# 손상된 부르크막에 이식된 망막색소상피세포의 재유착성에 대한 세포외기질 단백의 영향

#### 김광수<sup>1</sup> · 김유철<sup>1</sup> · 전세진<sup>2</sup>

계명대학교 의과대학 안과학교실<sup>1</sup>, 대구 새빛안과<sup>2</sup>

**목적** : 외부에서 첨가된 세포외기질(ECM) 단백이 손상된 부르크막에 이식된 망막색소상피세포의 재유착성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법 : 돼지안구의 부르크막편을 기저막이 유지된 부르크막(bl-BM), 세포외기질 단백으로 처리하지 않은 손 상된 부르크막편(bare d-BM), 세포외기질 단백으로 처리한 4종류의 손상된 부르크막편(ECM-coated d-BM: fibronectin, laminin, collagen IV, or all) 등 6군으로 나눈 후, 망막색소상피세포를 각각의 부르크막에 배양한 뒤 살아있는 세포의 수를 측정하고 3일, 1, 2, 4주째 주사전자현미경으로 배양된 양상을 관찰하였다 결과 : 망막색소상피세포의 재유착률은 bl-BM군에서 가장 높고 bare d-BM군에서 가장 낮았다. ECM-coated d-BM군에서 재유착률은 bl-BM군에 비해 낮았으나, bare d-BM에 비해서는 통계학적으로 유의하게 높았으며 (p<0.05), 세포외기질 단백의 노출시간은 재유착률에 영향을 주지 않았다. bl-BMs과 ECM-coated d-BMs에 이식된 망막색소상피세포편은 용이하게 유착된 후 활발하게 증식하여 시간이 갈수록 이식된 부르크막 표면을 메웠으며, 대부분의 세포는 모양이 크고 편평하였지만 일부세포는 표면에 미세돌기를 가진 좋은 양상을 보였다. 반면 bare d-BM에 이식한 망 막색소상피세포편은 일부만이 느슨하게 유착되었고 이들 세포도 대부분 모양이 둥글고 서로 응집되어 있었다. 결론 : 본 연구의 결과는 외부에서 세포외기질 단백의 첨가는 d-BM상에 망막색소상피세포의 유착성을 증가시켜줄 수 있음을 시사한다.

〈한안지 48(11):1537-1547, 2007〉

망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE) 는 부르크막(Bruch's membrane)의 내면에 놓여있 는 육각형의 단세포층으로 주위조직인 광수용체 및 맥 락막 모세혈관층과의 상호작용으로 시기능을 수행하는 데 아주 중요한 역할을 한다.<sup>1</sup> 그러므로 연령관련황반 변성(age-related macular degeneration, AMD) 등과 같은 질환에서 망막색소상피가 병적으로 상실되거 나 수술적 처치동안 맥락막신생혈관막과 같이 제거되면 황반부 광수용체에 기능이상이 초래될 수 있고 하부에 위치한 맥락막모세혈관층에 위축을 초래하여 술 후 시

〈접수일 : 2006년 2월 2일, 심사통과일 : 2007년 7월 24일〉

- 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 2001년 미국 ARVO학회에서 포스터 발표되 었음.

력회복에 큰 걸림돌로 작용하게 된다. 2-9 이러한 사실 때문에 망막색소상피이식이 여러 황반질환에 대한 치료 의 한 방법으로 제시되어 왔다. 그러나 연령관련황반변 성 환자에서 부르크막은 구조적으로 정상이 아니며. 10-13 또한 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 포함한 연령에 관련된 생화학적인 변화 등으로 인하여 망막색소상피를 이식할 경우 이러한 병적인 기질에 세 포의 유착이 제한을 받게 된다.<sup>14,15</sup> 그 외 습성 연령관 련황반변성(exudative AMD)에서 섬유혈관조직의 침투로 인하거나 맥락막신생혈관의 수술적 제거동안 일 부 내측 부르크막의 파괴 내지 소실이 일어날 수 있는 데.<sup>13</sup> 부르크막의 손상이나 병적소견의 정도는 숙주 혹 은 이식된 망막색소상피의 유착, 이동, 성장 및 분화 등 에 영향을 준다. 그래서 이러한 망막색소상피세포들은 세포외기질과의 적절한 상호관계에 교란이 생기면 섬유 모세포 양상으로 변형되고.<sup>16.17</sup> 세포기저막에 부착하지 못하면 세포고사(apoptosis)의 과정을 밟게 된다.<sup>14,18,19</sup> 망막색소상피와 부르크막의 내면에 있는 기저막과의 재 유착은 세포표면에 있는 B1-integrin subunit와 기

저막내에 존재하는 ligands와의 특수한 상호관계를 통해서 이루어지는데, 더욱이 망막색소상피세포의 유 착과 증식은 heparin과 성장인자뿐만 아니라 라미닌 (laminin, LN), 섬유결합소(fibronectin, FN), 4 형 교원질(collagen IV, CL-IV) 및 vitreonectin (VN)과 같은 세포외기질 단백분자에 의해 촉진될 수 있다.<sup>20,21</sup>

이에 저자는 손상된 부르크막에 이식된 망막색소상 피세포의 재유착성에 대한 연구에서 외부로부터 첨가된 세포외기질 단백의 영향을 알아보고자 하였다.

## 대상과 방법

#### 부르크막 절편의 제조

부르크막은 신선한 유색돼지 눈으로부터 분리하여 사용하였으며 본 연구자가 전에 시행했던 방법에 따라 제조하였다.<sup>22</sup> 제조과정을 간단히 설명하자면 약 12 mm 직경 크기의 공막-맥락막-부루크막-망막색소상피 복합체 절편을 만든 뒤, 공막부를 아래로 하여 24 well 바닥에 위치시킨 다음, 9 mm 직경크기의 Cloning cylinds (Scienceware, NJ, USA)와 4% agarose 용액을 이용하여 중앙 9 mm 직경의 망막색소상피 면 만을 노출시켰다. 이 후 건전한 기저막(basal lamina, BL)을 가진 부르크막을 얻기 위해서는 망막색소상피를 0.02 N ammonium hydroxide에 10분간 노출시켜 제거하였고, 반면 내콜라겐층(inner collagenous layer)이 노출된 손상 부루크막(d-BM)을 만들기 위 해서는 수술용 cellulose sponge로 절편의 표면을 고 르게 문질러 망막색소상피와 기저막을 제거하였다. 이 후 각 well은 phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, NY, USA)로 3번 씻은 뒤 실험에 사용될 때 까지 4℃에서 보관하였다.

#### 부르크막 절편표면의 세포외기질 단백도포

손상 부르크막을 다섯 군으로 나누었으며, 이중 한 군을 제외한 네 군의 표면을 각기 다른 세포외기질 단백으 로 처치하였다(fibronectin 20 μg/cm<sup>2</sup>, laminin 4 μg/cm<sup>2</sup>, collagen IV 20 μg/cm<sup>2</sup> 혹은 모두 혼합; Sigma, St. Louis, USA). 재유착성에 대한 연구를 위해 손상 부르크막을 다시 세 군으로 세분하여 각각 30분, 1시간, 2시간 동안 세포외기질 단백에 노출시켰 고, 형태학적 연구를 위해서는 각 기질단백에 2시간 동 안 노출시킨 뒤, 각 절편은 PBS로 3번 씻었다.

#### 망막색소상피세포 세포주 채집 및 배양

돼지안구를 소독 후 공막을 벗겨내고 맥락막을 노출시 킨 다음 25 U/ml의 dispase (Gibco, NY, USA)용 액으로 20분간 처리하였다. 이후 Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco, NY, USA)로 안구 를 씻고 맥락막-망막색소상피 복합체를 감각층 망막으 로부터 조심스럽게 분리하여 부르크막 위에 느슨하게 부착되어 있는 망막색소상피판을 떼어내어 모은 다음, 세포의 재유착성에 대한 연구를 위해서는 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, NY, USA)로 처리하여 개 개의 망막색소상피세포로 분리시킨 뒤 60 mm 배양접 시에 옮겨 배양된 세포를 이용하였고, 형태학적 연구를 위해서는 수확한 세포판을 잘게 쪼갠 뒤(직경: 0.5~ -1.0 mm) 8~10조각 씩의 작은 세포판들을 이미 만 들어진 각 부르크막 절편에 심었다. 배지는 15% fetal bovine serum (FBS; Gibco, NY, USA), 100 IU/mL penicilline G, 100  $\mu$ L/mL streptomycin, 5 uL/mL gentamicin. 2.5 uL/mL amphotericin B를 함유한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO2 및 95% 공기의 조건하에서 배양하였으며 이틀마 다 배지를 교환하였고 일차 계대배양된 세포를 재유착 성 연구에 이용하였다.

#### 재유착성 연구

부르크막 절편을 세포외기질 단백의 도포여부 및 종류 에 따라 건전한 기저막을 유지한 부르크막(BL-BM), 기질단백으로 처리되지 않은 손상된 부르크막(bare d-BM), 기질단백인 섬유결합소, 라미닌, 4형 교원질 단독, 혹은 전부로 coating한 부르크막(각각 FN-, LN-, CL- & cocktail of ECM-coated BM) 등 6 개 군으로 나누어 실험하였다. 각 군은 한 개의 24 well plate를 이용하여 기질단백에 노출된 시간에 따 라 3개 set(각 8 wells)로 나눈 뒤 일차 계대배양된 세포를 3×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 각 부르크막 절편에 심고 같은 조건하에서 밤 동안 배양하였다. 이 후 각 well을 PBS로 조심스럽게 씻어낸 다음 각 절편에 부착되어 살아있는 세포수를 MTT colorimetric assay (Roche, IN, USA)로 측정하였으며, MTT assay를 동시에 시행하기 위해서 노출이 끝나는 시간 대를 맞추도록 노출시점을 달리하였다. 전 실험과정을 2회 반복하였으며, 통계분석은 student-t test를 이 용하였다.

#### 형태학적 연구

망막색소상피세포를 심은 뒤 3일, 1주, 2주 및 4주째 각 군의 부르크막 절편을 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)으로 관찰하였다. 조직절 편을 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde 혼합 고정액에 고정한 후 0.1 M 인산 완충액으로 세척 한 다음 1% osmium tetroxide용액에 2시간동안 후 고정하고 다시 같은 완충액으로 세척하였다. 2% 탄닌 산에 12시간 전도염색을 실시하고 완충용액으로 세척 한 후 1% osmium tetroxide용액에 2시간 고정한 후 계열 에타놀로 탈수를, t-butyl alcohol로 침투를 시키고 동결건조기(Freeze dryer, Hitachi ES-2030, Japan)로 동결건조하였다. 건조된 시료를 시료관에 부착한 후 이온중착기(Ion sputter, Hitachi E-1030, Japan)를 사용하여 Pt-Pd합금으로 중착한 다음 Hitachi S-4200형 주사현미경으로 관찰하였다.

#### 결 과

부르크막으로의 재유착성에 대한 연구에서, 망막색 소상피세포의 재유착률은 기저막이 건전한 부르크막 (BL-BM군)에서 40~52%로 가장 높았으며, 기질단 백을 처리하지 않은 손상된 부르크막(bare d-BM군) 에서 가장 낮았다(16~20%). 기질단백으로 coating 된 부르크막(ECM-coated d-BM군)에서 재유착률은 28~37%로 BL-BM군에 비해 다소 낮았으나, bare d-BM에 비해서는 통계학적으로 유의하게 높았으며 (p<0.05), 부르크막에 대한 기질단백의 노출시간에 따 른 망막색소상피세포의 재유착률에는 큰 차이를 보이지 않았다(Table 1, Fig. 1).

주사전자현미경을 이용한 형태학적 연구에서, BL-BMs 과 여러 가지 기질단백으로 표면을 coating한 부르크 막(ECM-coated d-BMs)에 이식된 망막색소상피세 포편은 용이하게 유착된 후 활발하게 증식하여 시간이



Figure 1. Reattachment rate of the retinal pigment epithelial (RPE) cells onto the Bruch's membrane (BM). BL-BM=BM with basal lamina; B-BM=bare (ECM-uncoated); FN-BM=FN-coated; LN-BM=laminin-coated; CL-BM=collagen

갈수록 이식된 부르크막 표면을 메웠다(Fig. 2-4).

IV-coated; C-BM=ECM cocktail-coated.

세포를 심은 후 3일째 소견에서 망막색소상피세포는 기질단백으로 처리하지 않은 bare d-BM을 제외하고 는 대부분 부르크막에 쉽게 부착되어 편평해지는 양상 을 보였으며, 일부세포는 표면에 미세돌기를 가진 좋은 양상을 보였다. 반면 bare d-BM에 이식된 망막색소 상피세포편은 일부만이 느슨하게 유착되었고 이들 세포 도 대부분 모양이 둥글고 서로 응집되어 있었다(Fig. 2). 1주일 째 소견에서 망막색소상피세포는 BL-BM군 과 ECM-coated d-BM상에서 더욱 편평해지고 주위 로 신장되어 갔으며, 기질단백의 처리가 없었던 bare d-BM에서는 세포는 아래의 부르크막에 유착은 되어 있지만 여전히 둥근 모양을 하고 있었다(Fig. 3). 2주 일 째 소견에서 망막색소상피세포는 점차 부르크막의 전체표면을 덮어 갔으며 bare d-BM위에서도 세포의 증식은 일어났지만 일부 세포는 여전히 둥근 모양을 갖 고 있었고, ECM-coated BM에서 주변부의 일부세포 는 길쭉해지면서 섬유모세포 양상으로 변형되어 있었다 (Fig. 4).

Table 1	•	Reattachment	rate	of	the	retinal	pigment	epithelium	on	the	Bruch's	membrane
---------	---	--------------	------	----	-----	---------	---------	------------	----	-----	---------	----------

ECM <sup>*</sup> time	Type of treated Bruch's membrane and its reattachment rate(%)										
(min)	$\operatorname{BL}^{\dagger}$	Bare <sup>§</sup>	Fibrinogen	Laminin	CL-IV <sup>‡</sup>	Cocktail					
30	39.9±8.5	19.5±8.2	30.3±13.3	32.0±11.2	27.7±6.6	28.1±7.9					
60	52.0±12.9	18.0±9.9	30.2±15.5	28.1±14.0	24.7±3.9	27.5±6.6					
120	50.5±13.2	16.0±10.8	34.1±11.7	29.1±9.9	37.1±11.5	30.0±4.3					

\* ECM = extracellular matrix.

<sup>\*</sup> BL = basal lamina.

<sup>\*</sup> CL-IV = collagen-IV.

§ p<0.05 by Student's t-test.



Figure 2. Scanning electron microscopic findings of RPE sheets cultured on BMs 3 days after plating. (A) BM with BL (×250), (B) bare d-BM (×300), (C) FN-coated BM (×90), (D) LN-coated BM (×180), (E) CL-coated BM (×250), (F) ECM cocktail-coated BM (×180). RPE cells were readily reattached & flattened except on uncoated bare BM. BM =Bruch's membrane; BL=basal lamina; d-BM=damaged BM; FN=fibronectin; LN=laminin; CL=collagen IV; ECM=extracellular matrix.

4주째 소견에서 세포판 중앙에 위치한 망막색소상피 는 세포표면에 풍부한 미세돌기를 갖는 다각형의 전형 적인 상피세포의 양상을 나타내었지만, 주변부의 세포 는 대부분 모양이 크고 편평한 소견을 보였다(Fig. 5).

#### 고 칠

망막색소상피세포는 감각층 망막과 맥락막 사이에 위치하여 광수용체 및 맥락막모세혈관의 생존과 유지를 통한 시기능에 필수적인 역할을 한다.<sup>1</sup> 망막색소상피세 포의 이상은 일차적으로도 올 수 있지만 주위조직의 이 상에 이차적으로도 발생할 수 있다. 원인이 어떠하던 망막색소상피세포에 발생된 병적 이상은 시기능에 심각 한 영향을 줄 수 있으므로 망막색소상피세포의 기능을 되찾기 위한 치료방법의 하나로 망막색소상피세포 이식 을 시도할 수 있다.<sup>23,24</sup>

최근 수술수기 및 기구의 발전으로 망막색소상피의 망막하 이식은 성공적으로 시행되고 있지만 기능적인



Figure 3. Scanning electron microscopic findings of RPE sheets cultured on BMs 1 week after plating. (A) BM with BL (×90), (B) flat peripheral cells in A (×400), (C) bare d-BM (×500), (D) FN-coated BM (×180), (E) LN-coated BM (×180), (F) CL-coated BM (×130), RPE cells were much flattened and spreaded out on BM with BL & ECM coating. RPE cells on uncoated bare BM showed still round in shape. RPE=retinal pigment epithelium; BM=Bruch's membrane; BL=basal lamina; d-BM=damaged BM; FN=fibronectin; LN=laminin; CL=collagen IV; ECM=extracellular matrix.

성공을 위해서는 이식된 세포가 제 기능을 갖고 장기간 생존해야하는 문제점을 안고 있다. Algevere et al<sup>23</sup> 은 연령관련황반변성(AMD)환자에서 황반하로 망막색 소상피세포를 이식 후 초기에는 이식부위로 주시가 이 루어졌으나 3개월 후 그러한 주시가 없어졌다고 하였 다. 이것은 이식된 망막색소상피세포가 환자 눈에서 기 능을 잃었거나 더 이상 생존하지 않음을 시사하는데, 아마도 망막하강에서 발생한 면역거부반응, 혹은 이식 편이 숙주 부르크막으로의 영구부착이 실패한 때문일 것으로 생각하고 있다.

여러 동물실험에서 망막하로 이식된 망막색소상피세 포는 부루크막이 정상인 경우 잘 생존하였음을 보여주 었는데,<sup>25-27</sup> 즉 이식된 세포의 생존은 기질에 부착되는 세포의 능력에 달려있으므로, 만약 이식된 세포가 아래 에 위치한 부르크막에 빠른 재유착이 일어나지 않으면 세포는 고사과정을 밟게 된다.<sup>14,18,19,28</sup>

연령관련황반변성 환자에서 부르크막은 여러 가지 구조적 변형 및 생화학적인 변화로 인하여 이미 정상이



Figure 4. Scanning electron microscopic findings of RPE sheets cultured on BMs 2 weeks after plating. (A & B) BM with BL ( $\times$ 30,  $\times$ 90), (C & D) bare d-BM ( $\times$ 30,  $\times$ 250), (E & F) FN-coated BM ( $\times$ 30,  $\times$ 200), (G & H) LN-coated BM ( $\times$ 30,  $\times$ 70). RPE cells were getting to confluence except on uncoated BM. Note round cells on bare d-BM (D) & fibroblast-like cells on ECM-coated BM(F, H). RPE = retinal pigment epithelium; BM = Bruch's membrane; BL = basal lamina; d-BM = damaged BM; FN = fibronectin; LN = laminin; CL = collagen IV; ECM = extracellular matrix.

의 소견을 보였지만, 심하게 손상된 부르크막에서는 세 포의 분화가 일어나지 않았다고 하였으며, Castellarin et al<sup>30</sup>도 in vitro 실험에서 부르크막에 손상이 심할 수록 망막색소상피의 유착과 증식이 잘 이루어지지 않 았다고 보고한 바 있다. Tezel and Del Priore<sup>31</sup>는 부르크막의 충별 망막색소상피세포의 유착성에 대한 연 구에서 세포의 재유착률은 부르크막의 어느 층이 세포 유착에 관여하였는지에 달려있다고 하였는데, 즉 부르 크막의 표층일수록 유착률이 높고 층이 깊을수록 낮다 고 하였으며, 또한 Tezel et al<sup>32</sup>은 다른 연구에서 유 착된 세포의 고사율은 부르크막의 심층일수록 높고, 증 식률과 세포분열지수는 기저판(basal lamina)에서 가장 높다고 보고한 바 있다. 그러므로 부르크막에 손 상이 있거나 건전하지 못한 경우일지라도 이식될 부위 의 환경을 표층에 가깝게 개선하여 이식 세포의 부착성

아니므로 망막색소상피세포의 부착, 생존, 증식 및 생 물학적 기능에 장해를 주게 되어 망막색소상피세포 이 식에 한계성을 드러낸다.<sup>10-15</sup> 또한 연령관련황반변성 환자에서 수술로 제거한 맥락막신생혈관막에 망막색소 상피세포의 일부 기저막, 내콜라젠층, elastin 등이 포 함되어 있음을 보고한 바 있는데,<sup>13</sup> 이것은 수술 후 맥 락막신생혈관막이 존재하였던 부위에 기저막이 건전하 게 남아 있을 가능성이 적다는 것을 의미하고, 이러한 비정상적인 표면위로 망막색소상피세포를 이식할 경우 세포의 부착과 재증식이 일어나지 않을 수도 있음을 시 사한다.

Shiragami et al<sup>29</sup>은 토끼를 이용한 실험에서 부루 크막에 경도 내지 중등도의 손상을 줄 경우에는 망막하 로 이식된 세포의 성장 및 분화가 가능하여 수술 3~7일 후 정상적인 polarity와 치밀이음부(tight junction)





Figure 5. Scanning electron microscopic findings of RPE sheets cultured on BMs 4 weeks after plating. (A & B) BM with BL ( $\times 200$ ,  $\times 500$ ), (C & D) uncoated bare d-BM ( $\times 70$ ,  $\times 300$ ), (E & F) FN-coated BM ( $\times 500$ ), (G & H) LN-coated BM ( $\times 500$ ), (I & J) CL-coated BM ( $\times 500$ ,  $\times 200$ ). Note the central dome-shaped polygonal cells (A, E, G, I) and peripheral flat cells (B, F, H). Fibroblast-like cells and round cells were intermingled (J). On bare d-BM, RPE cells did not get confluence and most cells transformed to fibroblast-like cells. RPE = retinal pigment epithelium; BM = Bruch's membrane; BL = basal lamina; d-BM = damaged BM; FN = fibronectin; LN = laminin; CL = collagen IV.

만 좋게 한다면 재증식과 기능회복의 가능성을 높일 수 있겠다. 이렇게 하기 위해서 손상된 부르크막 표면에 유착인자인 세포외기질 성분의 보강을 생각할 수 있는 데, 여러 연구자들에 의하면 RPE세포의 부착과 증식 은 heparin과 성장인자(growth factors) 뿐만 아니 라 섬유결합소, 라미닌, 4형 교원질 및 다른 세포외기 질 성분에 의해 촉진될 수 있다고 하였다.<sup>20,21</sup>

본 연구에서는 외부에서 첨가한 세포외기질 성분이 손상된 부르크막 표면 위에 심어진 망막색소상피세포의 재유착과 증식을 높일 수 있는지를 알아보았다. 부르크 막으로의 재유착성에 대한 연구에서, 망막색소상피세포 의 재유착률은 기저막이 건전한 부르크막(BL-BM군) 에서 가장 높았으며, 기질단백을 처리하지 않은 손상된 부르크막(bare d-BM)에서 가장 낮았다. 기질단백으 로 도포된 부르크막에서 재유착률은 BL-BM군에 비해 다소 낮았으나, bare d-BM에 비해서는 통계학적으로 유의하게 높았으며(p<0.05), 부르크막에 대한 기질단 백의 노출시간과 성분에 따른 망막색소상피세포의 재유 착률에는 큰 차이를 보이지 않았다. 주사전자현미경을 이용한 형태학적 연구에서, BL-BMs과 여러 가지 기 질단백으로 표면을 도포한 부르크막(ECM-coated d-BMs)에 이식된 망막색소상피세포편은 용이하게 유 착된 후 활발하게 증식하여 시간이 갈수록 이식된 부르 크막 표면을 메웠다. 세포를 심은 후 3일째 소견에서 망막색소상피세포는 기질단백으로 처리하지 않은 bare d-BM을 제외하고는 대부분 부르크막에 쉽게 부착되어 편평해지는 양상을 보였으며, 일부세포는 표면에 미세 돌기를 가진 좋은 양상을 보였다. 반면 bare d-BM에 이식된 망막색소상피세포편은 일부만이 느슨하게 유착 되었고 이들 세포도 대부분 모양이 둥글고 서로 응집되 어 있었다. 시간이 경과할수록 BL-BM군과 ECMcoated d-BM상에서 망막색소상피세포는 더욱 편평 해지고 신장성이 좋아 점차 부르크막의 전체표면을 덮 어 갔으며 세포판 중앙에 위치한 망막색소상피는 세포 표면에 풍부한 미세돌기를 갖는 다각형의 전형적인 상 피세포의 양상을 나타내었지만, 주변부의 세포는 대부 분 모양이 크고 편평한 소견을 보였다. 반면 기질단백 의 처리가 없었던 부르크막의 경우에서 세포는 아래의

부르크막에 유착은 되어 있으나 여전히 둥근 모양을 하 고 있었고 세포를 심은 뒤 1주일까지는 증식되는 소견 을 보이지 않았으며, 이후 세포증식은 일어났지만 부르 크막 표면을 모두 채우지 못했고 대부분 세포들은 섬유 모세포 양상으로 변형되었다. 이러한 결과는 비록 부르 크막이 손상을 입었더라도 외부에서 유착인자인 기질단 백으로 표면을 처리하면 이식된 세포의 유착성과 증식 성 및 생존성을 호전시킬 수 있음을 시사한다. 본 연구 는 돼지의 안조직을 이용한 것이어서 여기서 나온 결과 를 인체에 그대로 적용을 할 수는 없지만, 인체조직을 이용한 연구에서 Del Priore et al<sup>33</sup>은 손상된 부르크 막의 표면을 세포외기질단백으로 도포하여 24시간동안 관찰했을 때 세포의 재유착성을 높일 수 있었다고 하였 으며, Tezel et al<sup>34</sup>은 나이든 비정상적인 부르크막 표 면을 세정액으로 재처리한 다음 세포외기질단백으로 도 포시 세포의 재유착성을 훨씬 높일 수 있었다고 보고한 바 있다. 향후 보다 성공적인 망막색소상피세포의 이식 을 위하여 부르크막의 충별 세포유착인자의 효과에 대 한 추가적인 연구와 세포의 유착성과 증식성을 보다 높 일 수 있는 인자의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Naumann GOH, Apple DJ. Pathology of the eye. New York: Springer-Verlag, 1986;245-8
- 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.
- Korte GE, Reppucci V, Henkind P. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25: 1135-45.
- Valentino TL, Fang SR, Berger A, Siverman MS. Retinal pigment epithelial repopulation in monkeys after submacular surgery. Arch Ophthalmol 1995;113:932-8.
- Del Priore LV, Hornbeck R, Kaplan HJ, et al. Debridement of the pig retinal pigment epithelium in vivo. Arch Ophthalmol 1995;113:939-44.
- 6) 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;629-643.
- Desai VN, Del Priore LV, Kapkan HJ. choriocapillaris atrophy after submacular surgery in the presumed ocular histoplasmosis syndrome. Arch Ophthalmol 1995;113:409-10.
- Nasir MA, Sugino I, Zarbin MA. Decreased choricapillaris perfusion following surgical excision of choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 1997;81:481-6.
- 9) 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.

- Sarks SH. Aging and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. Br J Ophthalmol 1976;60:324-41.
- 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.
- Green WR, Enger C. Age-related mecular degeneration histopathologic studies. Ophthalmology 1993;100:1519-35.
- Grossniklaus HE, Hutchinson AK, Capone A, et al. Clinicopathologic features of surgically excised choroidal neovascular membranes. Ophthalmology 1994;101:1099-111.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:391-405.
- 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.
- Ho TC, Del Priore LV, Kaplan HJ. En bloc transfer of extracellular matrix in vitro. Curr Eye Res 1996;15:991-7.
- 20) 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.
- 21) Song MK, Lui GM. Propagation of fetal human RPE cells: Preservation of original culture morphology after serial passage. J Cell Physiol 1990;143:196-203.
- 22) Kim KS, Kim YC, Kwon KY. Cultured morphology by tissue types of retinal pigment epithelial cells transplanted onto the Bruch's Membrane. J Korean Ophthalmol Soc 2005;46:528-40.
- 23) 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.
- 24) Del Priore LV, Kaplan HJ, Berger AS. Retinal pigment epithelial transplantation in the management of subfoveal choroidal neovascularization. Semin Ophthalmol 1997;12:45-55.
- 25) 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.
- 26) Lane C, Boulton M, Marshall J. Transplantation of retinal pigment epithelium using a pars plana approach. Eye 1989;3:27-32.
- 27) Sheedlo HJ, Turner E. Functional and structural characteristics

of photoreceptor cells rescued in retinal pigment epitheliumcell grafted retinas of RCS dystrophic rats. Exp Eye Res 1989;48:841-54.

- 28) 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.
- 29) Shiragami C, Matsuo T, Shiraga F, et al. Transplanted and repopulated retinal pigment epithelial cells on damaged Bruch's membrane in rabbits. Br J Ophthalmol 1998;82:1056-62.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Del Priore LV, Tezel TH, Geng L. Resurfacing of inner layers of human Bruch's membrane proteins adhesion of transplanted adult retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:S858.
- 34) Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:3337-48.

#### =ABSTRACT=

# Effects of Exogenous Extracellular Matrix Proteins on the Reattachment of Retinal Pigment Epithelial Cells

Kwang Soo Kim, M.D.<sup>1</sup>, Yu Cheol Kim, M.D.<sup>1</sup>, Se Jin Jeon, M.D.<sup>2</sup>

Department of Ophthalmology, Keimyung University, School of Medicine<sup>1</sup>, Daegu, Korea Saebit Eye Clinic<sup>2</sup>, Daegu, Korea

**Purpose:** To evaluate the effect of adding exogenous extracellular matrix (ECM) proteins on the reattachment of retinal pigment epithelium (RPE) to the damaged surface of Bruch's membrane (BM).

**Methods:** Porcine BM explants were divided into six groups: BMs with an intact basal lamina (bl-BM) and five damaged BMs (d-BM: bare & four ECM-coated). The d-BM was coated with ECM proteins (either fibronectin, laminin, collagen IV, or all). Primary RPE sheets were plated and cultured for each group of BM explants. The attached live cells were counted and examined with a scanning electron microscope after three days, as well as at 1, 2 and 4 weeks.

**Results:** The RPE reattachment rate was highest in bl-BM and lowest in uncoated d-BM. ECM-coated groups showed a lower reattachment rate than bl-BM, but when compared with the uncoated group, the reattachment rate was significantly increased (p<0.05). ECM-exposure time did not influence the reattachment rate of any of the groups. RPE cells plated on bl-BMs and ECM-coated d-BMs attached and proliferated well and achieved confluence over time. Even though most cells were flat and large in shape, some cells revealed a good morphology with microvilli on their surface. On the other hand, only some of the RPE sheets plated on the uncoated d-BM attached loosely and most cells remained round and clumped.

**Conclusions:** These results show that the addition of ECM proteins may increase the ability of RPE cells to reattach to the damaged BM surface, which would likely create a good morphology. J Korean Ophthalmol Soc 48(11):1537-1547, 2007

Key Words: Bruch's membrane, Exogenous extracellular matrix proteins, Retinal pigment epithelial cells

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