

부르크막 위에 이식된 망막색소상피세포의 조직형태에 따른 배양양상비교

김광수¹ · 김유철¹ · 권건영²

계명대학교 의과대학 안과학교실¹, 계명대학교 의과대학 병리학교실²

목적 : 배양된 망막색소상피세포로부터 수확된 여러 형태의 조직편들을 부르크막 위로 이식한 후 이들이 배양되는 양상을 서로 비교하고자 하였다.

대상과 방법 : 배양된 돼지 망막색소상피세포를 단세포현탁액, 세포송이현탁액 및 단층세포판으로 수확하여 각각을 세 가지 다른 농도로 돼지 부르크막 위에 심은 뒤 1일, 3일, 1주, 2주, 4주째에 주사 및 투과전자현미경으로 각 이식편의 배양양상을 비교 관찰하였다.

결과 : 각 이식편은 부르크막에 부착된 후 활발한 성장 및 증식을 보였으며 전 배양면을 덮는 속도는 세포농도가 높을수록 빨랐다. 세포송이현탁액 이식편은 단세포현탁액 이식편에 비해 배양면을 메우는 속도는 느렸으나 세포의 크기가 작고 모양이 좋았다. 단층세포판 이식편은 다른 형태의 이식편보다 배양면을 채우는 속도가 느렸으며 증식된 세포는 모조직에서 가까울수록 크기와 모양이 좋았으나, 멀어질수록 세포의 크기가 커지고 방추형 및 다양한 모양으로 바뀌는 경향을 보였다.

결론 : 배양된 망막색소상피세포를 부르크막 위로 이식하는 경우 좋은 모양의 증식된 세포를 얻기 위해서 세포송이현탁액을 이용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

〈한안지 46(3):528-540, 2005〉

망막색소상피세포는 감각층 망막과 맥락막 사이에 위치한 양극성을 가진 육각형의 세포로서, 내면은 미세융모가 존재하여 망막의 감각층과 대사 물질을 교환하고, 외면은 외저포위(basal infolding)를 통하여 맥락막의 모세혈관과 교통함으로써 주위조직인 광수용체 및 맥락막모세혈관층과의 상호작용으로 시기능을 수행하는데 아주 중요한 역할을 한다.¹ 그러나 많은 경우 망막색소상피세포에 유전적 질환이나 변성 등으로 비가역적인 시력장애가 초래되고 있지만 현재까지 이에 대한

효과적인 치료방법은 없는 실정이다. 최근 망막색소상피세포의 변성과 연관되어 발생하는 것으로 알려진 연령관련황반변성, 뇌회형맥락망막위축, 망막색소변성 등에 대한 치료방법의 일환으로 망막색소상피이식이 대두되어 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.²⁻¹⁷

망막색소상피이식은 자가 혹은 동종 망막색소상피세포를 질환이 있는 눈의 망막하에 이식하여 결손되었거나 기능을 잃은 상피세포를 대체케 함으로써 이들에 의존하여 시기능을 수행하는 시세포를 포함한 주위조직의 기능을 회복, 혹은 원활하게 하는데 도움을 주고자 시도하고 있다. 현재 이식하고 있는 망막색소상피는 공여안구로부터 수확된 것을 바로 이식하거나 배양된 세포를 이식하고 있는데 우리나라와 같이 공여안구를 구하기 어려운 경우에는 보다 쉽게 얻을 수 있는 배양세포를 이식하는 것이 최선의 방법이 될 수 있다.

배양한 망막색소상피세포의 망막하 이식에 대해서는 과거 20년 동안 많은 실험 및 임상적인 연구가 진행되어 왔다. 부르크막 상의 세포배양에 대한 일련의 연구에서 부르크막의 상태는 세포의 재부착성에 영향을 미친다고 하였는데, 이는 이식된 세포가 재부착하여 좋은 모양으로 분화 및 증식을 하기 위해서는 이식할 조직면

〈접수일 : 2004년 11월 3일, 심사통과일 : 2005년 2월 3일〉

통신저자 : 김 광 수

대구시 중구 동산동 194

계명대학교 동산의료원 안과

Tel: 053-250-7706, Fax: 053-250-7705

E-mail: kimks@dsmc.or.kr

* 본 논문의 요지는 1999년 대한안과학회 제82회 춘계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

* 본 논문의 요지는 1999년 미국 ARVO학회에서 포스터 발표되었음.

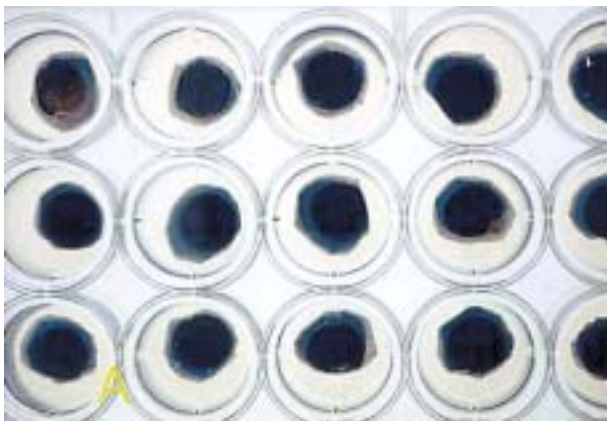
* 본 연구는 1998년도 동산의료원 특수과제연구비로 이루어졌음.

의 세포외기질이 중요한 역할을 함을 일깨워 주었다.²⁻⁵ 또한 배양된 망막색소상피세포를 여러 가지 조직 형태로 이식할 경우 이식편에 함유된 세포외기질의 양에 따라 이식된 세포의 배양양상, 즉 유착, 이동, 증식 및 분화 등에 영향을 미칠 수 있음을 예상할 수 있지만 이에 대한 연구는 잘 되어 있지 않다. 그래서 배양된 망막색소상피세포를 여러 형태의 세포 조직편으로 만든 뒤 이들을 부르크막위로 이식하여 이들 중에서 가장 좋은 모양으로 용이하게 세포의 증식 및 분화가 일어나는 이식편을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상과 방법

부르크막 절편의 제조

부르크막은 신선한 유색돼지 눈으로부터 분리하여 사용하였다. 약 12 mm 직경 크기의 공막-맥락막-부르크막-망막색소상피 복합체 절편을 만든 뒤 공막부를 아래로 하여 24 well 바닥에 위치시켰다. 중앙 9 mm 직경의 망막색소상피 면만을 노출시키고 나머지 절편부위를 밀봉하기 위해서 9 mm 직경크기의 Cloning cylindrs (Scienceware, NJ)를 각 절편의 상측 면 중앙에 위치시키고 4% Agarose 용액을 cylind와 well 벽 사이의 공간을 채운 뒤 5분간 4℃에 보관하였다. Agarose가 단단해진 것을 확인하고 cylind를 각 well로부터 제거한 다음, 0.02 N ammonium hydroxide에 10분간 노출시켜 망막색소상피를 제거하였다(Fig. 1). 각 well은 phosphate-buffered saline (PBS)으로 3번 씻은 뒤 PBS를 채워서 실험에 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다.



망막색소상피세포의 수확 및 배양

돼지 안구를 소독 후 공막을 벗겨내고 맥락막을 노출시킨 다음 25 U/mL의 Dispase (Gibco, USA) 용액으로 37℃로 30분간 처리하였다. 이후 Hank 등장염액으로 안구를 씻고 맥락막-망막색소상피 복합체를 각각 층 망막으로부터 조심스럽게 분리하였다. 부르크막 위에 느슨하게 부착되어 있는 망막색소상피층을 떼어내어 모은 다음, 0.25% 트립신으로 처리하여 개개의 망막색소상피세포로 분리시킨 뒤 60 mm 배양접시에 옮겨 세포를 배양하였다. 배지는 15% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL penicilline G, 100 µL/mL streptomycin, 5 µL/mL gentamicin, 2.5 µL/mL amphotericin B를 함유한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)을 사용하여 37℃, 5% CO₂ 및 95% 공기의 조건하에서 배양하였으며 이틀마다 배지를 교환하였다. 본 연구에서 모든 실험은 일차 계대배양된 세포를 이용하였다.

망막색소상피의 이식편의 조제

배양접시 바닥이 일차 계대배양된 망막색소상피세포로 가득 차면 세포기저부에 세포외기질이 충분히 형성되도록 같은 조건하에서 2주간 더 배양하였으며, 이후 이 세포를 이용하여 세가지 형태의 이식편을 만들었다.

단세포현탁액(single cell suspension, SC)은 일차 계대배양된 망막색소상피세포를 0.25% EDTA가 함유된 0.25% 트립신 용액으로 약 10분간 처리하여 얻은 단세포를 이용하였으며 약 2×10^5 /mL 농도의 세포 현탁액을 만들어 사용하였다(Fig. 2A).



Figure 1. Preparing bruch's membrane explants. (A) 24 well containing explants sealed with agarose, (B) an explant-agarose block.

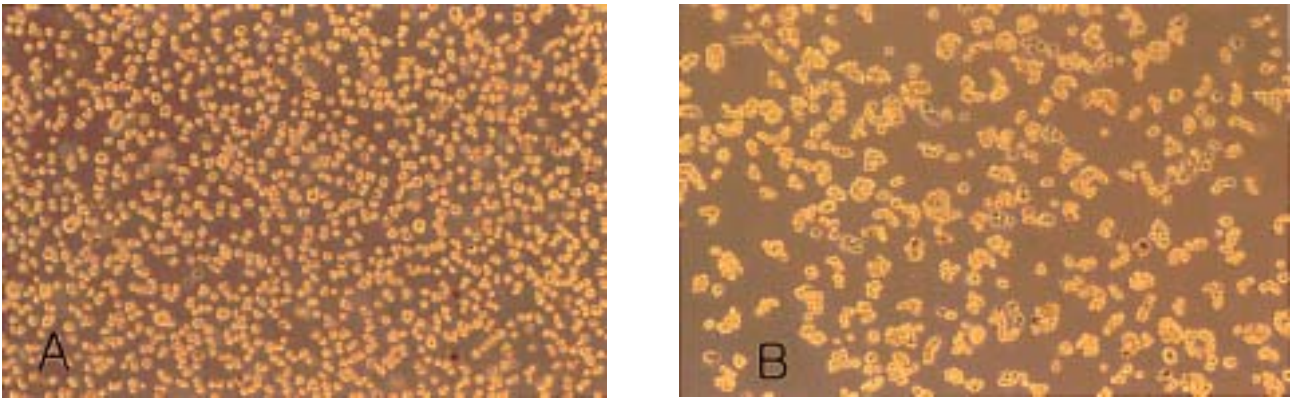


Figure 2. Retinal pigment epithelial transplants dissociated with 0.25% trypsin. (A) single cell suspension, (B) cell cluster suspension.

세포송이현탁액(cell cluster suspension, CC)은 0.25% EDTA가 함유된 0.25% 트립신 용액으로 약 3분간 처리하여 얻은 세포송이를 약 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 농도의 세포 현탁액을 만들어 사용하였다(Fig. 2B).

단층세포판(cell sheet, CS)의 제조를 위해 먼저 razor blade로 배양면의 세포를 대략 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 크기로 분획한 후 10 U/mL Dispase로 3-5분 처리하였다. 일단 세포판의 가장자리가 들리면 27-gauge 관류바늘을 통해 BSS를 강하게 흘려 세포판을 접시 바닥으로부터 분리하여 만들었으며 평균 세포 농도는 2580 cells/sheet 였다(Fig. 3).

이식편의 생육성은 LIVE/DEAD Viability Kit (Molecular Probes, USA)를 이용하여 측정하였고 배양 접시에 재배양하여 확인하였으며, 모든 이식편은 98%이상의 생육성을 보였다.

RPE 조직편의 이식 및 관찰

수확된 망막색소상피세포를 미리 만들어 놓은 부르

크막 위에 이식편 별로 세 가지 다른 농도로(0.5 mL 당 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5) 심어 같은 조건하에서 배양하였고, 주 2회 배양액을 교환하면서 해부현미경으로 관찰하였다.

형태학적 연구

망막색소상피세포를 심은 뒤 1일, 3일, 1주, 2주 및 4주째에 주사전자현미경을 이용하여 각 세포 이식편의 배양양상을 관찰하였으며, 2주째의 배양조직편은 투과전자현미경으로도 관찰하였다. 주사전자현미경적 검사를 위해서는 조직절편을 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde 혼합 고정액에 고정한 후 0.1 M 인산염 완충액으로 세척한 다음 1% osmium tetroxide용액에 2시간 동안 후고정하고 다시 같은 완충액으로 세척하였다. 2% 탄닌산에 12시간 전도염색을 실시하고 완충용액으로 세척한후 1% osmium tetroxide용액에 2시간 고정하였다. 계열 에탄올로 탈수를 하고 t-butyl alcohol로 침투를 시키고 동결건조

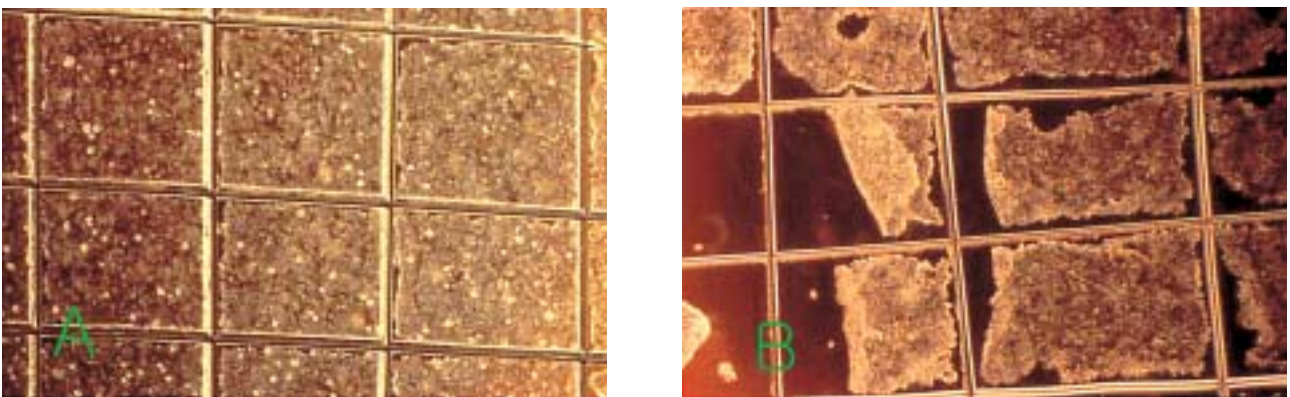


Figure 3. Preparation of cell sheets with 10 U/mL of Dispase. RPE cells before (A) and after (B) treatment with Dispase. RPE: retinal pigment epithelium.

기(Freeze dryer, Hitachi ES-2030)로 동결 건조하였다. 건조된 시료를 시료관에 부착한 후 이온증착기(Ion sputter, Hitachi E-1030)를 사용하여 Pt-Pd 합금으로 증착한 다음 Hitachi S-4200형 주사전자현미경으로 관찰하였다. 투과전자현미경적 검사를 위해서는 조직 절편을 2.5% glutaraldehyde 용액으로 1-4℃에서 2시간 전고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% osmium tetroxide 용액에 2시간 후고정한 뒤 같은 완충용액으로 세척하여 계열 ethanol로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 Luft방법에 의한 epon혼합물로 포매하여 37℃에 12시간, 60℃에 48시간동안 열중합을 시켰다¹⁸. 포매된 조직을 1 μ m 두께로 박절한 후 toluidine blue 염색을 실시하여 관찰부위를 선택한 다음, Sorvall MT-5000형 초박절기에 Dupont diamond knife를 부착하여 회백색(40-60nm)의 간접색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착 시킨 뒤, Watson¹⁹ 및 Reynold방법²⁰에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자 염색을 실시하여 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

모든 망막색소상피세포 이식편은 용이하게 부르크막에 부착된 후 활발한 성장 및 증식을 보였다. 배양면을 모두 덮는 속도는 단세포현탁액 군, 세포송이현탁액 군, 단층세포판 군의 순이었으며 세포농도가 높을수록 빨랐다(Fig. 4).

단세포현탁액(SC) 이식군의 주사전자현미경(SEM) 소견 상 망막색소상피세포가 부르크막에 부착된 후 시간적인 경과에 따른 증식 및 분화과정에서 세포의 모양과 표면 돌기의 수와 분포는 아주 다양하였다. 이식 후 4주 소견에서 대개 망막색소상피세포는 서로 가까이 면을 맞대고 밀집하여 다각형의 전형적인 상피세포의 모양을 취하는 경향을 보였으나, 일부에서는 불규칙적이고 길쭉한 형태로 변형된 모습을 보였다(Fig. 5). 2주째의 투과전자현미경(TEM) 소견에서 망막색소상피세포는 부르크막에 밀착된 관계를 유지하였으며, 세포의 극표면에 미세융모가 잘 관찰되었다. 배양된 세포는 전반적으로 단층을 이루면서 세포간 접합체는 잘 발달되어 있었지만, 인접된 세포와는 꾸불꾸불하고 비스듬하게 맞대는 등 접촉면은 다양한 정도로 겹쳐진 소견을 보였으며, 일부에서는 세포가 다층화되어 있었다(Fig. 6).

세포송이현탁액(CC) 이식군은 SC군에 비해서 배양면을 메우는 속도는 느렸으나 세포의 크기가 작고 모양이 좋았다. 세포는 초기에 편평한 소견을 보였지만 전 배양기간 동안 둥근 모양으로 모든 방향으로 동일하게 퍼지는 모습을 보였으며 세포막 표면에 풍부한 미세융모가 관찰되었다. 이식 후 4주 소견에서 크기는 다양하였으나 대부분의 세포는 다각형 모양을 나타내었고, 손가락 모양의 길쭉한 미세융모가 세포 표면에서 잘 관찰되었다. 손상된 부르크막에 위치한 것으로 여겨지는 일부 세포들은 편평한 모양을 취하고 있었으며 세포표면의 미세융모는 수가 적었고 키도 낮았다(Fig. 7).

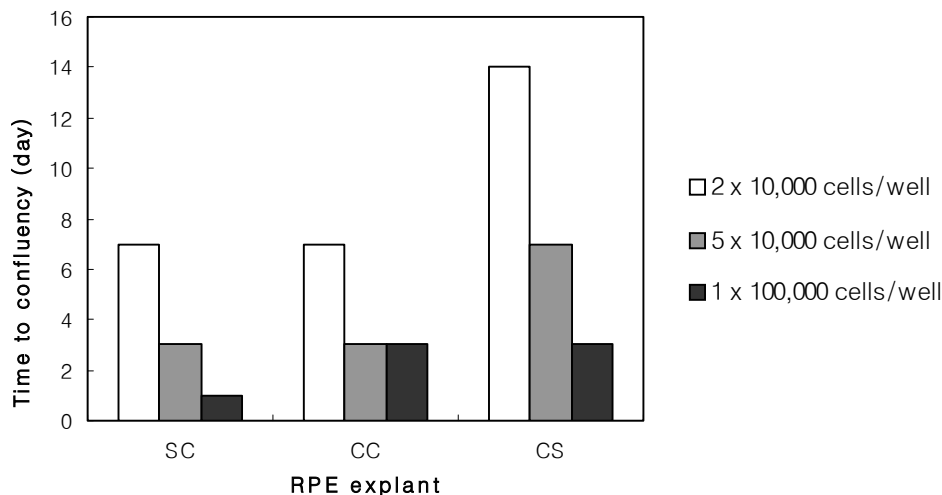


Figure 4. Time to confluency on Bruch's membrane by RPE transplants. All types of transplants were grown and proliferated well on BM and showed shorter time to reach confluence with higher cell concentration. RPE: retinal pigment epithelium, SC: single cell suspension, CC: cell cluster suspension, CS: cell sheet.

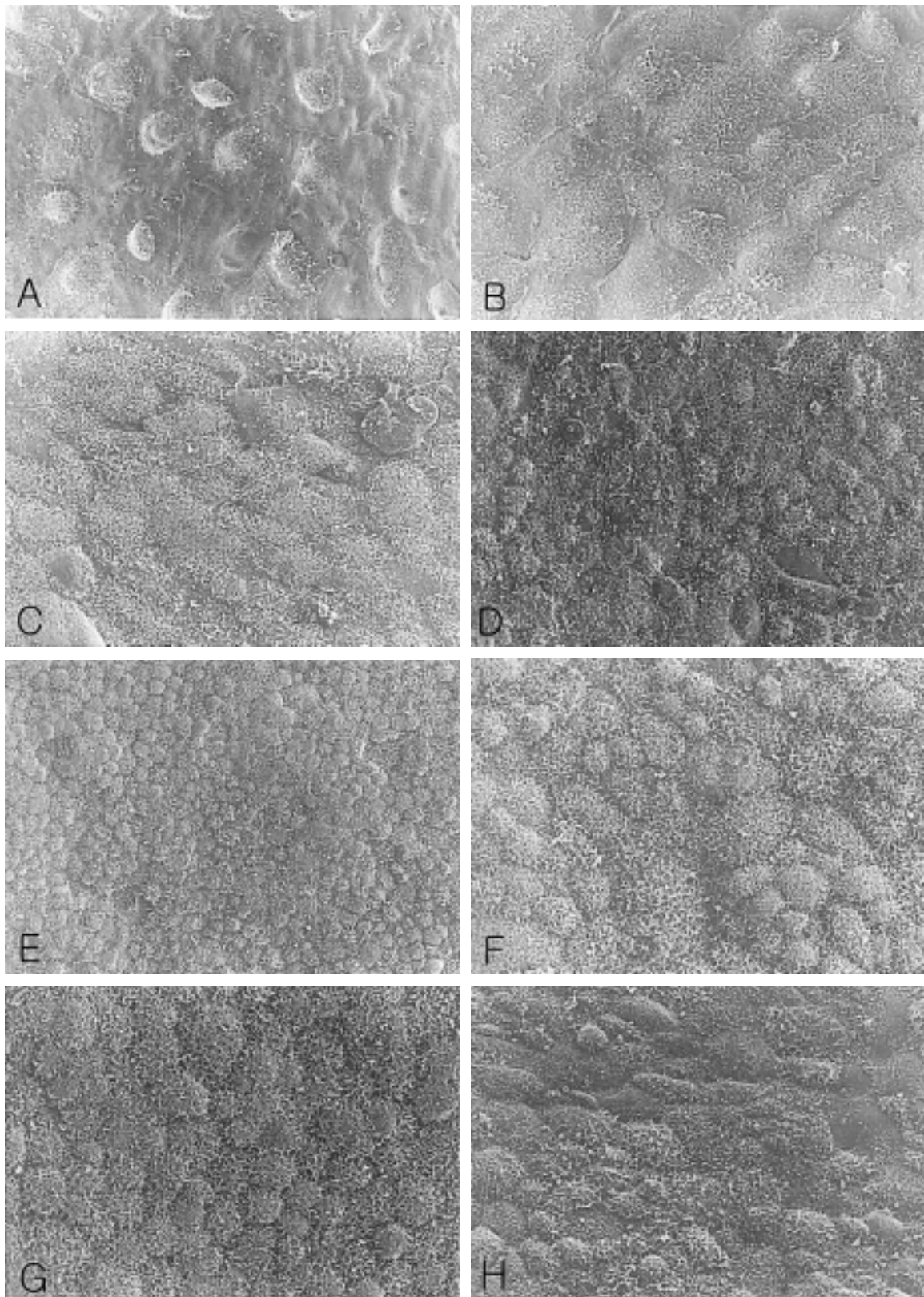


Figure 5. Scanning electron microscopic photographs of SC transplants cultured on BM. RPE cells proliferated to form a monolayer in polygonal shape, but showed variable size of cells. (A) 1 day, (B) 3 days, (C) 1 week, (D) 2 weeks, (E-H): 4 weeks. Original magnification; (A-D&F-H) $\times 300$, (E) $\times 130$. SC: single cell suspension; BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium.

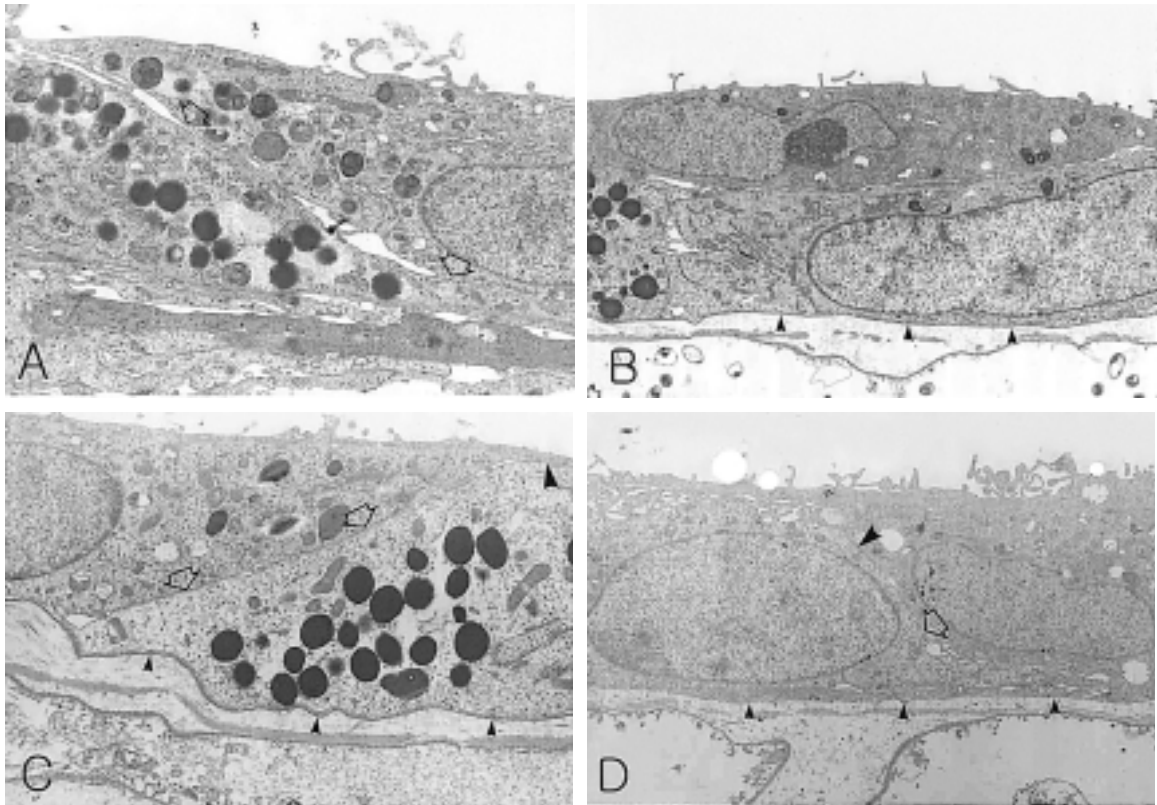


Figure 6. Transmission electron microscopic photographs of SC transplants cultured on BM. Notice well-preserved basement membrane of donor RPE cells (small arrow heads). RPE cells have close relationship to underlying basement membrane. Varying degree of overlapping between neighboring cells (empty arrows) and multi-layered cells (B) were often observed. Junctional complexes (large arrow heads) were also seen. Original magnification: (A, C) $\times 8000$, (B, D) $\times 3000$. BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium, SC: single cell suspension.

TEM 소견에서 세포간 측면은 SC 군에서와 같이 꾸불꾸불하고 비스듬하게 겹쳐진 소견을 보였지만, 대부분 단일 세포층을 이루고 있었으며, 편평한 세포구조를 보이는 부위의 세포는 아래의 부르크막에 느슨하게 부착되어 있었다(Fig. 8).

단층세포판(CS) 이식군에서 세포판은 부르크막에 이식된 후 수축하고 주름지는 경향을 보였으며, 다른 형태의 이식편보다 배양면을 채우는 속도가 느렸다. 모조직 내의 세포는 다층화 되어 있었고, 증식된 세포는 모조직에서 가까울수록 크기와 모양이 좋았으나, 멀어질수록 세포는 크고 편평해지면서 표면에는 적은 수의 작은 미세융모 소견을 보이며 방추형 및 다양한 모양으로 바뀌는 경향을 보였다(Fig. 9, 10).

고 찰

망막색소상피세포는 부르크막의 내면에 놓여있는 단세포층으로 광수용체 및 맥락막모세혈관의 기능과 유지

를 위한 대사작용을 통하여 시기능에 필수적인 역할을 담당하고 있다. 또한 과도한 빛을 흡수하여 안구내 빛의 반사와 산란을 줄이고 세포간의 치밀이음부(tight junction)는 외혈액망막장벽으로서 기능도 수행한다.¹ 그러므로 망막색소상피가 병적으로 기능을 잃거나 수술적 처치 중 맥락막신생혈관막과 같이 제거되면 황반부광수용체의 이상은 물론이고 아래의 맥락막모세혈관층에 위축을 초래하여 심각한 시력장애를 일으킬 수 있다.^{17,21-27} 따라서 망막색소상피세포에 발생한 어떠한 병적 이상이라도 시기능에 심각한 영향을 줄 수 있으며 현재 망막색소상피세포 이식이 그 치료방법의 하나로 제시되고 있다.^{6,7}

지금까지 망막색소상피세포 이식에 관한 많은 연구가 진행되어 왔으며 동물실험을 통해 망막하로 이식된 망막색소상피세포가 잘 생존되었음이 알려진 바 있다.⁸⁻¹⁰ 그러나 인체에 이식되어 임상에서 적용하려면 이식된 세포가 제 기능을 갖고 장기간 생존해야하는 문제점이 있다.

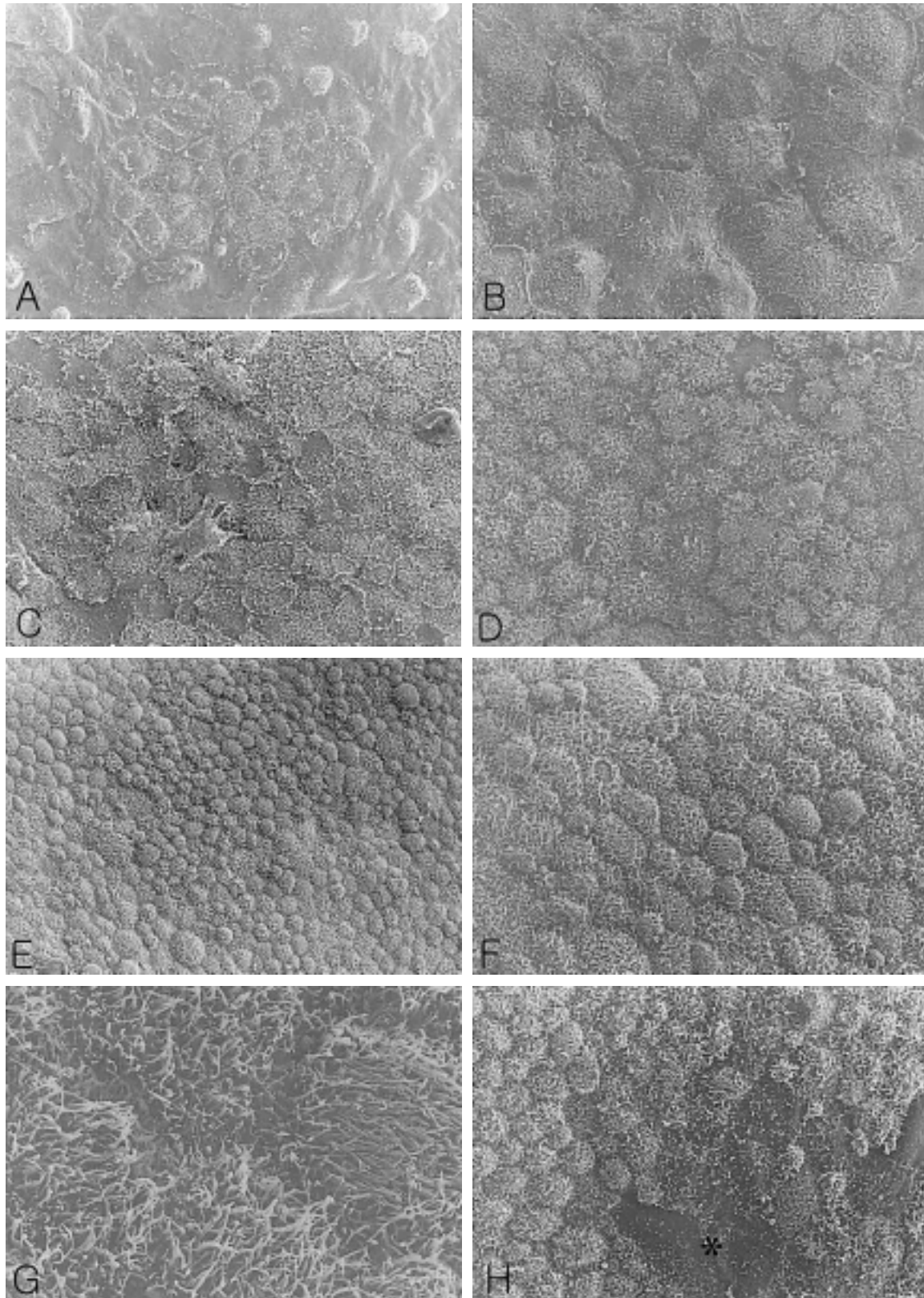


Figure 7. Scanning electron microscopic photographs of CC transplants cultured on BM. Cultured RPE cell obtained much polygonal shape in comparing with SC tissue. Notice tall and slender microvilli on apical cell surface. Some cells showed rather flat and large in size (*). (A) 1 day, (B) 3 days, (C) 1 week, (D) 2 weeks, (E-H) 4 weeks. Original magnification: (A) $\times 250$, (B-F&H) $\times 300$, (G) $\times 1500$. CC: cell cluster suspension, BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium.

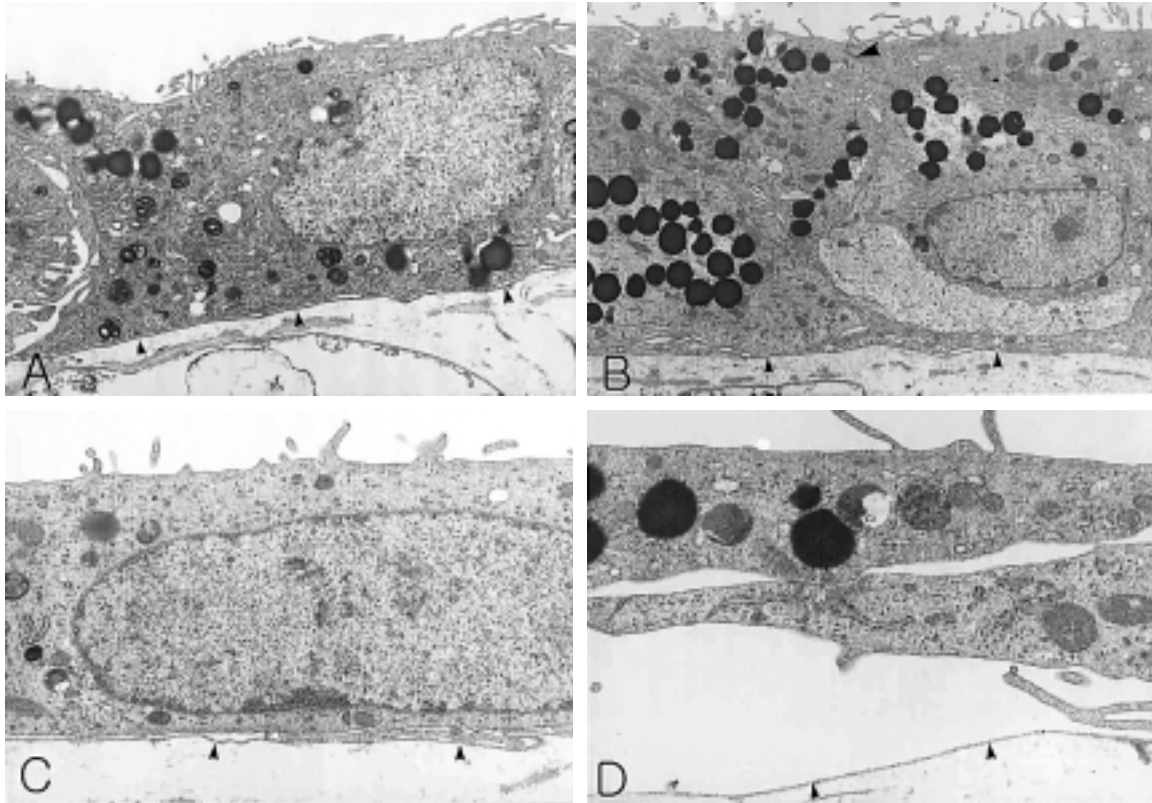


Figure 8. Transmission electron microscopic photographs of CC transplants cultured on BM. RPE cells were predominantly monolayered and have close relationship to underlying basement membrane (small arrow heads) of donor RPE cells. Some cells were loosely attached to damaged BM (D). Notice the well-developed microvilli on apical surface of RPE cells and Junctional complexes (large arrow heads). Original magnification: (A) $\times 6,000$, (B) $\times 3,000$, (C) $\times 10,000$, (D) $\times 12,000$. CC: cell cluster suspension, BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium.

Algevere et al⁶은 망막하 신생혈관이 있는 삼출성 연령관련황반변성 환자 5명에게 망막색소상피세포를 이식한 예들에서 초기에는 이식 부위로 주시가 이루어졌으나 3개월 안에 모두 이식 부위에 절대적 암점이 발생했다. 이런 결과는 거부반응과 이식편의 재부착 실패가 원인으로 생각되고 있다.

이렇게 동물 실험에서와 달리 인체 실험에서는 이식된 망막상피세포가 더 이상 생존하지 않는 상반된 결과를 보였다. 이것은 동물실험의 경우 부르크막이 정상적인 상태로 이식되었지만, 삼출성 연령관련황반변성 환자의 경우에는 섬유혈관조직의 침투로 인하거나 맥락막 신생혈관의 수술적 제거로 일부 부르크막이 소실되어 망막색소상피세포가 부착할 부르크막이 정상이 아니었기 때문으로 여겨지고 있다.²⁸⁻³¹ 비정상적인 부르크막 위로 망막색소상피세포를 이식할 경우 세포의 유착이 제한을 받게 되어 망막색소상피세포의 생존, 증식 및 생물학적 기능에 장애를 주게 된다. 결과적으로 망막색소상피세포들은 세포외기질과의 상호관계가 적절하지

못하면 섬유모세포 양상으로 변형되고,^{32,33} 심지어 세포기저막의 부착에 실패하면 세포고사의 과정을 밟는다.^{2,34,35}

세포분자의 관점에서 보면 부르크막의 내측 콜라겐 층(inner collagenous layer)의 라미닌(laminin), 섬유결합소(fibronectin), 아교질 IV (collagen IV) 및 vitreoneurin으로 구성된 ligands와 망막색소상피세포 기저부의 인테그린(integrin)의 $\beta 1$ -subunit 간의 특별한 상호작용이 망막색소상피세포의 재유착에 관여한다고 한다.^{4,5} 이와 같이 이식된 세포의 생존은 기질에 부착되는 세포의 능력뿐만 아니라 기질상태가 중요한 것으로 해석되고 있다. 그러나 과거 망막색소상피세포의 망막하 이식에 관한 여러 가지 실험에서 세포 현탁액(cell suspension), 세포판(cell sheet) 그리고 patch 등 다양한 형태로 시행되었음에도 주로 세포의 기저막을 포함한 부르크막의 상태에만 연구가 집중되었고 배양된 세포가 어떤 상태로 이식되는냐에 따른 영향은 연구는 미진하였다.

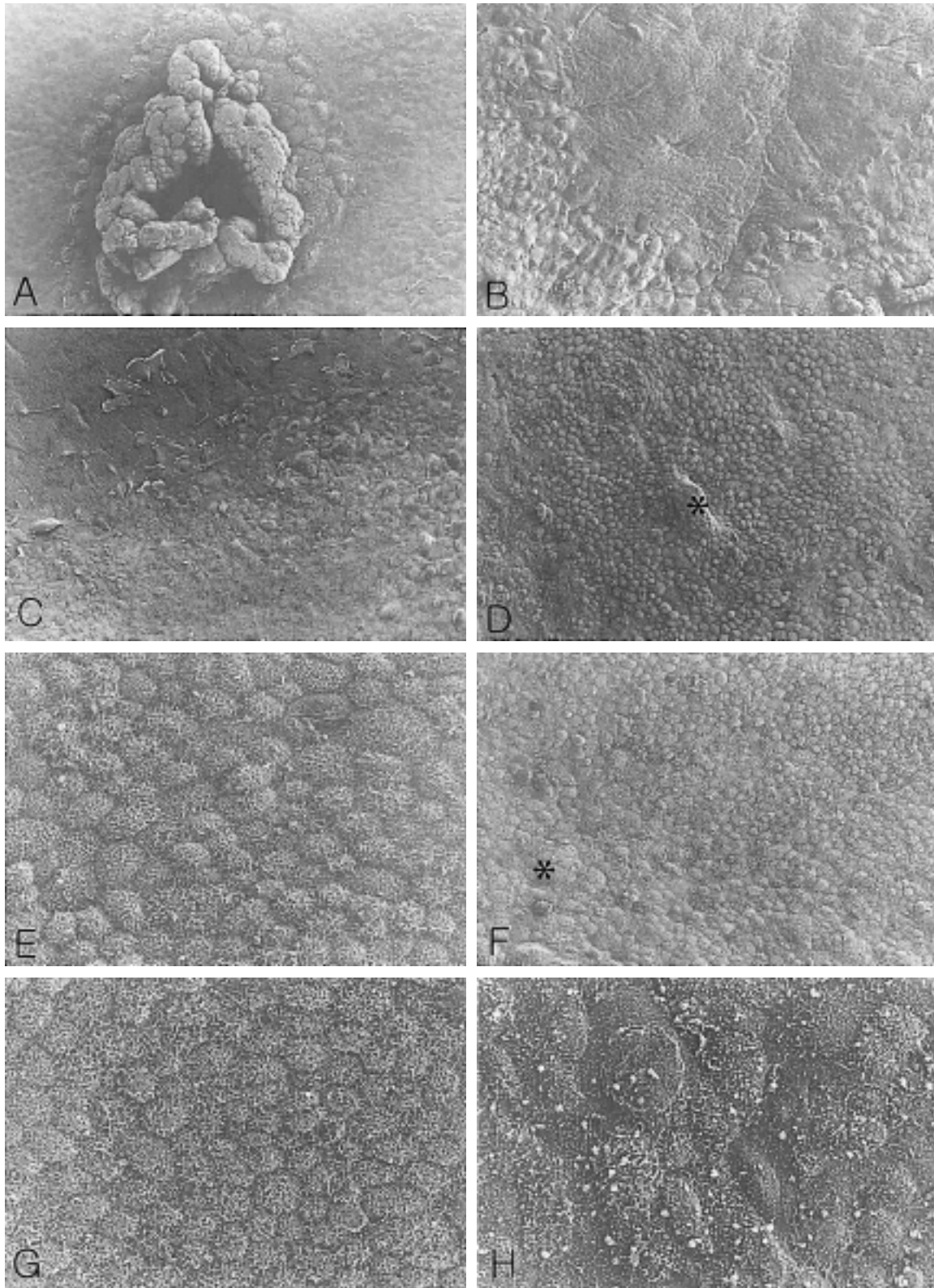


Figure 9. Scanning electron microscopic photographs of CS transplants cultured on BM. Cell morphology was polygonal in proximal portion of cells proliferated from transplanted tissues (*), but RPE cells tended to be large, flat and to have scanty microvilli on cell surface with reaching peripheral portion of confluent cell layers (D, H). (A) 1 day, (B) 3 days, (C) 1 week, (D&E) 2 weeks, (F-H): 4 weeks. Original magnification: (A) $\times 100$, (B) $\times 60$, (C) $\times 30$, (D) $\times 70$, (E&G-H) $\times 300$, (F) $\times 80$. CS: cell sheet, BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium.

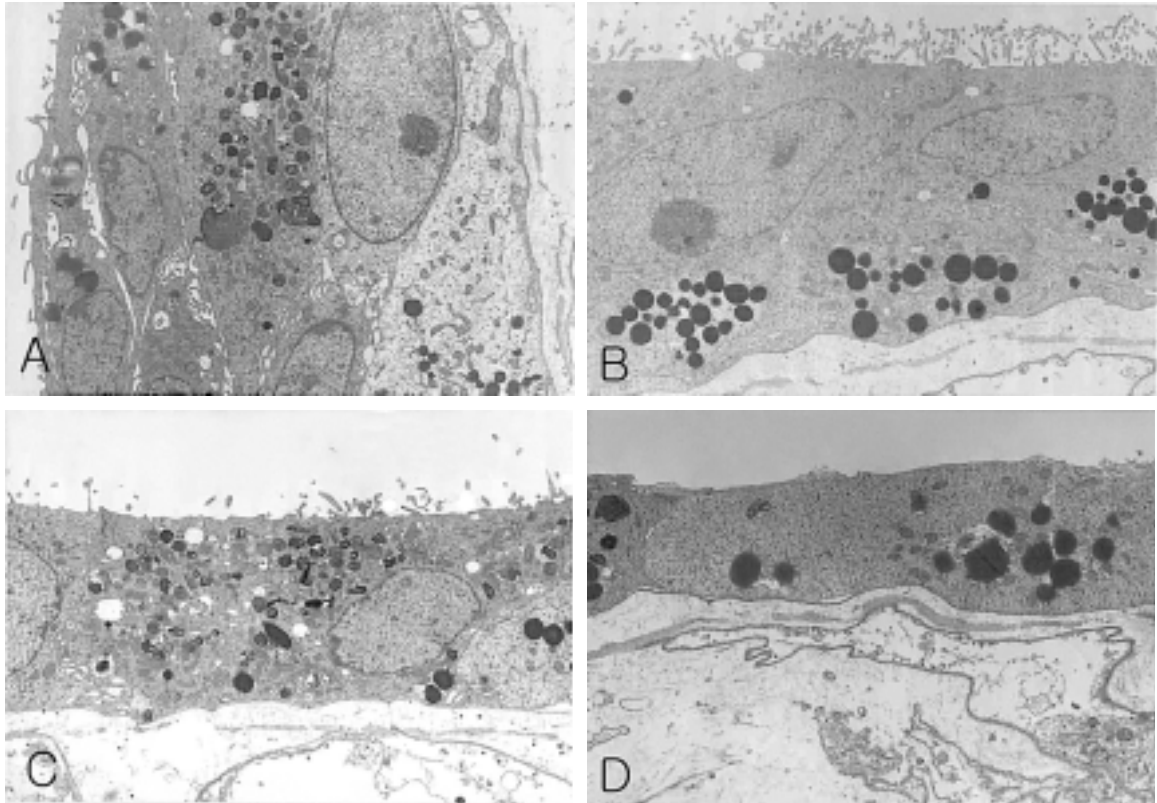


Figure 10. Transmission electron microscopic photographs of CS transplants cultured on BM. Notice multi-layered RPE cells in donor sheets (A), mono-layered and relatively tall cells in proximal zone (B, C) and flat cells in peripheral zone (D). Original magnification; (A-C) $\times 3000$, (D) $\times 5,000$. CS: cell sheet, BM: Bruch's membrane, RPE: retinal pigment epithelium.

본 연구에서는 배양된 망막색소상피세포로 여러 형태의 세포 조직편들을 만들어 이들을 부르크막 위에 이식할 때 나타날 수 있는 배양양상의 차이를 관찰하였으며, 이들 중에서 가장 좋은 모양으로 세포의 증식 및 분화가 일어나는 이식편을 알아보았다. 본 연구 결과 각 이식편은 용이하게 부르크막에 부착된 후 활발한 성장 및 증식을 보였으며 배양면을 모두 덮는 속도는 세포 농도가 높을수록 빨랐다. 세포송이 이식편은 단세포현탁액에 비해서 배양면을 메우는 속도는 다소 느렸으나 세포의 크기가 작고 모양이 좋았다. 세포판 이식편은 다른 형태의 이식편보다 배양면을 채우는 속도가 느렸으며 증식된 세포는 모조직에서 가까울수록 크기와 모양이 좋았으나 멀어질수록 세포의 크기가 커지고 방추형 및 다양한 모양으로 바뀌는 경향을 보였다. 세포가 배양면을 메우는 속도는 단세포현탁액, 세포송이현탁액, 세포판 이식편 순이었는데, 다른 실험적인 연구에서^{2,3} 세포의 증식 속도와 모양이 세포의 유착, 증식, 분화의 척도로 함께 사용되는 것과는 다르게 본 실험에서는 모양과 속도가 상반된 결과를 가져왔다. 즉 모양이 좋은 세포판은 가장 속도가 느렸으며 가장 빨리 배양면

을 메운 단세포현탁액은 세포모양이 가장 불규칙하였다. 이는 세포가 여러 지점에서 동시에 배양면 위로 자라는 단세포현탁액 및 세포송이현탁액에 비해서 세포판 경우는 하나의 이식편에서부터 주위로 세포가 증식하므로 배양면을 채우는 데 있어서 더 많은 시간이 소요되는 것으로 생각되며 세포 개개의 증식속도와는 다른 개념이라 생각한다. 단세포현탁액으로 이식된 세포가 다른 형태로 이식된 세포에 비해서 모양이 좋지 않은 것은 트립신으로 세포 한 개씩 분리할 때 세포간부착이나 세포외기질의 손상이 원인으로 추측된다. 트립신에 노출된 시간을 달리하면서 세포송이현탁액과 단세포현탁액을 만들었는데 3분간 트립신에 노출된 세포송이현탁액에 비해서 단세포현탁액은 10분간 트립신에 노출되어 더 많은 세포간결합과 세포외기질의 단백질을 용해하면서 손상을 준 것으로 사료된다. 마찬가지로 세포판의 경우 처음 이식편의 수축으로 세포판의 가장자리가 바닥으로부터 들리고 주름졌으나 세포 자체는 비교적 잘 보존되어서 결국 4주 후에는 좋은 모양의 세포 모양을 보인 것으로 사료된다. 세포판 군에서 이식된 모조직으로 부터 멀어질수록 세포모양이 나빠진 것은 세포가 이

동, 증식, 및 분화가 거듭됨으로서 나타나는 세포의 노화(senescence)로 여겨지며 이는 세포판 뿐만 아닌 다른 모양의 이식편에서도 존재하는 공통된 현상일 것이라고 여겨진다. 단지 세포판의 경우 배양면의 가운데 위치한 하나의 이식편으로부터 주위로 세포가 증식하므로 모조직과의 거리에 따른 세포의 노화정도가 쉽게 관찰되었을 것이라고 생각된다.

최근에 들어 부르크막의 손상에 따른 망막상피이식술의 한계를 극복하기 위해서 많은 연구가 진행되고 있다. Del Priore et al¹⁶은 손상된 부르크막 표면에 세포외기질 성분을 보강하여 24시간동안 관찰했을 때 세포의 재유착성을 훨씬 높일 수 있었으며 망막색소상피 세포의 유착과 증식은 헤파리나 성장인자 뿐만 아니라 라미닌, 섬유결합소, 아교질 IV 및 vitreonectin과 같은 세포외기질 성분에 의해 촉진될 수 있다고 하였다. 이는 비록 부르크막이 손상을 입었더라도 외부에서 세포유착인자인 기질단백으로 표면을 처리하면 이식될 부위의 환경이 표층에 가깝게 개선되어 이식된 세포의 유착성과 증식성 및 생존성을 호전시킬 수 있음을 시사한다. 또한 본 연구에서와 같이 이식편의 형태를 개선하여 이들에 함유된 세포외기질 성분의 기능과 양을 증대시킬 경우도 손상된 부르크막에 부착성을 좋게 하는 다른 방법이 될 수 있으므로, 향후 각 이식편에 함유된 세포외기질을 정량적으로 측정하여 이들의 상호관계를 확인해 볼 필요가 있다. 또한 세포의 다면성(polymegathism)과 다형성(polymorphism)을 정량적으로 나타내는 hexagonality와 세포면적의 변이계수(coefficient variation) 같은 지표를 이용한 세포모양에 대한 객관적인 통계에 관한 추가적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Naumann GOH, Apple DJ. Pathology of the eye. New York: Springer-Verlag, 1986;245-8.
- 2) Del Priore LV, Tezel TH. Reattachment rate of human retinal pigment epithelium to layers of human Bruch's membrane. Arch Ophthalmol 1998;116:335-41.
- 3) Jones Z, Tezel TH, Del Priore LV. Morphology of retinal pigment epithelium (RPE) after reattachment to different layers of human Bruch's membrane [ARVO Abstract]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;38:S98.
- 4) Ho TC, Del Priore LV. Reattachment of human RPE to extracellular matrix and human Bruch's membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997;38:1110-8.
- 5) Song MK, Lui GM. Propagation of fetal human RPE cells: Preservation of original culture morphology after serial passage. J Cell Physiol 1990;43:196-203.
- 6) Algvere PV, Berglin L, Gouras P. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1994;232:707-16.
- 7) Del Priore LV, Kaplan HJ, Berger AS. Retinal pigment epithelial transplantation in the management of subfoveal choroidal neovascularization. Semin Ophthalmol 1997;12:45-55.
- 8) Lopez R, Gouras P, Kjeldbye H. Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30:586-8.
- 9) Lane C, Boulton M, Marshall J. Transplantation of retinal pigment epithelium using a pars plana approach. Eye 1989;3: 27-32.
- 10) Sheedlo HJ, Turner E. Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in retinal pigment epithelium-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. Exp Eye Res 1989;48:841-54.
- 11) Tezel TH, Del Priore LV. Reattachment to a substrate prevents apoptosis of human retinal pigment epithelium. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997;235:41-7.
- 12) Shiragami C, Matsuo T, Shiraga F, Matsuo N. Transplanted and repopulated retinal pigment epithelial cells on damaged Bruch's membrane in rabbits. Br J Ophthalmol 1998;82:1056-62.
- 13) Castellarin AA, Sugino IK, Vargas JA, et al. In vitro transplantation of fetal human retinal pigment epithelial cells onto human cadaver Bruch's membrane. Exp Eye Res 1998; 66:49-67.
- 14) Tezel TH, Del Priore LV. Repopulation of different layers of host human Bruch's membrane by retinal pigment epithelial cell grafts. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:767-74.
- 15) Tezel TH, Kaplan HJ, Del Priore LV. Fate of human retinal pigment epithelial cells seeded onto layers of human Bruch's membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:467-76.
- 16) Del Priore LV, Tezel TH, Geng L. Resurfacing of inner layers of human Bruch's membrane proteins adhesion of transplanted adult RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:S858.
- 17) Pollack JS, Del Priore LV, Smith ME, et al. Postoperative abnormalities of the choriocapillaris in exudative age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 1996;80:314-8.
- 18) Luft LH. Improvement in Epoxy Resin Embedding Method. J Biophysic Biochem Cytol 1961;9:409-14.
- 19) Watson ML. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. J Biophysic Biochem Cytol 1958;226:475-9.
- 20) Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963;17: 208-12.
- 21) Korte GE, Reppucci V, Henkind P. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25: 1135-45.
- 22) Valentino TL, Fang SR, Berger A, Silverman MS. Retinal pigment epithelial repopulation in monkeys after submacular surgery. Arch Ophthalmol 1995;113:932-8.

- 23) Del Priore LV, Hornbeck R, Kaplan HJ, et al. Debridement of the pig retinal pigment epithelium in vivo. *Arch Ophthalmol* 1995;113:939-44.
- 24) Del Priore LV, Hornbeck R, Kaplan HJ, et al. Retinal pigment epithelial debridement as a model for the pathogenesis and treatment of macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:629-43.
- 25) Desai VN, Del Priore LV, Kaplan HJ. Choriocapillaris atrophy after submacular surgery in the presumed ocular histoplasmosis syndrome. *Arch Ophthalmol* 1995;113:409-10.
- 26) Nasir MA, Sugino I, Zarbin MA. Decreased choriocapillaris perfusion following surgical excision of choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 1997;81:481-6.
- 27) Castellarin AA, Sugini IK, Nasir M, Zarbin MA. Clinicopathological correlation of an excised choroidal neovascular membrane in pseudotumor cerebri. *Br J Ophthalmol* 1997;81:994-1000.
- 28) Sarks SH. Aging and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol* 1976;60:324-41.
- 29) Spraul CW, Grossniklaus HE. Characteristics of drusen and Bruch's membrane in postmortem eyes with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1997;115:267-73.
- 30) Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. *Ophthalmology* 1993;100:1519-35.
- 31) Grossniklaus HE, Hutchinson AK, Capone A, et al. Clinicopathologic features of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Ophthalmology* 1994;101:1099-111.
- 32) Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, et al. Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res* 1989;8:1029-37.
- 33) Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:391-405.
- 34) Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, et al. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-3.
- 35) Ho TC, Del Priore LV, Kaplan HJ. En bloc transfer of extracellular matrix in vitro. *Curr Eye Res* 1996;15:991-7.

=ABSTRACT=

Cultured Morphology by Tissue types of Retinal Pigment Epithelial Cells Transplanted onto the Bruch's Membrane

Kwang-Soo Kim, M.D.¹, Yu-Cheol Kim, M.D.¹, Kun-Young Kwon, M.D.²

*Department of Ophthalmology¹ and Department of Pathology²,
Keimyung University, School of Medicine, Daegu, Korea*

Purpose: To compare the cultured morphology of retinal pigment epithelium (RPE) cells which were transplanted onto the Bruch's membrane (BM) in different tissue types.

Methods: Cultured porcine RPE cells were harvested in three types of transplants: single cell (SC) suspension, cell cluster (CC) suspension and cell sheet (CS). After RPE cell transplants were plated onto the porcine BM explants at three different cell concentrations, they were dissected and examined with a transmission electron microscope and a scanning electron microscope at 1 day, 3 days, and 1, 2 and 4 weeks for morphological study.

Results: All types of RPE transplants were grown and proliferated well on BM and required a shorter time to reach confluence with higher cell concentration. Although CC transplants took a little longer to reach confluence on BM than SC transplants, they were nevertheless well grown on BM and showed good cellular morphology in monolayer. The time to confluence was much longer for the CS transplants than for the SC and CC transplants and the proliferated cells tended to be large, flat and to have scanty microvilli on the cell surface with reaching peripheral portion of confluent cell layers.

Conclusions: CC suspension may be a better candidate for RPE transplantation in the case of using cultured RPE cells as transplant.

J Korean Ophthalmol Soc 46(3):528-540, 2005

Key Words: Bruch's membrane, Retinal pigment epithelial cell, Transplantation

Address reprint requests to **Kwang Soo Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology, Dongsan Medical Center, Keimyung University

#194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea

Tel: 82-53-250-7706, Fax: 82-53-250-7705, E-mail: kimks@dsmc.or.kr