀졌다⁶⁾. fibronectin 이 특히 많이 분포되어 있는곳은 내피세포의 basal lamina와 그외의 다른 limiting lamina이다⁷⁾. 사람의 정상 각막에는 각막상피세포의 basal-lamina, 각막실질, Descemet막에 분포되어 있고 Bowman 막에는 없으며 Kohno 등에 의하면 4세이하의 어린이들에서는 Descemet막에서만 발견되고 나이가 들면 내피세포에도 나타난다고 한다^{8~12)}. 각막질환이나 각막창상시의 fibronectin의 분포를 보면 각막상피나 실질이 상처를 받은후 8시간내에 노출된 표면에 fibronectin이 침착되어 각막상피가 완전히 회복될때까지 이동하는 상피세포밀에 존재하다가 그 후에는 사라지는데 이는 fibronectin과 각막상피의 이동과의 밀접한 관계를 시사해준다¹³⁾. 또한 전종각막이식술후의 반흔이 있는 곳에도 나타나고⁹⁾ 열 또는 알칼리에 의한 화상 그리고 실험적 수포성 각막증후에도 fibronectin의 분포에 변동이 생기며^{14~16)} 원추각막의 basal lamina와 전실질부위에도 나타난다.

각막창상 치유과정에서의 fibronectin은 중요한 역할을 하는것으로 생각되어 지는데 각막창상시 fibronectin을 국소투여하면 각막상피세포의 이동을 촉진시키고 이는 세포증식을 증가시키는 EGF (epidermal growth factor)¹⁷⁾와는 달리 세포의 이동을 촉진시켜 일어난다고 한다. 또한 iodine vapor 를 이용해서 각막상피를 제거한 경우나 각막의 알칼리에 의한 화상후에도 각막상피의 치유를 촉진시키고 더이상 각막궤양의 진행을 방지한다고 한

다. 또한 fibronectin은 각막내피세포의 부착을 촉진하고 배양상에서 내피의 성장을 증진시킨다는 보고도 있다⁶⁾.

임상적으로 1982년 Nishida 등⁴⁾에 의해 환자의 혈장으로부터 autologous fibronectin 점안액을 신속히 분리 정제하는 방법이 보고된 이래 몇몇 학자들에 의해 그효과에 관한 연구가 계속되어 왔으며 이들은 고식적요법에 잘 반응하지 않는 지속성 각막상피결손, trophic ulcer 그리고 전성각결막염등에서 autologous fibronectin을 국소점안하여 각막상피결손이 치유되었고 이에따른 부작용은 없었다고 보고하였다. 이들의 보고로는 autologous fibronectin 투여후 각막상피결손의 회복시기는 투여후 1~3일에서부터 투여중단후 1~2주까지로 다양했다. 저자들의 예에서는 지속적이고 반복 악화되는 각막상피결손이 있는 전성각결막염환자의 양안과 재발성단순수포성각결막염환자의 우안에 환자의 혈장으로부터 분리 정제한 autologous fibronectin을 국소점안한 결과 약 3~7일째 부터 각막상피결손의 회복을 관찰할 수가 있었고 완전히 치유되지는 않았으나 전반적으로 각막상피결손의 회복을 볼 수 있었으며 임상증상 및 시력의 호전을 보였다. 그러나 fibronectin 투여에 따른 부작용은 보이지 않았다.

Fibronectin의 작용기전은 여러가지로 설명되고 있으나 완전히 밝혀지지는 않았으며 그중 몇가지를 살펴보면 fibronectin이 교원질과 결합하여 세포의 유착과 이동을 위한 하층을 구성하고 교원효소를 생산하는 백혈구의 활동을 감소시킨다는 보고가 있고 섬유아세포가 섬유소원이나 섬유소에 유착되는 것을 증진시켜 상처부위에 섬유소원/섬유소 복합체가 형성되게 하여 창상치유를 촉진시키며 또 각막내피세포가 섬유소를 합성하는데도 관여한다고 한다. Berman에 의하면 각막궤양은 plasmin이 섬유소와 fibronectin을 파괴하여 각막교원질의 용해를 증가시켜 일어난다고 하였는데 이연구에 의하면 fibronectin은 파괴된 원래의 섬유소를 보충하고 상피의 유착과 각막창상 치유를 촉진시키는 것으로 보여진다.

Nakagawa 등에 의하면 각막상피가 fibronectin에 반응하여 세포내의 actin filament를 재조직하여 각막상피세포의 이동을 촉진시킨다고 한다⁶⁾.

Fibronectin의 내인성 원천은 누액, 전방수, 동공연의 혈관, retrocorneal fibrous membrane 및 각

각막 자체에서 유래 한다고 추정되는데 주로 각막 자체가 원천이 된다고 하며 각막상피세포, keratocyte, 각막내피세포 등에서도 fibronectin을 생산한다는 보고가 있다^{22, 23)}.

Fibronectin은 정상인의 경우 혈장내의 농도가 235 ± 62 μg/ml이며 남자에서 여자보다 그 농도가 높으며 연령이 증가 할수록 농도는 증가되나 그 기능은 떨어지는 것으로 보고되어 있다⁴⁾.

결 론

지속성 각막상피결손이 있는 환자의 혈장에서 분리 정제한 fibronectin을 국소점안한 결과 부작용 및 합병증이 없이 임상증상의 호전, 각막상피결손의 회복, 시력의 회복을 관찰할 수 있었으며 이는 각막창상이나 각막상피질환의 치유과정에 fibronectin이 중요한 역할을 하는것으로 생각된다. 따라서 앞으로 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Mosesson, M.W. and Amrani, D.L. : *The structure and biologic activities of plasma fibronectin*. *Blood*, 56 : 145-158, 1980.
- 2) Morrison, P.R., Edsall, J.T. and Miller, S.G. : *Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibronectin from fraction I of human plasma*, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 : 3130-3108, 1948.
- 3) Mosesson, M.W. and Umfleet, R.A. : *The Cold-insoluble globulin of human plasma. I. purification, primary Characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components*, *J. Bio. Chem.*, 245 : 5728-5736, 1970.
- 4) Nishida, T., Nakagawa, S., Awata, T., Nishibayashi, C. and Manabe, R. : *Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patients plasma*, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 26 : 416-424, 1982.
- 5) Pearlstein, E., Gold, L.I. and Garcia-Pardo, A. : *Fibronectin : A Review of its structure and biological activity*, *Molecular & Cellular biochemistry*, 29 : 103-128, 1980.
- 6) Ding, M. and Burstein, N.L. : *Review : Fibronectin in Corneal wound healing*, *J. Ocular Pharmacology*, 4 : 75-91, 1988.
- 7) Stenman, S. and Vaheri, A. : *Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin in normal human tissues*, *J. Exp. Med.*, 147 : 1054-1064, 1978.
- 8) Newsome, D.A., Foidart, J., Hassell, J.R., Krammer, J.H., Rodrigues, M.M. and Katz, S.I. : *Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20 : 738-750, 1981.
- 9) Watanabe, T. and Kumagai, S. : *Localization of fibronectin as revealed by immunofluorescence in human corneas*, *Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.*, 86 : 426-432, 1982.
- 10) Tsuchiya, S., Tanaka, M., Konomi, H. and Hayashi, T. : *Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas*, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 30 : 14-31, 1986.
- 11) Tervo, T., Sulonen, J., Valtonen, S., Vannas, A. and Virtanen, I. : *Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas*, *Exp. Eye Res.*, 42 : 399-406, 1986.
- 12) Kohno, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R. and Ryan, S.J. : *Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28 : 506-514, 1987.
- 13) Fujikawa, L.S., Foster, C.S., Gipson, I.K. and Colvin, R.B. : *Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds : Immunofluorescence and ultrastructural studies*, *J. Cell Biol.*, 98 : 128-138, 1984.
- 14) Berman, M., Manseau, E., Law, M. and Aiken, D. : *Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 24 : 1358-1366, 1983.
- 15) Ohashi, Y., Nakagawa, S., Nishida, T., Suda, T., Watanabe, K. and Manabe, R. : *Appearance*

- of fibronectin in rabbit cornea after thermal burn, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 27 : 547-555, 1983.
- 16) Nishida, T., Ohashi, Y., Inoue, Y., Nakagawa, S., Awata, T., Suda, T., and Manabe, R. : Dynamics of fibronectin in corneal wound healing : Immunohistochemical study of experimental bullous keratopathy in rabbits, *Cornea*, 1 : 311-317, 1982.
- 17) Watanabe, K., Nakagawa S. and Nishida, T. : Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28 : 205-211, 1987.
- 18) Nishida, T., Ohashi, Y., Awata, T. and Manabe, R. : Fibronectin : A new therapy for corneal trophic ulcer, *Arch. Ophthalmol.*, 101 : 1046-1048, 1983.
- 19) Phan T.M., Foster, C.S., Boruchoff, S.A., Zagachin, L.M., and Colvin, R.B. : Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers, *Am J. Ophthalmol.* 104 : 494-501, 1987.
- 20) Nishida, T., Nakagawa, S., Awata, T., Tani, Y. and Manabe, R. : Fibronectin eyedrops for traumatic recurrent corneal erosion, *Lancet*, 2 : 521-522, 1983.
- 21) Kono, I., Matsumoto, Y., Kono, K., Ishibashi, Y., Narushima, K., Kabashima, T., Yamane, K., Sakurai, T. and Kashiwagi, H. : Beneficial effect of topical fibronectin in patients with keratoconjunctivitis sicca of Sjögren's syndrome, *Jpn. J. Rheumatol.*, 12 : 487-489, 1985.
- 22) Nishida, T., Nakagawa S., Ohashi, Y., Awata, T. and Manabe, R. : Fibronectin in corneal wound healing : Appearance in cultured rabbit cornea, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 26 : 410-415, 1982.
- 23) Nishida, T., Tanaka, H., Nakagawa, S., Sasabe, T., Awata, T. and Manabe, R. : Fibronectin synthesis by the rabbit cornea : Effects of mouse epidermal growth factor and cyclic AMP analogs, *Jpn. J. Ophthalmol.*, 28 : 196-202, 1984.