

배양가토각막내피세포의 창상치유에 대한 Fibronectin Hyaluronic Acid 및 Growth Factors의 효과

김 기 산·한 덕 기

= 요 약 =

각막내피세포의 창상치유에 대한 fibronectin(FN), hyaluronic acid(HA), epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF), 및 transforming growth factor- β (TGF- β)의 효과를 알아 보기 위해 토끼의 각막내피세포를 배양하고 배양된 세포의 표면에 원형의 창상을 만들어 상기약제를 투여하고 창상치유면적과 창상치유속도를 측정하여 비교분석하였다. 또한 내피세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 DNA합성도를 측정하였다.

FN은 사용한 모든 농도에서 통계학적으로 의의있는 창상치유면적의 증가가 있었고 HA는 1.0mg/ml에서만 증가되었다. EGF는 사용한 모든 농도에서 창상치유면적의 증가가 있었고 반면에 FGF는 창상치유면적의 증가를 관찰할 수 없었다. TGF- β 는 1.0 및 10.0ng/ml에서 창상치유면적의 증가가 있었다. FN과 HA의 병합투여시는 보다 높은 효과가 있었으며 EGF와 TGF- β , FGF와 TGF- β 의 병합투여시에는 상승효과나 억제효과를 관찰할 수 없었다. 창상치유속도는 모든 경우에서 첫 12시간에 가장 빨랐다. DNA합성도는 EGF에서만 증가되었고 TGF- β 는 EGF에 의한 증가효과를 감소시켰다. 이상의 결과로 보아 FN, HA 및 TGF- β 는 각막내피세포의 이동을 증진시키므로써 창상치유를 촉진시키고 EGF는 내피세포의 이동 및 세포증식을 통하여 창상치유를 촉진시킨다고 할 수 있다(한안지 33: 436~456, 1992).

= Abstract =

The Effect of Fibronectin, Hyaluronic Acid and Growth Factors on the Wound Healing of Cultured Rabbit Corneal Endothelial Cells

Ki-San Kim, M.D., Duk-Kee Hahn, M.D.

To investigate the effects of fibronectin (FN), hyaluronic acid (HA), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), and transforming growth factor- β (TGF- β) on the healing of the corneal endothelial cells, the rabbit corneal endothelial cells were

〈접수일 : 1992년 2월 20일, 심사통과일 : 1992년 3월 20일〉

영남대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology Yeungnam University School of Medicine, Taegu, Korean

본 논문은 계명대학교 동산의료원에서 을종연구비 일부를 보조받았음.

본 논문의 요지는 1991년 10월 25일 서울에서 개최된 제67차 대한안과학회 학술대회에서 구연발표된 바 있음.

cultured from the outgrowth of Descemet's membrane explants. After making a wound at the center of the monolayer of confluent corneal endothelial cells using a rotating silicone tip, three different concentrations of testing agents were added. Then, the wound healing area and healing rate were measured. In addition, the effects of agents on the DNA synthesis by corneal endothelial cells were determined by measuring the incorporation of ³H-thymidine into cold acid-insoluble material. FN and EGF increased the wound healing area at all concentrations tested, and HA only at 1.0mg/ml showed a stimulatory effect. However, FGF showed little effect at all concentrations. TGF- β promoted wound healing at 1.0 and 10.0 ng/ml.

The combined treatment of FN and HA caused a more potent effect on corneal endothelial wound healing than single treatment. Neither the combined treatment of EGF and TGF- β , nor the combined treatment of FGF and TGF- β caused any significant effect. Wound healing rate was highest during the first 12 hours in all agents. EGF stimulated DNA synthesis while other agents studied did not, and TGF- β suppressed EGF-induced DNA synthesis. These results indicate that FN, HA and TGF- β stimulate the endothelial wound healing by probably enhancing cell migration, and EGF by enhancing cell migration and cell proliferation (J Korean Ophthalmol Soc 33: 436~456, 1992).

Key Words : Corneal endothelial cell, DNA synthesis, Fibronectin, Growth factor, Hyaluronic acid.

각막의 투명도와 정상두께를 유지하기 위해서는 각막의 수분조절기능이 원활해야 하다. 이를 조절하는 요소로는 각막실질의 종창압, 각막상피 및 내피세포의 장벽기능, 각막내피세포의 능동적 펌프기능, 그외 각막표면에서의 눈물의 증발, 안압등이 있다¹⁾. 이중에서도 각막내피세포의 장벽 기능과 능동적 펌프기능이 가장 중요한 역할을 한다. 그러나 여러 안질환에 의한 각막변성이나 이영양증 또는 약물, 외상, 수술등으로 인해 각막내피세포가 소실되거나 그 기능의 저하되면 각막전층의 부종 및 혼탁을 초래하여 시력저하의 중요한 원인이 된다.

각막내피세포는 이웃하는 내피세포사이에 junctional complex가 있어 큰 분자의 통과를 막는 장벽역할을 하고 내피세포의 lateral plasma membrane내에 있는 Na⁺/K⁺-ATPase complex가 수분을 각막실질에서 전방내로 이동시키는 역할을 한다²⁾. 이러한 중요한 생리적 기능에도 불구하고 각막내피세포는 아주 손상받기 쉬운 조직이며 또한 각막이식술후에 유사핵분열(mitosis)이 소수에서 빌

견되기는 하지만³⁾ 사람의 각막내피세포는 출생후 거의 분열하지 않는 것으로 알려져 있다¹⁾. 그래서 이 내피세포가 기계적 또는 염증성 손상을 받으면 오직 이웃 세포들의 이동, 재배열 및 확대에 의해서만 치유가 되어 결국 새로운 세포 경계가 형성되고 기능이 회복하게 된다^{4,5)}. 정상성인의 내피세포수는 mm²당 약 3000~3500개정도인데^{1,6)} 내피세포의 밀도가 너무 낮은 경우나 또는 내피세포의 손상범위가 너무 클 경우에는 치유가 불가능하거나 치유된다고 하더라도 기능의 회복이 안 될 경우 결국 각막부종에 빠지게 된다. 이러한 경우의 예방법이나 각막내피세포의 증식 및 이동을 촉진시키는 치료법이 절실히 요구되지만 현재 각막내피세포의 소실이나 기능저하에 대한 치료는 아주 제한되어 있고 예방적 차원에서 수술기법이나 수술시 사용하는 관류액의 개발등이 이루어져 왔을 뿐이다. 지금까지 시험관 실험에서 각막내피세포의 이동 및 증식의 촉진을 위해 growth factor를 비롯한 여러 약물들의 효과에 관한 보고가 있어 왔다^{7~9)}.

Fibronectin은 혈장 및 세포의 기질에 존재하는 단백질로서 세포의 유착 및 확산의 증가역할, 그리고 세포의 분화와 형태발생학적 운동성 증가 등의 기능을 가지고 있다¹⁰⁾. 그리고 실제로 각막 상피세포의 치유에 효과가 있음을 여러 임상적 연구에서 입증이 되고 있다^{11~16)}. 1983년 Scott 등¹⁷⁾에 의하면 fibronectin이 각막내피세포의 부착을 증가해 주고 배양시 성장을 증진시킨다고 하였으나 그 이후 이 방면의 연구에 더 이상의 진전이 없었다. Hyaluronic acid는 linear polysaccharide로써 백내장수술 특히 인공수정체삽입술시 전방내에 주입하여 각막내피세포를 보호하기 위해 사용하는 점탄물질인 Healon의 주 성분이며 hamster쥐의 볼주머니의 창상치유를 촉진시킨다는 보고가 있다¹⁸⁾. 그래서 이미 임상적으로 사용되고 있는 hyaluronic acid가 각막내피세포의 치유에도 영향을 미치는가를 보고자 하였다. 또한 표피세포등 여러 세포의 증식을 촉진시키는 epidermal growth factor(EGF)¹⁹⁾, 중배엽과 신경외배엽에서 유래된 세포의, 특히 혈관내피세포의 증식을 촉진시킨다고 알려져 있는 fibroblast growth factor(FGF)^{20~23)}, 상피세포와 내피세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있는 transforming growth factor- β (TGF- β)²⁴⁾등의 약제들의 각막내피세포 창상치유에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 그러나 대부분의 내피세포에 관한 실험이 서로 다른 실험모델을 사용하고 있고 또한 실험방법 및 결과가 상이하여 정확한 효과를 알기가 어려운 실정이다.

본 실험은 가토각막내피세포를 배양하여 Miyata²⁵⁾가 개발한 각막내피세포의 인위적인 창상제작에 관한 실험모델을 이용하여 내피세포의 창상을 만든 후 Fibronectin, hyaluronic acid, EGF, FGF 및 TGF- β 의 창상치유에 대한 효과를 측정하고 또한 각 약제에 의한 DNA합성도를 측정하여 약제들의 내피세포에 미치는 영향을 연구하고자 시행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료는 다음과 같다. 즉, 조직배양액 M199과 fetal calf serum(FCS)과 EDTA 및 Tryp-

sin용액은 Gibco, U.S.A.의 제품을, 면적 75cm²의 조직배양 flask와 24-well 조직배양 plate(Adcellco-at TCL-241)는 Costar, U.S.A의 제품을, human fibronectin은 New York Blood Center, U.S.A의 제품을, recombinant human epidermal growth factor(EGF)와 human transforming growth factor- β (TGF- β)는 Earth Pharmaceuticals Co., Japan의 제품을, Hyaluronic acid(HA)는 Santen Pharmaceuticals Co., Japan의 제품을, basic bovine pituitary fibroblast growth factor(FGF)는 Sigma, U.S.A의 제품을 각각 사용하였다. 그리고 6.7Ci/mmol의 methyl-tritiated thymidine(methyl-³H-thymidine)은 NEN Research Products, U.S.A. 제품을, 그리고 scintillation cocktail용액은 Lumac, U.S.A. 제품을 각각 사용하였다. 기타 시약들은 시판되는 일급이상의 제품을 사용하였다. 본 실험에 사용한 동물은 체중 2~3Kg의 Japanese white rabbit이었고 총 26마리 52안을 사용하였다.

각막내피세포의 배양방법은 먼저 토끼의 안구를 적출하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 깨끗이 씻은 다음 각막윤부에서 3~4mm떨어진 부위를 따라 절제하여 각공막편을 얻은 후 변형시킨 Stocker 등²⁶⁾의 방법에 따라 절제한 각공막편을 내피세포가 위로 가도록 놓고 수술용현미경하에서 Descemet씨 막을 razor blade로 잘게 잘라서 배양액(M199, 15%FCS, 20mM HEPES)과 섞어 조직배양 flask에 넣고 CO₂ incubator(5% CO₂, 100% humidity, 37°C)내에서 배양하였다. 1~2일후 배양액을 첨가하고 5~6일동안 계속 배양하였다. 실험에 필요한 충분한 세포수로 증식되면 2.5ml의 0.02% EDTA, 0.25% Trypsin을 넣어 내피세포를 떼어내고 mesh를 통과시킨 후 원심분리하였다(200×g, 5분). 상청액은 버리고 남은 세포에 배양액을 넣은 다음 well당 세포수가 약 1×10⁵개가 되도록 500μl씩 24-well에 넣고 다시 배양하였다.

창상제작은 24-well plate에 배양된 가토각막내피세포가 증식하여 well 표면에 밀생하게 되었을 때 Miyata²⁵⁾가 고안한 직경 1mm의 silicone tip을 장치한 기계를 이용하여 silicone tip을 회전시켜 그 끝을 well의 한가운데에서 내피세포와 살짝 접

촉시킴으로써 찰파를 일으켜 재현성있는 일정한 조건의 면적 3–4mm²의 원형의 창상을 만들었다 (Fig. 1, 2).

창상을 만든 직후에 약제를 투여하였는데 즉, 배양액(M199, 1% FCS)만 넣은 것을 대조군으로 하였고 약제투여군에는 각 plate마다 배양액과 섞어서 fibronectin(0.1, 1.0, 10.0 μg/ml), hyaluronic acid(0.01, 0.1, 1.0mg/ml), EGF(0.1, 1.0, 10.0ng/ml), FGF(0.1, 1.0, 10.0ng/ml), TGF-

β (0.1, 1.0, 10.0ng/ml)를 각각 3가지 농도별로 넣었다. 또한 fibronection(1 μg/ml)과 hyaluronic acid(1mg/ml), EGF(1.0mg/ml)와 TGF- β (1.0ng/ml), 및 FGF(1.0ng/ml)와 TGF- β (1.0ng/ml)의 병합효과를 보기 위하여 각각의 약제를 단독 및 함께 투여하고 배양하였다.

창상치유면적의 측정은 창상을 만들고 약제를 투여한 후 즉시, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간 후에 도립위상차 현미경(Nikon)으로 사진촬영($\times 100$)하고 약 3배 크기로 확대인화하였다. 확대인화된 사진을 이용하여 Image Analysis System (Bio-Optics, U.S.A)의 area program과 Computerized Digitizer(SAC, U.S.A.)로 각 시간별 창상의 면적을 측정하였다. 약제의 창상에 대한 치유효과는 시간경과에 따른 창상치유면적의 %로 평가하였으며 또한 첫 12시간동안, 12시간에서 24시간사이, 24–36시간사이, 그리고 36–48시간사이의 창상치유속도를 구하여 비교분석하였다. 창상치유면적의 %와 창상치유속도는 다음과 같은 공식으로 구하였다. 즉, 창상치유면적(%)=(초기창상면적–일정시간대의 창상면적) $\times 100$ /초기창상면적, 창상치유속도=(T₁시간의 창상면적–T₂시간의 창상면적)/(T₂–T₁)이다. 아울러 배양된 내피세포의 형태학적 관찰도 같이 하였다.

또한 세포증식정도를 보기 위하여 DNA합성량을 측정하였다. 배양된 내피세포를 well당 1×10^5 개씩 배양액(M199, 15% FCS)과 함께 24-well plate에 심어 세포가 밀생하게 될 때까지 배양하였다. 창상제작실험때와 동일한 조건으로 약제를 넣고 동시에 ³H-thymidine을 well당 2 μCi씩 넣어 24시간 배양하였다. 그후 상청액은 버리고 4°C의 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 2회 씻어 결합되지 않은 방사능을 제거한 후 4°C에서 20분간 1ml의 5% trichloroacetic acid(TCA)으로 처리하였다. 상청액은 버리고 다시 5% TCA로 2회 씻은 후 absolute alcohol로 2회 씻어 고정을 시켰다. 각 well의 고정된 세포를 500ml의 2% Na₂CO₃/0.1N NaOH용액으로 약 30분간 용해시켜 5ml의 scintillation cocktail(Aqualuma plus, Lumac, U.S.A)이 들어 있는 병에 넣고 β -counter (Packard, U.S.A)로 5분간 계수하여 세포의

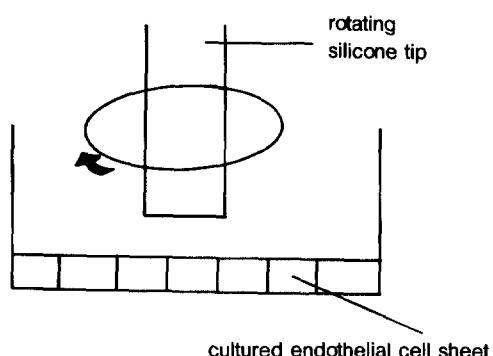


Fig. 1. Schematic draw showing wounding method by rotating silicone tip.

Fig. 2. A round wound was made on confluent cultured rabbit corneal endothelial cells in a well surface using a rotating silicone tip (phase-contrast micrograph, $\times 100$).

DNA내로의 편입된 ^3H -thymidine의 방사능을 측정하였다.

모든 성격의 통계처리는 일원분산분석으로 검정하였다.

결 과

세포배양 및 치유과정의 형태학적 관찰 : 75cm^2 조직배양 flask에서 배양한 후 1~2일째 Descemet 씨 막주위로 내피세포가 flask면에 접착하여 자라 나오기 시작하여 7일째는 내피세포가 분열하여 많이 자라나음이 관찰되었다. 이때 EDTA와 Trypsin처리를 하여 24-well plate에 옮겨 심은 후에는 약 3일째 세포가 밀생하게 되었다(Fig. 3).

내피세포가 밀생하게 배양되었을 때는 다각형의 모양이었으나 창상제작 후 창상이 치유되는 동안 창상의 가장자리에 있는 세포는 창상의 중앙을 향해 그 모양이 길어지고 방추형으로 변하였고 그 주위의 세포는 다각형이였다. 그러나 창상치유가 끝난 후 세포가 다시 밀생하게 됐을 때는 방추형에서 다각형모양으로 변하는 것을 관찰 할 수 있었으며 약제에 따른 세포모양의 변화의 차이는 없었으나 EGF사용시에 비교적 뚜렷이 잘 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

Fibronectin의 효과 : fibronectin투여 12시간후

에 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 창상치유면적의 증가가 있었고 유의성있는 증가가 24시간과 36시간 때 까지도 계속 유지되었다. 특히 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 군에서는 낮은 농도군에서 보다도 유의한 증가가 있었다(Table 1, Fig. 5). 치유속도는 첫 12시간동안이 가장 빨랐으며 대조군에 비해 fibronectin군에서 통계학적으로 의의있게 빨랐으며 그 다음부터는 대조군과 차이가 없었으며 오히려 첫 12시간동안 치유속도가 빨랐던 군은 24~36시간, 36~48시간 동안에는 대조군보다 감소하였다 (Table 2, Fig. 6).

DNA합성은 대조군이나 사용한 모든 농도의 fibronectin군이나 모두 비슷한 합성도를 보여 창상치유때의 결과와는 달리 fibronectin은 DNA합성에 있어서는 효과가 없었다(Table 3).

Hyaluronic acid의 효과 : hyaluronic acid는 1.0mg/ml군에서만 각 시간대에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 치유면적의 증가가 있었고 (Table 1, Fig. 5) 치유속도는 역시 첫 12시간대가 가장 빨랐으며 0.1, 1.0mg/ml군에서 통계학적으로 의의있게 증가되었고 12~24시간사이에서도 대조군에 비해 모든 농도군에서 통계학적으로 유의하게 빠른 치유속도가 유지되었다(Table 2, Fig. 6). 그러나 DNA합성은 대조군과 통계학적으

Fig. 3. A, Outgrowth of the rabbit corneal endothelial cells from explant of Descemet's membrane three days after explantation (phase-contrast micrograph, $\times 320$). B, The confluent corneal endothelial cells three days after incubation in 24-well plate were polygonal in shape (phase-contrast micrograph, $\times 320$).

Fig. 4. The size of the wound area decreased with time. Cells at margin of the healing wound were spindle-shaped, but became polygonal after complete wound healing. Initial wound (A), 12 hours (B), 24 hours (C), 36 hours (D), and 48 hours (E) after making a wound (phase-contrast micro graph, $\times 100$).

Table 1. Wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with FN, HA and combined treatment of FN and HA.

agents	conc.	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours
FN	0.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	44.59 \pm 3.59	65.82 \pm 4.05	81.85 \pm 6.16	96.07 \pm 4.53
	0.1	57.77 \pm 1.93*	78.97 \pm 3.59*	93.58 \pm 3.09*	100.00 \pm 0.00
	1.0	57.04 \pm 2.38*	79.90 \pm 5.53*	93.57 \pm 3.57*	100.00 \pm 0.00
	10.0	61.11 \pm 2.53**+	85.78 \pm 3.56**+	97.08 \pm 1.70*	100.00 \pm 0.00
HA	0.00mg/ml	55.57 \pm 2.85	71.85 \pm 2.18	83.06 \pm 2.32	88.83 \pm 1.90
	0.01	53.17 \pm 5.15	72.39 \pm 5.71	82.79 \pm 5.58	89.23 \pm 5.66
	0.10	56.88 \pm 4.78	74.65 \pm 4.17	84.51 \pm 2.78	90.19 \pm 2.48
	1.00	61.36 \pm 4.33**§	81.48 \pm 4.81*	88.83 \pm 4.18*	93.85 \pm 2.86*
FN+HA	0	51.68 \pm 5.23	76.79 \pm 7.49	96.05 \pm 3.40	100.00 \pm 0.00
	FN(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	64.72 \pm 3.02*	91.01 \pm 3.31*	99.34 \pm 1.33	100.00 \pm 0.00
	HA(1.0mg/ml)	63.63 \pm 4.55*	91.15 \pm 1.66*	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
	FN+HA	69.90 \pm 1.93**	97.01 \pm 0.89**	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00

Values represent the mean \pm S.D. percentages of wound healing area for six determinations. FN : fibronectin, HA : hyaluronic acid, FN+HA : combined treatment of fibronectin (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and hyaluronic acid (1.0 mg/ml)

* p<0.05, compared to control group

+ p<0.05, compared to 0.1 & 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ groups

§ p<0.05, compared to 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group

§ p<0.05, compared to 0.01mg/ml group

* p<0.05, compared to FN and HA alone groups

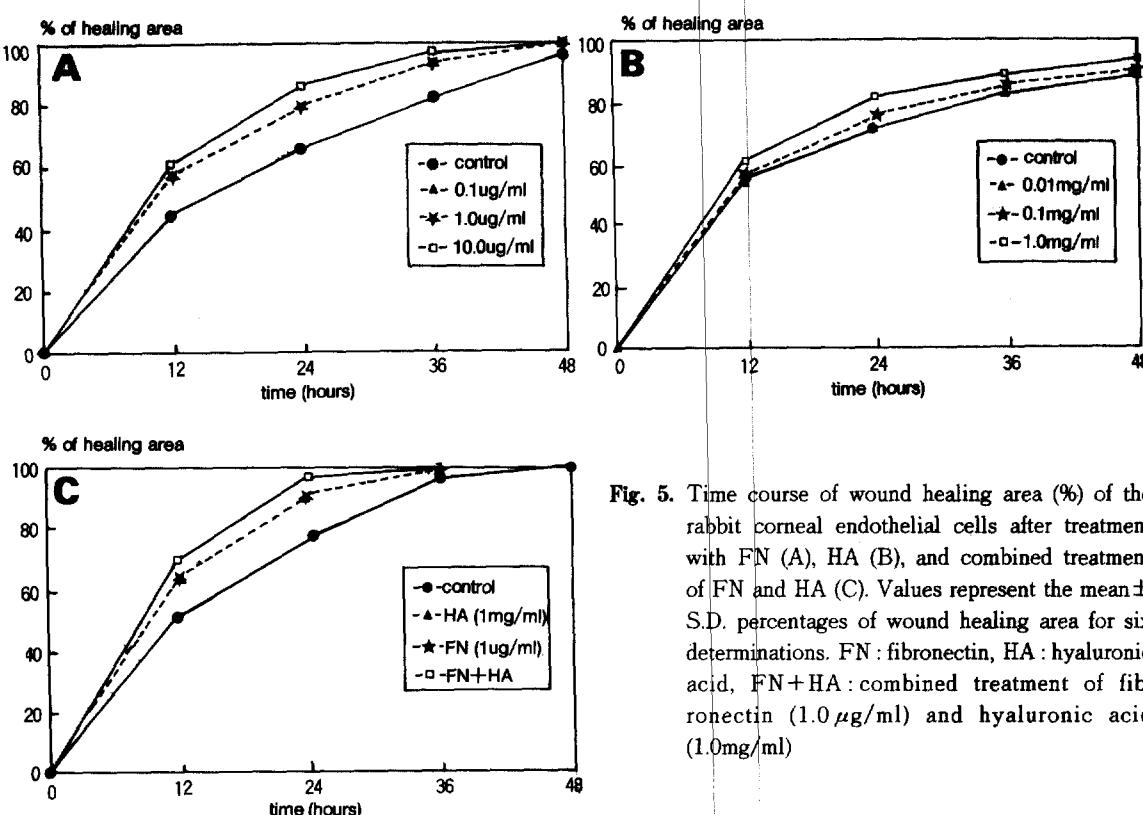


Fig. 5. Time course of wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with FN (A), HA (B), and combined treatment of FN and HA (C). Values represent the mean \pm S.D. percentages of wound healing area for six determinations. FN : fibronectin, HA : hyaluronic acid, FN+HA : combined treatment of fibronectin (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and hyaluronic acid (1.0mg/ml)

Table 2. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with FN, HA and combined treatment of FN and HA.

agents	conc.	0-12 hrs	12-24 hrs	24-36 hrs	36-48 hrs
FN	0.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	162.82 \pm 13.58	77.64 \pm 6.88	68.61 \pm 12.06	52.22 \pm 28.05
	0.1	194.86 \pm 7.39*	71.53 \pm 12.43	49.26 \pm 11.05	21.62 \pm 10.33*
	1.0	186.34 \pm 5.45*	74.58 \pm 9.87	44.77 \pm 8.10*	21.16 \pm 12.01
	10.0	197.22 \pm 7.64*	79.63 \pm 11.64	36.48 \pm 8.65*	9.44 \pm 5.54*
HA	0.00mg/ml	249.58 \pm 10.61	73.24 \pm 5.62	50.30 \pm 5.71	26.04 \pm 8.04
	0.01	266.56 \pm 30.43	96.22 \pm 10.47*	52.00 \pm 1.84	32.06 \pm 5.82
	0.10	305.56 \pm 18.49*	96.25 \pm 14.20*	53.43 \pm 12.68	30.51 \pm 7.32
	1.00	321.67 \pm 31.09**+	106.22 \pm 21.58*	38.89 \pm 8.88**+	27.50 \pm 13.32
FN+HA	0	179.35 \pm 21.65	86.25 \pm 16.47	68.38 \pm 31.18	13.47 \pm 11.49
	FN(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	243.26 \pm 12.91*	98.72 \pm 11.61	31.35 \pm 11.72	2.50 \pm 5.00
	HA (1.0mg/ml)	239.35 \pm 16.57*	103.57 \pm 13.27	33.33 \pm 6.52	0.00 \pm 0.00
	FN+HA	267.11 \pm 10.98**+	103.47 \pm 5.64*	11.42 \pm 3.30**+	0.00 \pm 0.00

Values represent the mean \pm S.D. of wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) for six determinations. FN : fibronectin, HA : hyaluronic acid, FN+HA : combined treatment of fibronectin (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and hyaluronic acid (1.0mg/ml)

* p<0.05, compared to control group

** p<0.05, compared to 0.01 mg/ml group

** p<0.05, compared to FN and HA alone groups

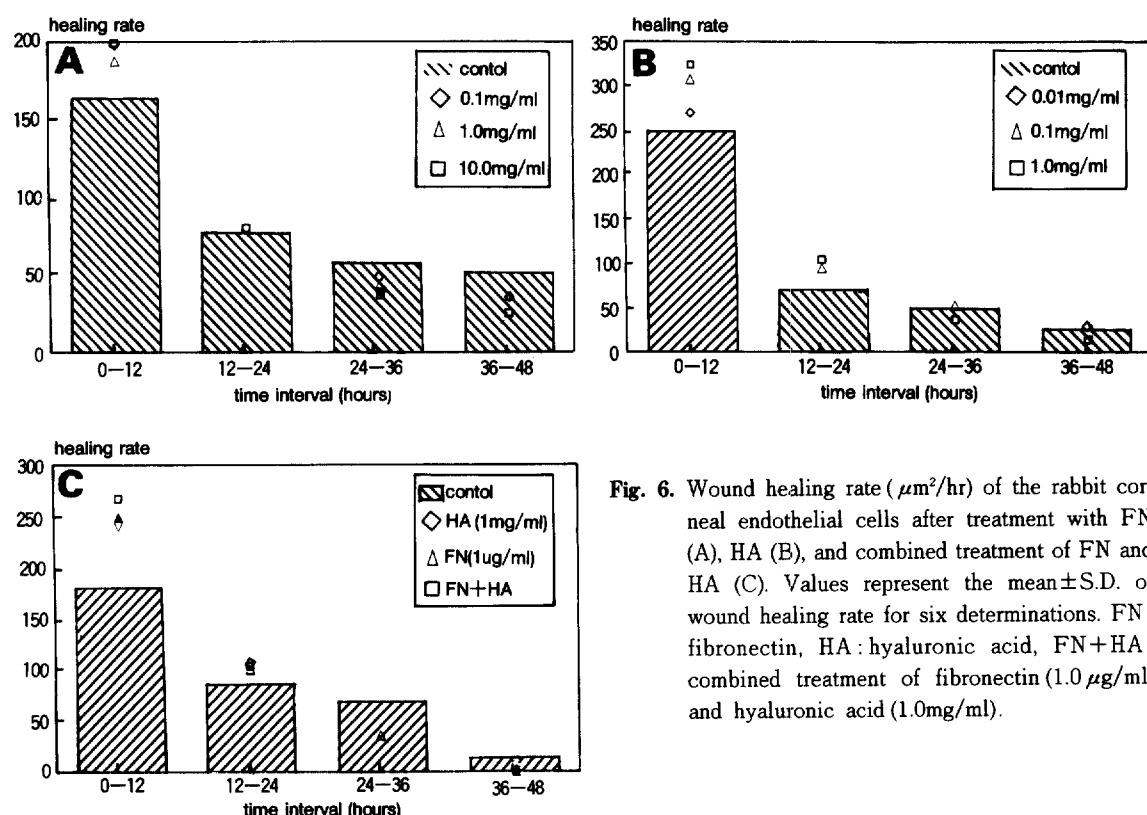


Fig. 6. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with FN (A), HA (B), and combined treatment of FN and HA (C). Values represent the mean \pm S.D. of wound healing rate for six determinations. FN : fibronectin, HA : hyaluronic acid, FN+HA : combined treatment of fibronectin (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and hyaluronic acid (1.0mg/ml).

Table 3. Effect of FN, HA, and several growth factors on ^3H -thymidine incorporation into the rabbit corneal endothelial cells.

agents	conc.	dpm	agent	conc.	dpm
FN	0.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14186 \pm 2510	EGF	0.0ng/ml	14736 \pm 2771
	0.1	14581 \pm 2186		0.1	79590 \pm 14766*
	1.0	15753 \pm 1517		1.0	423128 \pm 56968*
	10.0	14093 \pm 2537		10.0	373025 \pm 39573*
HA	0.00mg/ml	12263 \pm 2231	FGF	0.0ng/ml	12639 \pm 2636
	0.01	13306 \pm 2254		0.1	13775 \pm 2858
	0.10	11920 \pm 1253		1.0	12687 \pm 2278
	1.00	12196 \pm 1422		10.0	11442 \pm 2333
			TGF- β	0.0ng/ml	11686 \pm 1801
				0.1	12754 \pm 1332
				1.0	13965 \pm 2216
				10.0	13329 \pm 767

Values represent the mean \pm S.D. incorporation of ^3H -thymidine into cultured corneal endothelial cells for six determinations.

FN : fibronectin, HA : hyaluronic acid, EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β

* p<0.01, compared to control group

Table 4. Wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with EGF, FGF, and TGF- β respectively.

agents	conc.	12 hours	24hours	36 hours	48 hours
EGF	0.0ng/ml	42.33 \pm 3.48	66.12 \pm 7.95	83.58 \pm 8.54	95.01 \pm 8.22
	0.1	49.13 \pm 4.83*	78.70 \pm 3.78*	94.05 \pm 3.39*	100.00 \pm 0.00
	1.0	53.86 \pm 4.73*	82.35 \pm 4.31*	97.82 \pm 1.14*	100.00 \pm 0.00
	10.0	55.67 \pm 1.23**+	82.07 \pm 1.65*	96.41 \pm 1.48*	100.00 \pm 0.00
FGF	0.0ng/ml	56.16 \pm 8.08	81.69 \pm 11.04	94.46 \pm 5.37	99.90 \pm 0.25
	0.1	58.31 \pm 9.97	87.94 \pm 5.85	98.51 \pm 1.15	100.00 \pm 0.00
	1.0	66.06 \pm 8.23	92.99 \pm 8.18	98.72 \pm 2.03	100.00 \pm 0.00
	10.0	56.65 \pm 7.70	88.75 \pm 6.11	99.66 \pm 0.47*	100.00 \pm 0.00
TGF- β	0.0ng/ml	48.90 \pm 3.90	71.76 \pm 5.30	88.49 \pm 5.99	94.34 \pm 4.91
	0.1	53.03 \pm 3.05	78.61 \pm 3.35	93.31 \pm 2.70	98.37 \pm 2.00
	1.0	57.03 \pm 4.32*	78.66 \pm 1.98	93.19 \pm 2.33	98.70 \pm 1.13
	10.0	62.92 \pm 5.84**+	81.88 \pm 6.58*	94.52 \pm 5.78	98.02 \pm 3.21

Values represent the mean \pm S.D. percentages of wound healing area for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β

* p<0.05, compared to control group

** p<0.05, compared to 0.1 ng/ml group

로 의의있는 차이를 보이지 않았다(Table 3).

Fibronectin 및 hyaluronic acid의 병합효과 : 12시간 및 24시간에서 HA 및 FN군에서 각각 통계학적으로 유의성있는 치유면적의 증가가 있었고 병합투여시에는 단독투여에 비해 보다 더 효과가 있었다(Table 1, Fig. 5). 치유속도 역시 첫 12시간에서 가장 빨랐으며 대조군에서 비해 각각의 속

도도 증가되었고 단독투여보다 병합투여시 속도도 더 빨랐다(Table 2, Fig. 6).

EGF의 효과 : 모든 농도군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의성있는 치유면적의 증가가 있었고 36시간까지도 그 효과가 계속 유지되었다 (Table 4, Fig. 7). 치유속도는 첫 12시간에서 가장 빨랐으며 대조군에 비해 통계학적으로 유의하

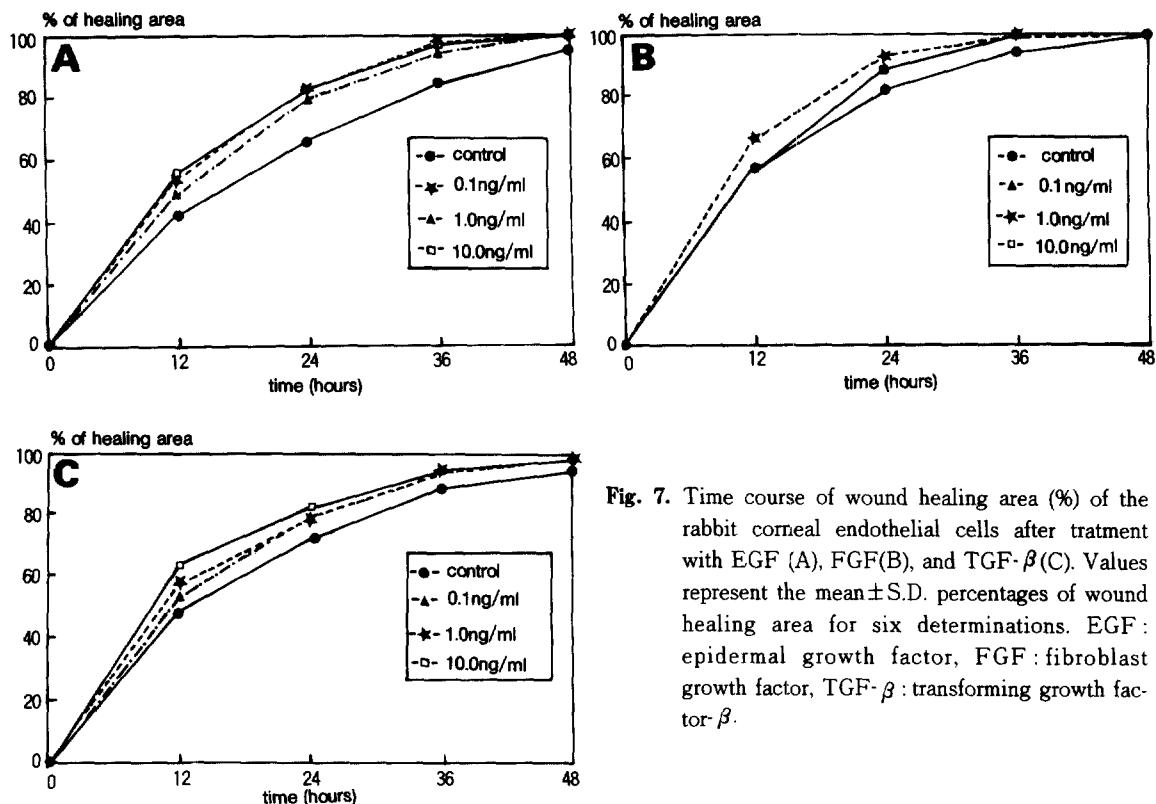


Fig. 7. Time course of wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with EGF (A), FGF(B), and TGF- β (C). Values represent the mean \pm S.D. percentages of wound healing area for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β .

Table 5. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with EGF, FGF, and TGF- β respectively.

agents	conc.	0-12 hrs	12-24 hrs	24-36 hrs	36-48 hrs
EGF	0.0ng/ml	146.20 \pm 12.14	82.13 \pm 17.81	60.37 \pm 10.07	39.63 \pm 18.67
	0.1	171.39 \pm 17.72*	103.10 \pm 8.93*	53.52 \pm 6.71	20.69 \pm 11.73*
	1.0	185.39 \pm 17.46*	98.00 \pm 8.61	49.93 \pm 12.48	7.57 \pm 3.95*
	10.0	197.92 \pm 5.65**	93.84 \pm 7.08	50.97 \pm 4.10	12.82 \pm 5.56*
FGF	0.0ng/ml	153.01 \pm 20.83	69.68 \pm 12.30	34.91 \pm 16.42	14.86 \pm 14.27
	0.1	161.57 \pm 27.60	82.13 \pm 16.12	29.35 \pm 13.92	4.12 \pm 3.16
	1.0	180.09 \pm 22.63	78.89 \pm 18.49	13.61 \pm 8.51	0.00 \pm 0.00*
	10.0	164.29 \pm 23.06	93.00 \pm 17.86	31.61 \pm 18.01	1.00 \pm 1.22*
TGF- β	0.0ng/ml	150.39 \pm 11.43	70.33 \pm 7.28	51.06 \pm 10.46	18.06 \pm 11.44
	0.1	152.43 \pm 11.80	71.47 \pm 8.40	45.94 \pm 15.26	11.78 \pm 8.38
	1.0	163.77 \pm 15.20	61.92 \pm 6.71	41.67 \pm 6.93	15.74 \pm 5.55
	10.0	179.33 \pm 16.64**	54.06 \pm 6.92*	36.00 \pm 3.56*	10.00 \pm 7.97

Values represent the mean \pm S.D. of wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β

* $p < 0.05$, compared to control group

** $p < 0.05$, compared to 0.1 ng/ml group

게 증가되었고 다른 시간대에서는 대조군과 별 차이를 볼 수 없었다(Table 5, Fig. 8). DNA합성에는 그 효과가 뚜렷하여 모든 농도에서 혼격한 증

가가 있었으며 대조군에 비해 약 5-28배의 합성 증가를 보였다(Table 3).

FGF의 효과 : 10.0ng/ml군에서 36시간째 치유

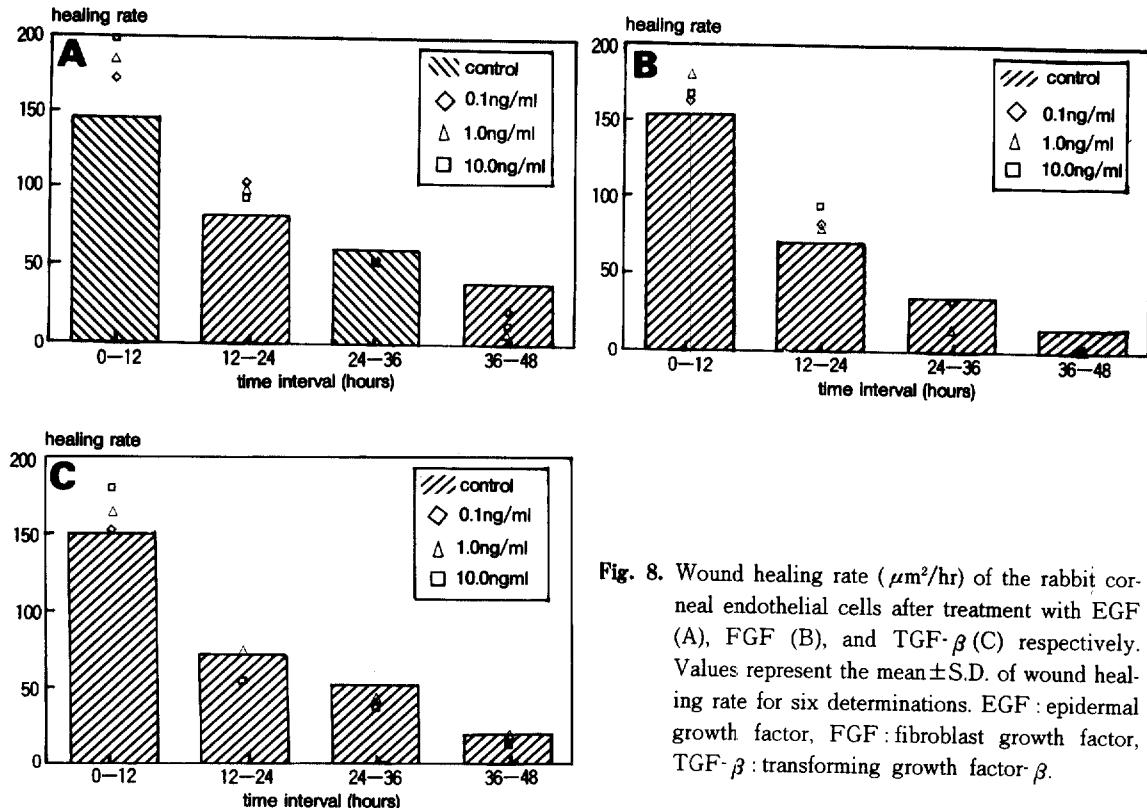


Fig. 8. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after treatment with EGF (A), FGF (B), and TGF- β (C) respectively. Values represent the mean \pm S.D. of wound healing rate for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β .

면적의 증가가 있었지만 전반적으로, 특히 다른 약제와는 달리 12시간대에 대조군에 비해서는 약간씩 증가하는 경향을 보였지만 통계학적인 의의가 없었다(Table 4, Fig. 7). 치유속도는 첫 12시간대가 가장 빨랐으나 대조군에 비해 통계학적인 의의는 없었다(Table 5, Fig. 8). DNA합성도 역시 대조군과 의의 있는 차이는 없었다(Table 3).

TGF- β 의 효과 : 12시간대 1.0, 10.0ng/ml군에서, 24시간대는 10.0ng/ml군에서 통계학적으로 의의 있는 치유면적의 증가가 있었고(Table 4, Fig. 7) 치유속도는 10.0ng/ml군에서 첫 12시간에 증가되었고 그 다음에는 오히려 감소되었다(Table 5, Fig. 8). 그러나 DNA합성은 모든 농도군에서 대조군보다 약간씩 증가되었으나 통계학적 의의는 없었다(Table 3).

EGF 및 TGF- β 의 병합효과 : EGF, TGF- β 의 단독사용군에서는 통계학적으로 의의 있는 치유면적의 증가가 있었지만 병합투여시 단독투여와 비교해 상승효과도 없었고 또한 억제효과도 없었다

(Table 6, Fig. 9). 치유속도 역시 각각의 군에서는 속도가 증가되었지만 마찬가지로 병합투여로 인한 상승효과 및 억제효과가 없었다(Table 7, Fig. 10). DNA합성에서는 TGF- β 는 다소 증가하였지만 통계학적 의의는 없었고 EGF는 15배 가량 증가하였으나 병합사용시 오히려 TGF- β 가 혼격히 증가된 EGF의 세포증식효과를 감소시키는 결과를 보였다($p < 0.01$)(Table 8, Fig. 11).

FGF 및 TGF- β 의 병합효과 : 12시간대에서 TGF- β 군과 병합투여군에서 대조군에 비해 통계학적으로 의의 있는 치유면적의 증가가 있었지만, 단독사용시에 비해 병합사용시의 치유면적은 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 6, Fig. 9). 치유속도에서도 마찬가지로 병합사용시의 상승효과나 하강효과는 없었으며 단독사용시에도 통계학적으로 의의 있는 증가는 없었다(Table 7, Fig. 10). DNA합성은 TGF- β 단독사용시에 약간 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었고 병합사용시에 FGF나 TGF- β 가 서로의 작용에 영향을 주지

Table 6. Wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after the combined treatment of growth factors.

agents conc.	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours
control	49.76±2.87	79.65±4.09	90.72±2.94	100.00±0.00
EGF (1.0ng/ml)	55.57±1.49*	90.52±2.35*	99.89±0.26*	100.00±0.00
TGF- β (1.0ng/ml)	54.74±4.58*	83.39±3.61 [†]	96.12±1.89** [†]	100.00±0.00
EGF+TGF	56.66±2.67*	91.38±2.63*	99.95±0.12*	100.00±0.00
control	51.64±2.36	82.23±3.74	92.90±3.89	100.00±0.00
FGF(1.0ng/ml)	52.51±2.58	85.00±1.95	97.71±3.78	100.00±0.00
TGF- β (1.0ng/ml)	57.66±2.40*	85.99±1.83	96.21±2.05	100.00±0.00
FGF+TGF	56.67±2.12*	84.30±2.57	98.87±2.67	100.00±0.00

Values represent the mean±S.D. percentages of wound healing area for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β , EGF+TGF : combined treantent of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml), FGF+TGF : combined treatnet of FGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml)

* p<0.05, compared to control group

[†] p<0.05, compared to EGF and EGF+TGF groups

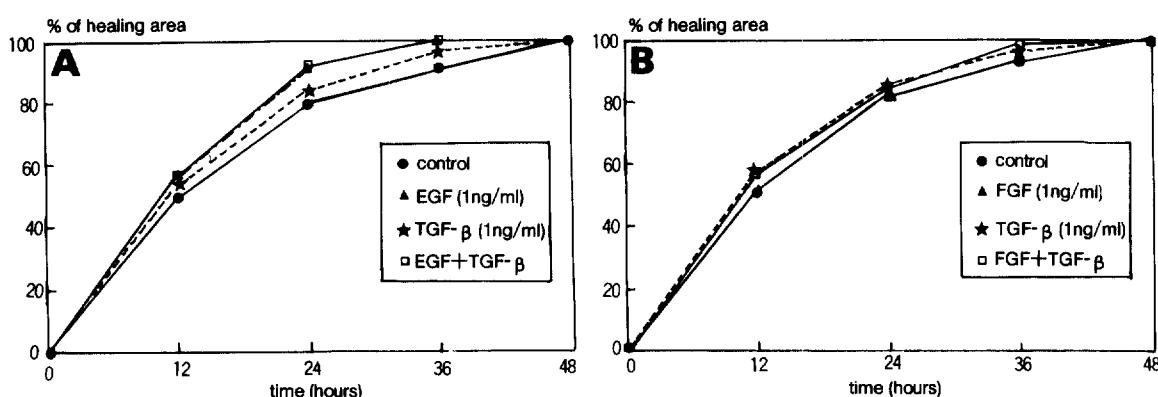


Fig. 9. Time course of wound healing area (%) of the rabbit corneal endothelial cells after combined treatment with EGF and TGF- β (A), FGF and TGF- β (B). Values represent the mean±S.D. percentages of wound healing area for six determinations. EGF : epidermal growth factor. FGF : fibroblast growth factor. TGF- β : transforming growth factor- β . EGF+TGF- β : combined treatment of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml). FGF+TGF- β : combined treatment of FGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml).

는 않았으며 대조군과도 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 8, Fig. 11).

고 졸

생체 실험에서 각막내피세포의 실험적 창상치유과정에 관한 연구는 창상제작후 광시야 경면현미경으로 경시적인 관찰을 하게 되는데 이때 내피세포의 창상제작법으로는 각막상피를 통한 냉동용고법²⁷⁾, 주사침을 전방내삽입하여 나일론사를 이용 직접 내피세포에 상처를 만드는 방법²⁸⁾ 등이 이용되는데 전자의 경우 창상초기의 상피세포장

애나 실질의 혼탁으로 경면현미경관찰이 적당치 못하고 후자의 경우는 창상의 정도가 적어서 상피세포나 각막실질이 깨끗하므로 경면현미경 관찰이 용이하다. 그러나 일정한 크기의 창상제작이 곤란하여 분석방법에 대한 연구가 필요하고 또한 생체 실험시 전방내 약제의 일정한 농도투여가 곤란하여 정량적분석이 힘들어 앞으로 해결해야 할 문제점이다²⁵⁾. 시험관 실험에서의 내피세포의 창상제작법으로는 배양된 각막내피세포위에 glass needle을 이용하여 창상을 만드는 방법²⁹⁾, filter paper를 이용하는 방법³⁰⁾등이 이용되었었다. 본 실험은 Miyata²⁵⁾가 개발한 장치를 이용하여 시험

Table 7. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after the combined treatment of growth factors.

agents conc.	0-12 hrs	12-24 hrs	24-36 hrs	36-48 hrs
Control	131.20 ± 8.88	78.66 ± 8.67	29.21 ± 3.58	24.54 ± 8.02
EGF (1.0ng/ml)	147.59 ± 7.33*	92.78 ± 6.89*	24.86 ± 5.39	0.28 ± 0.62*
TGF- β (1.0ng/ml)	150.42 ± 10.83*	78.75 ± 6.85*	35.14 ± 6.24*	10.79 ± 5.52**
EGF + TGF	154.54 ± 9.54*	94.54 ± 7.22*	23.38 ± 7.03	0.14 ± 0.31*
Control	155.32 ± 8.52	91.94 ± 8.33	32.22 ± 8.14	21.53 ± 6.61
FGF(1.0ng/ml)	156.02 ± 20.93	95.93 ± 7.79	37.45 ± 4.70	6.81 ± 2.60*
TGF- β (1.0ng/ml)	159.79 ± 7.89	85.23 ± 8.55	32.87 ± 4.00	9.44 ± 2.67*
FGF + TGF	163.95 ± 7.88	91.44 ± 8.09	35.74 ± 4.40	2.92 ± 4.34**

Values represent the mean ± S.D. of wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β , EGF + TGF : combined treatment of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml), FGF + TGF : combined treatment of FGF(1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml).

* p<0.05, compared to control group

* p<0.05, compared to EGF and EGF+TGF- β groups

* p<0.05, compared to TGF- β group

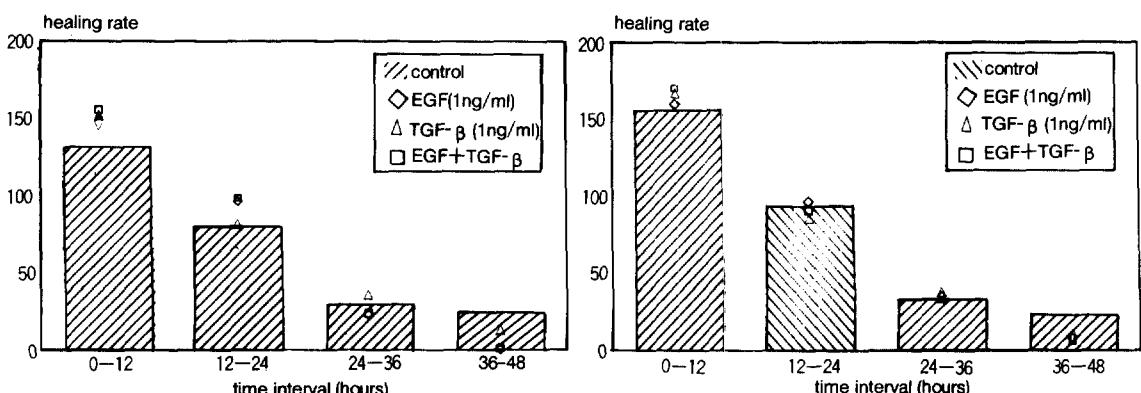


Fig 10. Wound healing rate ($\mu\text{m}^2/\text{hr}$) of the rabbit corneal endothelial cells after combined treatment with EGF and TGF- β (A), FGF and TGF- β (B). Values represent the mean ± S.D. of wound healing rate for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β , EGF + TGF- β : combined treatment of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml), FGF + TGF- β : combined treatment of FGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml).

관 실험에서 보다 쉽고 간편하게 일정한 크기의 창상제작이 가능하였고 경시적 관찰을 위해 현미경하에서 사진을 찍어 정량적 분석이 가능하였다.

Fibronectin은 분자량 440,000달톤의 혈장 및 세포의 기질에 존재하는 당단백질로서 세포와 교원질에 결합하는 능력이 있으며 세포의 유착과 섬유아세포가 기질에 부착하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 세포의 확산 중개역할, 세포의 분화 및 형태발생학적 운동성의 증가, 식작

용을 향상시키는 능력이 있어 혈장내에서 비특이적인 opsonin으로서의 기능도 가지고 있다^[10]. Fibronectin이 특히 많이 분포되어 있는 곳은 내피세포의 basal lamina와 그외의 다른 limiting lamina이다^[31]. 사람의 정상각막에는 각막상각막의 basal lamina, 각막실질, Descemet씨막과 내피세포에 분포되어 있다^[30-36]. 각막상각막의 창상치유과정에서 fibronectin은 각막상각막의 이동을 촉진시켜 창상치유를 증진시킨다고 하고 임상적

Table 8. Effect of TGF- β in the presence of either EGF or FGF on ^3H -thymidine incorporation into the rabbit corneal endothelial cells.

single treatment	^3H -thymidine incorporation		dpm
	dpm	combined treatment	
Control	11944 ± 1860		
EGF (1.0ng/ml)	169002 ± 35382*	EGF + TGF- β	102931 ± 17199**
TGF- β (1.0ng/ml)	13865 ± 1568		
FGF (1.0ng/ml)	10703 ± 1751	FGF + TGF- β	14875 ± 3209*

Values represent the mean ± S.D. of incorporation of ^3H -thymidine into cultured rabbit corneal endothelial cells for six determinations.

EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF- β : transforming growth factor- β , EGF + TGF- β : combined treatment of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml), FGF + TGF- β : combined treatment of FGF(1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml)

* p<0.01, compared to control group

† p<0.01, compared to EGF alone group

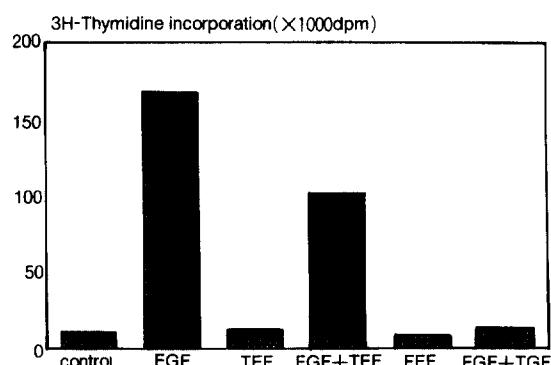


Fig. 11. Effect of TGF- β in the presence of either EGF or FGF on ^3H -thymidine incorporation into the rabbit corneal endothelial cells. Values represent the mean ± S.D. incorporation of ^3H -thymidine into cultured rabbit corneal endothelial cells for six determinations. EGF : epidermal growth factor, FGF : fibroblast growth factor, TGF : transforming growth factor- β , EGF + TGF : combined treatment of EGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml), FGF + TGF : combined treatment of FGF (1.0ng/ml) and TGF- β (1.0ng/ml).

으로 fibronectin이 각막상피세포의 치유에 효과가 있음은 여러 연구에서 입증이 되고 있다^{11~16}. Scott 등¹⁷은 fibronectin이 각막내피세포의 부착을 증개해 주고 배양시 성장을 증진시킨다고 하였는데 각막내피세포에도 fibronectin이 존재하는 것으로 보아 내피세포의 창상치유에도 관여할 것으로 짐작할 수 있다. 본 실험에서는 fibronectin이 토끼

각막내피세포의 창상치유에 확실한 효과가 있었고 또한 농도가 높을수록 치유가 빠름을 알 수 있었다. 그러나 DNA합성도는 모든 농도군에서 의의있는 세포증식의 효과는 없었다.

현재 임상적으로는 hyaluronic acid를 안내수술 시 특히 인공수정체 삽입술시에 각막내피세포를 보호하여 세포의 소실을 방지하기 위해 전방내에 주입하여 사용하고 있다. 이것은 점탄성의 hyaluronic acid가 기계적인 cushioning 역할을 하여 내피세포가 수술기구나 인공수정체와의 직접 접촉하는 것을 막아주기 때문이다. 최근 Smedsrød 등³⁷과 Laurent 등³⁸은 간 sinusoids의 내피세포에서 hyaluronic acid수용체를 발견했는데 간내피세포는 circulating hyaluronic acid 대사에 중요한 역할을 하고 hyaluronic acid수용체가 혈액에서 hyaluronic acid 농도와 세포내이입을 조정한다고 하였다. 현재 안구의 전방내에도 hyaluronic acid가 존재하며 각막내피세포도 hyaluronic acid수용체를 가지고 있다고 알려져 있다^{39,40}.

Hyaluronic acid는 linear polysaccharide로써 alternating glucuronic acid와 N-acetyl-glucosamine residues로 구성되고 다른 proteoglycan과 상호작용하여 모든 조직의 세포외 기질에 안정성과 탄력성을 제공한다⁴⁸. 또한 조직의 수화와 interstitial compartment내에서 물질의 이동을 조절한다. Hyaluronic acid는 세포성장이 활발한 곳에 존재하는 수용체에 결합하는데 수용체는 세포주기의 해리과정과 관련이 있다고 한다⁴¹. 일반적으로

hyaluronic acid 합성은 유사분열전에 일어나서 분열하는 세포를 하충기질로부터 해리시켜서 세포 이동을 하게 하고⁴²⁾ 그리고 hyaluronic acid 수용체는 상피세포가 성숙되고 이동함에 따라 점점 소실된다⁴¹⁾. 또 외인성 hyaluronic acid를 국소투여하니까 hamster 쥐의 볼주머니의 조직수복장소에서 미세순환관류를 증진시키고 창상에 의한 FITC-dextran의 일출을 감소시키며 창상치유를 촉진시킨다는 보고도 있다¹⁸⁾. Yue 등⁴³⁾은 배양한 사람의 각막내피세포에서 hyaluronic acid(1mg/ml)의 세포증식효과는 없었다고 보고하였다. 본 실험에서도 모든 농도에서 DNA 합성의 증가는 없었으나 1mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 의의 있게 빠른 창상치유효과가 있었는데 이는 hyaluronic acid가 세포이동을 용이하게 하여서 창상치유를 촉진시킨다고 할 수 있다. 또한 fibronectin과 같이 투여하였을 경우 서로의 작용이 방해 되지 않으며 창상치유를 더 촉진시킬 수 있었다.

EGF는 3개의 disulfide bond로 결합된 53개의 아미노산의 단량체 polypeptide(MW 6,045kDa)으로써⁴⁴⁾ 처음 Cohen 등⁴⁵⁾에 의해 생쥐 악하선에서 분리되었는데 안검개방과 절치의 맹출을 유발한다고 하였다. EGF는 타액과 소변에서는 많이 검출되고 혈장에서는 적다. 사람에서는 소변, 타액, 유액에서 검출되며 혈장에는 2~4ng/ml의 소량이 존재한다. 생쥐나 사람의 EGF는 구조적으로는 다르지만 생물학적 활동도는 거의 비슷하다⁴⁶⁾. 사람 EGF의 아미노산 순서는 위산분비를 억제하는 beta urogastrone과 같다. 그래서 EGF는 위산분비를 억제하는 작용도 한다⁴⁷⁾. EGF는 눈에도 존재하는데 눈물에서는 0.7~8.1ng/ml, 방수에서는 0~1.4ng/ml의 농도로 검출되었다^{48, 49)}. 6mm각막 절제술로 각막에 상처를 주면 누선의 EGF를 증가시킨다는 보고도 있다⁵⁰⁾. 그러나 연구내 EGF의 정확한 원천은 잘 모르고 있다. EGF는 특이적이고 높은 친화력의 세포면 수용기와 상호 작용한다. EGF-수용기 복합체의 반감기는 membrane preparation에서 약 20분이고 가역적이다. EGF는 이러한 특별한 세포 수용체(175kDa)를 통해서 작용하여 표피세포 및 많은 다른세포의 증식과 분화를 자극한다고 알려져 있는데¹⁹⁾ 눈에서는 각막, 결

막 및 수정체의 상피와 각막 내피세포, 그리고 홍채의 후색소층에 세포수용체가 존재한다^{51~54)}. Gospodarowicz 등⁵⁵⁾은 사람의 EGF는 소의 각막내피세포를 증식시키고 세포수가 배로 되는 시간을 절반으로 감소시키며 최대효과는 10ng/ml의 농도에서 관찰되었고 0.1ng/ml의 낮은 농도에서도 효과가 있었고 세포수의 증가뿐 아니라 DNA 합성도 증가시킨다고 하였다. 또한 EGF는 내피세포의 형태를 다각형에서 방추형으로 변화시키고 내피세포의 이동을 증진시킨다고 하였다⁵⁰⁾. 본 실험에서도 사용한 모든 약제들에서 창상치유 과정동안 내피세포의 모양이 방추형으로 변하고 길어졌지만 특히 EGF의 경우 그 정도가 더 활발함을 관찰할 수 있었다. Yoshida 등⁵¹⁾은 각막전체를 잘라서 장기배양(organ culture)할 때 EGF로 각막내피세포를 처리하니까 창상에 대해 세포의 이동이 향상되고 상처부위의 치유시간을 단축시킨다고 하였다. 그러나 EGF는 우각막내피세포에 대해서는 유사분열을 촉진시키나 우혈관내피세포에는 그렇지 못하다. 왜냐하면 우혈관내피세포에는 EGF에 대한 수용체자리가 없기 때문이다^{8, 55)}. 본 실험에서는 0.1, 1.0, 10.0ng/ml 등 모든 농도의 EGF가 가토각막내피세포의 창상치유에 의의 있는 촉진효과가 있었고 또한 모든 농도군에서 DNA 합성의 증가가 있었다.

FGF는 Gospodarowicz²⁰⁾, Gospodarowicz²¹⁾에 의해 뇌하수체에서 처음 분리되었고 계속해서 뇌에서도 분리되었다^{22, 23)}. FGF는 염기성과 산성의 2개의 형태로 존재하며 여러종류의 중배엽과 신경외배엽에서 기원한 세포, 특히 큰 혈관 또는 모세혈관의 내피세포의 증식과 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다⁵⁶⁾. 이의 작용기전은 세포증식, 유전자표현뿐 아니라 형태발생학적 조직상호작용을 조절하는 세포의 기질의 기전과 밀접한 관계가 있다고 한다⁵⁶⁾. 산성형은 염기성형과 그 생물학적 효과는 같지만 세포형에 따라 30~100배 정도 효능이 적다⁵⁷⁾. 산성 FGF는 분자량이 15~15.5kDa이고^{58, 59)}. 염기성 FGF는 분자량이 15~16KD_a인 염기 polypeptide이다^{60, 61)}. 망막과 뇌하수체에서 발견되는 주된 growth factor는 염기성 FGF이다^{60~62)}. 현재까지 염기성 FGF는 대개 새로운 세포

균주, 특히 혈관 및 각막내피세포등을 발육시키는 데 사용되어져 왔다^{63~66)}. 또 이 FGF가 배양 수정체상피세포뿐 아니라 홍채세포에도 강력한 유사분열물질로 작용한다고 하였다^{53,67)}. 염기성 FGF는 platelet derived growth factor(PDGF)나 TGF- β 와는 달리 창상치유과정에 관여하는 모든 세포의 증식을 자극한다. 즉 모세혈관내피세포^{68,69)} 혈관평활근⁷⁰⁾, 섬유아세포⁷¹⁾등의 증식을 자극한다. 또한 FGF는 가토각막, 병아리의 융모요막(chorioallantoic membrane) 또는 hamster쥐의 불주머니등에서 혈관형성을 촉진시키고^{60,72~74)} 1977년 Gospodarowicz 등⁸⁾은 배양된 가토각막내피세포에 대한 FGF 및 EGF의 증식효과에 관한 보고에서 EGF는 FGF보다도 낮은 농도에서 유사분열을 촉진시킨다고 하였다. 즉, EGF는 0.01ng/ml에서도 효과가 있었으며 10ng/ml이상에서는 비슷한 효과를 보였고 반면 FGF는 0.1ng/ml에서 약간 mitogenic했고 100ng/ml에서 최적의 효과가 있었다고 하였다. 이는 Yue 등⁴³⁾의 결과와 유사하였으나 Yue의 실험에서는 사람의 각막내피세포에 있어서는 거의 효과가 없었다고 하였다. 그렇지만 세포증식율과 ³H-thymidine의 병합은 EGF보다 FGF에서 약간 더 높았다⁸⁾. 그런데 혈관내피세포에 대해서는 FGF는 유사분열을 촉진시키는 반면에 EGF는 거의 효과가 없다고 하였다^{75,76)}. 본 실험에서는 0.1, 1.0, 10.0ng/ml 농도의 FGF를 사용하였는데 모든 농도에서 대조군보다 약간씩 치유가 촉진되었고 1.0ng/ml군에서 첫 12시간의 치유면적이나 치유율이 가장 높았으나 통계학적 의의는 없었다. 또한 DNA합성도 의의있는 증가를 관찰할 수 없었다. 이는 본 실험에 사용한 FGF의 농도가 낮았기 때문이라고 생각된다. 염기성 FGF는 세포의 형태와 성장양식에도 영향을 미치는데 사람의 피부의 섬유아세포에 FGF를 투여하니 세포가 길고 가는 돌기를 가지며 극히 늘어짐이 관찰되었다고 하였는데⁷⁷⁾ 이는 본 실험에서도 관찰할 수 있었다. 또한 EGF와 FGF는 세포분열을 증가시킬 뿐 아니라 세포의 이동을 촉진시키는 효과도 있다고 하였다⁷⁷⁾.

TGF- β 는 disulfide결합을 하는 동일한 112개의 아미노산 아단위로 구성된 이량체의 polypeptide

이다. 분자량은 25kDa이며 생물학적으로 활동적인 분자이며 이량체구조가 파괴되면 활성이 소실된다. TGF- β 는 현재까지 4가지 종류가 알려져 있는데 원래 사람의 혈소판에서 정제된 것을 TGF- β 1이라고 하고 돼지혈소판과 우골에서 정제된 것은 TGF- β 2이며 사람, 돼지, 닭의 cDNA cloning에서 발견된 TGF- β 3, 닭의 연골세포에서 순제(clone)된 TGF- β 4등이다. 그러나 TGF- β 1과 TGF- β 2는 그 구조나 기능이 아주 유사하고 TGF- β 3나 TGF- β 4는 유용성의 결여로 대개 TGF- β 1을 주로 사용하고 있고²⁴⁾ 본문에서의 TGF- β 도 TGF- β 1을 지칭하는 것이다. TGF- β 는 세포의 기질의 합성에 탁월한 효과가 있고 교원질, fibronectin, proteoglycan의 발현, integrin발현 등을 증가시키고 또한 상피세포, 내피세포, 임파세포 및 골수세포등의 성장을 억제하고 세포외기질을 변질시키는 collagenase같은 단백분해효소의 합성을 감소시키고 plasminogen activator inhibitor type I 같은 단백분해효소 억제제의 표현을 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

비록 Muller 등⁹⁾은 TGF- β 가 우각막내피세포의 증식을 억제한다고 하였지만 본 실험의 세포증식도실험에서는 대조군에 비해 DNA합성이 오히려 약간 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 세포수를 세어 증식효과를 관찰한 Plouet 등⁷⁸⁾의 실험결과는 1ng/ml이하의 농도에서는 증진시키고 그 이상의 높은 농도에서는 억제한다고 하였다. 본 실험에서 인위적인 창상제작후 치유면적을 측정하여 봤을때는 1.0 및 10ng/ml에서 의의있는 창상치유효과가 있었다. 이는 TGF- β 가 일반적으로 세포의 성장과 증식을 억제한다고 하지만 반면에 교원질, fibronectin 및 integrin 등의 합성을 증가시키는 작용도 하므로 이를 물질이 각막내피세포의 이동 및 확산을 촉진시켜 빠른 창상치유가 일어났다고 생각된다.

최근 TGF- β 가 FGF의 bioactivity를 궁정적으로 또는 부정적으로 조절한다는 보고가 많이 있다. 궁정적인 조절의 예로는 FGF에 의한 초기 태아의 심근형성과 osteoblast증식에 대한 효과에 대한 것이고 부정적인 예로는 큰 혈관이나 모세혈관의 내피세포에 대한 FGF의 성장 촉진효과를 억

제하고 FGF의 angiogenic activity를 억제한다는 것이다. 또한 다른 종류의 내피세포도 역시 TGF- β 가 FGF의 효과를 억제하는 것으로 보고되어 있다^{9,79)}. 그러나 Plouet 및 Gospodarowicz⁷⁸⁾에 의하면 각막내피세포에 있어서는 TGF- β 가 FGF의 효과 및 EGF의 효과를 증진시킨다고 하였다. 그래서 본 실험에서도 TGF- β 가 EGF나 FGF의 효과에 어떠한 영향을 미치는지를 알기위해 병합투여를 하여 보았는데 Plouet의 결과와는 반대로 TGF- β 가 EGF에 의한 DNA합성도 증가효과를 오히려 감소시켰고, FGF와 같이 사용한 경우에는 서로 영향을 미치지 못하였다. 그러나 창상치유과정을 관찰한 실험에서는 EGF와 TGF- β 를 동시에 투한 경우에 통계학적 의의는 없었지만 EGF나 TGF- β 를 단독사용한 경우보다 약간씩 치유가 빨리 되었는데 DNA합성도실험때와는 달리 TGF- β 가 EGF의 효과를 감소시키지 않은 것은 TGF- β 자체의 창상치유에 대한 효과로 인한 결과라고 생각되며 FGF와 TGF- β 의 겸용의 경우는 FGF나 TGF- β 의 단독 사용군과 비교해 별 변화가 없어 서로 영향을 주지 않으며 DNA합성도실험의 결과와 일치하였다.

토끼각막내피세포는 Gospodarowicz 등⁸⁾과 Perlman 및 Baum⁸⁰⁾에 의하면 분리효소의 첨가로 실험실상에서 계속적으로 자랄 수 있고 Descemet씨막과 유사한 세포외 기질을 생산하여 다각형의 형태를 나타낸다고 한다. Raymond 등⁸¹⁾도 배양된 가토각막내피세포의 형태는 다각형이었고 EGF투여시는 1.0ng/ml의 농도에서도 그 모양이 방추형으로 변하였다고 하였다. 그러나 일단 창상이 완전히 치유가 되면 내피세포는 창상제작전의 원래 모양을 정하게 된다. 비록 EGF로 처리한 세포에 기능적인 변화가 있는지는 더 연구를 해야 하겠지만 길어지고 방추형으로 변한 세포들이 가토각막에 가한 냉동손상후에나⁸²⁾ scratch type의 손상후에도 보이는데 길어진 세포는 손상시에 반응하여 이동하는 세포와 관련이 있는 것으로 보인다²⁸⁾. 아마 시험관실험에서의 EGF에 대한 반응과 내피창상치유시 결손부위를 메꾸게 조절하는 내적인 신호에 대한 생체반응은 유사한것 같다. 본 실험에서도 배양된 가토각막내피세포의 형태는 다각

형이었고 창상제작후 치유과정에서 세포는 창상 중앙을 향하여 길어지면서 방추형으로 변하였다가 완전히 창상이 치유된 후에는 다시 다각형으로 되었다.

내피세포의 모양은 세포가 자라고 있는 세포외 기질에 의해서도 그 모양에 영향을 받는다. 최근 Hsieh 및 Baum⁸³⁾은 토끼각막내피세포가 섬유아세포 기원의 기질에서 자랄때는 길어지지만 내피세포기원의 기질에서 자랄 때는 다각형으로 유지가 된다고 보고하였다. 세포모양은 세포외 기질에서의 fibronectin의 분포와 방향정위에 달려있다. 세포가 스스로 합성한 기질에서 자란다면 EGF에 의해 모양이 바뀌는 것은 EGF가 세포외 기질에서 새로이 합성된 fibronectin의 종주섬유에 대한 방향정위를 유발하여 그렇다고 할수 있다⁸¹⁾. 세포모양의 방추형으로의 변화는 phosphoinositol 경로와 protein kinase-C 활성화에 의한다는 보고가 있는데⁸⁴⁾ 다각형의 세포모양을 유지하는데 관계있는 것으로 보이는 prostaglandin E₂가 cyclooxygenase inhibitor, 즉 indomethacin에 의해 억제될 수 있어서 세포가 길어진다고 한다^{84,85)}.

Kay 등^{86,87)}은 각막내피세포의 모양의 변화와 함께 교원질합성의 변화에 대해서도 보고를 했는데 배양된 토끼각막내피세포는 계속되는 계대배양에 따라 점점 편편해지고 커진다고 하였으며 또한 type IV 교원질의 표현형합성은 유지를 하나 그 정도는 매우 낮아진다고 하였다. 그리고 실험적으로 만든 각막후면 섬유성막에서 배양한 각막내피세포는 섬유아세포의 모양을 띠고 있으며 주로 type I 교원질을 합성하게 된다고 하였다. 그러므로 실제로 생체의 상황조건과 유사하게 실험을 하기 위해서는 몇번씩 계대배양하는 것 보다는 일차 배양한것을 사용하는 것이 좋다고 생각된다.

본 실험의 결과로 보아 fibronectin, hyaluronic acid 그리고 TGF- β 는 세포이동을 향상시켜 각막내피세포의 창상치유를 촉진시키고 EGF는 세포이동뿐 아니라 세포증식을 통하여 창상치유를 촉진시킨다고 할 수 있다. 이러한 약제들이 임상적으로 각막내피세포의 치유나 생존에 효과적인지 또는 어떠한 형태로든 부작용이 유발될지는 생체실험에서 연구되어야 하겠지만 적어도 각막보

존시 내피세포생존을 증진시키는데는 유용할 것이라고 생각되며 향후 안내수술등에서 관류액에 섞어서 사용할 수 있게 되기를 기대하는 바이다.

REFERENCES

- 1) Dohlman CH : *Physiology of the cornea*. In : Smolin G, Thoft RA, ed. *The cornea*. 2nd ed, Boston/Toronto, Little, Brown and Company, 1987, pp. 3-14.
- 2) Lim J : *Na⁺ transport across the rabbit corneal endothelium*. *Curr Eye Res* 1 : 255-258, 1981.
- 3) Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM : *Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium*. *Ophthalmol* 91 : 1129-1134, 1984.
- 4) Capella JA : *Regeneration of endothelium in diseases and injured cornea*. *Am J Ophthalmol* 74 : 810-817, 1972.
- 5) Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL : *Human corneal endothelial layer repair during organ culture*. *Arch Ophthalmol* 94 : 1791-1796, 1976.
- 6) Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF : *Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age*. *Curr Eye Res* 4 : 671-678, 1985.
- 7) Yoshida A, Laing RA, Joyce NC, Neufeld AH : *Effects of EGF and indomethacin on rabbit corneal endothelial wound closure in excised corneas*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 1991-1996, 1989.
- 8) Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR : *Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors*. *Exp Eye Res* 25 : 75-89, 1977.
- 9) Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhnen P, Birchmeier W : *Inhibitory action of transforming growth factor-β on endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 5600-5604, 1987.
- 10) Pearlstein E, Gold LI, Garcia-Pardo A : *Fibronectin : A Review of its structure and biological activity*. *Molecular & Cellular Biochem* 29 : 103-128, 1980.
- 11) Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Nishibayashi C, Manabe R : *Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patients plasma*. *Jpn J Ophthalmol* 26 : 416-424, 1982.
- 12) Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T : *Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 205-211, 1987.
- 13) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R : *Fibronectin : A new therapy for corneal trophic ulcer*. *Arch Ophthalmol* 101 : 1046-1048, 1983.
- 14) Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, Zagachin LM, Colvin RB : *Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers*. *Am J Ophthalmol* 104 : 494-501, 1987.
- 15) 김기산, 남문진, 오준섭, 박당운, 김인산, 조준승 : 지속성 각막상피결손 환자에서 autologous fibronectin 국소첨안의 효과. *한안지* 30 : 29-36, 1989.
- 16) Kim KS, Oh JS, Kim IS, Jo JS : *Topical fibronectin treatment in persistent corneal epithelial defects and corneal ulcers*. *Korean J Ophthalmol* 4 : 5-11, 1990.
- 17) Scott DM, Murray JC, Barnes MJ : *Investigation of the attachment of bovine corneal endothelial cells to collagen and other components of the subendothelium : Role of fibronectin*. *Exp Cell Res* 144 : 472-478, 1983.
- 18) King SR, Hickerson WL, Proctor KG : *Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing*. *Surgery* 109 : 76-84, 1991.
- 19) Tripathi RC, Raja SC, Tripathi BJ : *Prospects for epidermal growth factor in the management of corneal disorders*. *Surv Ophthalmol* 34 : 457-462, 1990.
- 20) Gospodarowicz D : *Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth*. *Nature (London)* 249 : 123-127, 1974.
- 21) Gospodarowicz D : *Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary*. *J Biol Chem* 250 : 2515-2520, 1975.
- 22) Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G : *Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain*. *J Biol Chem* 253 : 3736-3743, 1978.
- 23) Gospodarowicz D, Lui GM, Cheng J : *Purification in high yield of brain fibroblast growth factor by preparative isoelectric focusing at pH 9.6*. *J Biol Chem* 257 : 12266-12278, 1982.
- 24) Lyons RM, Moses HL : *Review, Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation*. *Eur J Biochem* 187 : 467-473, 1990.
- 25) Miyata K : *培養細胞を用いた角膜内皮創傷治癒モデル*. *あたらしい眼科* 6 : 1657-1666, 1989.
- 26) Stocker FW, Eiring A, Georgiade R, Georgiade N : *A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissue separately*. *Am J*

- Ophthalmol 46 : 294-298, 1958.
- 27) Matsubara M, Tanishima T : *Wound-healing of the corneal endothelium in the monkey : A morphometric study.* Jpn J Ophthalmol 26 : 264-273, 1982.
- 28) Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, Kenyon KR : *Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair.* Invest Ophthalmol Vis Sci 26 : 443-449, 1985.
- 29) Ogita Y, Nakamura T, Higuchi S, Mori T, Shimo-oku M : *Histochemical studies of mitochondrial activities of cultured corneal endothelial cells of cat during wound-healing.* Jpn J Ophthalmol 34 : 200-215, 1990.
- 30) Joyce NC, Markin ED, Neufeld AH : *Corneal endothelial wound closure in vitro : Effects of EGF and/or indomethacin.* Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 1548-1559, 1989.
- 31) Stenman S, Vaheri A : *Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin in normal human tissues.* J Exp Med 147 : 1054-1064, 1978.
- 32) Newsome DA, Foidart J, Hassell JR, Krachmer JH, Rodrigues MM, Katz SI : *Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas.* Invest Ophthalmol Vis Sci 20 : 738-750, 1981.
- 33) Watanabe T, Kumagai S : *Localization of fibronectin as revealed by immunofluorescence in human corneas.* Acta Soc Ophthalmol Jpn 86 : 426-432, 1982.
- 34) Tsuchiya S, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T : *Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas.* Jpn J Ophthalmol 30 : 14-31, 1986.
- 35) Tervo T, Sulonen J, Valtonen S, Vannas A, Virtanen I : *Distribution of fibronectin in human and rabbit corneas.* Exp Eye Res 42 : 399-406, 1986.
- 36) Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ : *Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye.* Invest Ophthalmol Vis Sci 28 : 506-514, 1987.
- 37) Smedsrød B, Pertoft H, Eriksson S, Fraser JRE, Laurent TC : *Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelium.* Biochem J 223 : 617-626, 1984.
- 38) Laurent TC, Fraser JRE, Pertoft H, Smedsrød B : *Binding of hyaluronate and chondroitin sulfate to liver endothelial cells.* Biochem J 234 : 653-658, 1986.
- 39) Barany E, Berggren L, Vrabec F : *The mucinous layer covering the corneal endothelium in the owl Strix Aluco.* Br J Ophthalmol 41 : 25-30, 1957.
- 40) Madsen K, Schenholm M, Jahnke G, Tengblad A : *Hyaluronate binding to intact corneas and cultured endothelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 2132-2137, 1989.
- 41) Alho AM, Underhill CB : *The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells.* J Cell Biol 108 : 1557-1565, 1989.
- 42) Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P : *Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis.* Biochem J 239 : 445-450, 1986.
- 43) Yue BYJT, Sugar J, Gilboy JE, Elvart JL : *Growth of human corneal endothelial cells in culture.* Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 248-253, 1989.
- 44) Savage C, Hash J, Cohen S : *Epidermal growth factor.* J Biol Chem 218 : 7669-7672, 1973.
- 45) Cohen S : *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal.* J Biol Chem 237 : 1555-1562, 1962.
- 46) Carpenter G, Cohen S : *Epidermal growth factor.* Annual Reviews in Biochemistry 48 : 193-216, 1979.
- 47) Cohen S, Carpenter G : *Human epidermal growth factor : isolation and chemical and biological properties.* Proc Natl Acad Sci USA 72 : 1317-1321, 1975.
- 48) Parelman J, Nicolson M, Pepose JS : *Epidermal growth factor in human aqueous humor.* Am J Ophthalmol 109 : 603-604, 1990.
- 49) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, Manabe R, Oshiden K, Yanaihara C : *Presence of epidermal growth factor in human tears.* Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 1879-1882, 1989.
- 50) Steinemann T, Thompson H, Maroney K : *Changes in epithelial epidermal growth factor receptor and lacrimal gland EGF concentration after corneal wounding.* Invest Ophthalmol Vis Sci 31(suppl) : 55, 1990.
- 51) Covelli I, Rossi R, Mozzi R, Frati L : *Synthesis of bioactive I -labeled epidermal growth factor and its distribution in rat tissues.* Eur J Biochem 27 : 225-230, 1972.
- 52) Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I : *Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea.* Exp Eye Res 14 : 135-141, 1972.
- 53) Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown K, Birdwell CR : *The role of fibroblast growth factor and*

- epidermal growth factor in the proliferative response of the corneal and lens epithelium. *Exp Eye Res* 25 : 631-649, 1977.
- 54) Fabricant RN, Alpar AJ, Centifanto YM, Kaufman HE : *Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium*. *Arch Ophthalmol* 99 : 305-308, 1981.
- 55) Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H, Zetter BR : *Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro : the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells*. *In Vitro* 14 : 85-118, 1978.
- 56) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L : *Review, Fibroblast growth factor*. *Mol & Cell Endocrinol* 46 : 187-204, 1986.
- 57) Bohlen P, Esch F, Baird A, Gospodarowicz D : *Acidic fibroblast growth factor (FGF) from bovine brain : amino-terminal sequence and comparison with basic FGF*. *EMBO J* 4 : 1951-1956, 1985.
- 58) Bohlen P, Baird A, Esch F, Ling N, Gospodarowicz D : *Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 5364-5368, 1984.
- 59) Thomas KA, Rios-Candelo M, Fitzpatrick S : *Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 357-361, 1984.
- 60) Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Bohlen P : *Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography : identity with pituitary fibroblast growth factor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 6963-6967, 1984.
- 61) Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Lui GM, Bohlen P : *Isolation of pituitary fibroblast growth factors by fast protein liquid chromatography, partial chemical and biological characterization*. *J Cell Physiol* 122 : 323-393, 1985.
- 62) Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemin R : *Retina-and eye-derived endothelial cell growth factors : partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors*. *Biochemistry* 24 : 7855-7860, 1985.
- 63) Gospodarowicz D, Zetter B : *On the standardization of cell substrates for the production of virus vaccine*. In : *Joint WHO/IABS Symposium*. S Karger, Basel, New York, 1977, pp. 109-130.
- 64) Gospodarowicz D : *Fibroblast and epidermal growth factors : their uses in vivo and in vitro in studies on cell functions and cell transplantation*. *Mol Cell Biochem* 25 : 79-110, 1979.
- 65) Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H, Zetter BR : *Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro : the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells*. *In Vitro* 14 : 85-118, 1978.
- 66) Gospodarowicz D, Vlodavski I, Savion N : *The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells*. *Vision Res* 21 : 87-103, 1981.
- 67) Courtey J, Loret C, Moenner M, Chevallier B, Lagente O, Courtois Y, Barritault D : *Bovine retina contains three growth factor activities with different affinity to heparin : eye derived growth factor I, II, III*. *Biochimie* 67 : 265-269, 1985.
- 68) Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK : *Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells*. *Exp Eye Res* 43 : 459-476, 1986.
- 69) Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK : *Effect of fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex, Brain cortex and corpus luteum capillaries*. *J Cell Physiol* 127 : 121-136, 1986.
- 70) Gospodarowicz D, Moran J, Braun D, Birdwell CR : *Clonal growth of bovine vascular endothelial cells : fibroblast growth factor as a survival agent*. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 4120-4124, 1976.
- 71) Gospodarowicz D, Moran JS : *Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts*. *J Cell Biol* 66 : 451-457, 1975.
- 72) Gospodarowicz D, Bialecki H, Thakral TK : *The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor*. *Exp Eye Res* 28 : 501-514, 1979.
- 73) Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Esch F, Bohlen P : *On the mechanism of growth hormone autofeedback regulation : Possible role of somatostatin and growth hormone releasing factor*. *Endocrinology* 117 : 2283-2291, 1985.
- 74) Gospodarowicz D, Baird A, Cheng J, Lui GM, Esch F, Bohlen P : *Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland, physicochemical and biochemical characterization*. *Endocrinology* 118 : 82-90, 1986.
- 75) Gospodarowicz D, Moran JS : *Growth factors in mammalian cell culture*. *Ann Rev Biochem* 45 : 531

- 558, 1976.
- 76) Gospodarowicz D, Moran JS, Braun DL : *Control of proliferation of bovine vascular endothelial cells.* *J Cell Physiol* 91 : 377—386, 1977.
- 77) Gospodarowicz D, Greenburg G : *The effects of epidermal and fibroblast growth factors on the repair of corneal endothelial wounds in bovine corneas maintained in organ culture.* *Exp Eye Res* 28 : 145—157, 1979.
- 78) Plouet J, Gospodarowicz D : *Transforming growth factor β -1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells.* *J Cell Physiol* 141 : 392—399, 1989.
- 79) Saksela O, Moscatelli D, Rifkin DB : *The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β -1 on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells.* *J Cell Biol* 105 : 957—963, 1987.
- 80) Perlman M, Baum JL : *The mass culture of rabbit corneal endothelial cells.* *Arch Ophthalmol* 92 : 235—237, 1974.
- 81) Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH : *Rabbit corneal endothelial cells in vitro : Effects of EGF.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 474—479, 1986.
- 82) Minkowski JS, Bartels SP, Delori FC, Lee SR, Kenyon KR, Neufeld AH : *Corneal endothelial function and structure following cryo-injury in the rabbit.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 1416—1425, 1984.
- 83) Hsieh P, Baum J : *Effects of fibroblastic and endothelial extracellular matrices on corneal endothelial cells.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 457—463, 1985.
- 84) Jumblatt MM, Markin ED, Neufeld AH : *Pharmacological Regulation of morphology and mitosis in cultured rabbit corneal endothelium.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 586—593, 1988.
- 85) Sandra A, Bar RS, Dolash S, Marshall SJ, Kaduce TL, Spector AA : *Morphological alterations in cultured endothelial cells induced by arachidonic acid.* *Exp Cell Res* 158 : 484—492, 1985.
- 86) Kay EP, Nimni ME, Smith RE : *Stability of collagen phenotype in morphologically modulated rabbit corneal endothelial cells.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 495—501, 1984.
- 87) Kay EP, Cheung C-C, Jester JV, Nimni ME, Smith RE : *Type I collagen and fibronectin synthesis by retrocorneal fibrous membrane.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 : 200—212, 1982.