

토끼각막내피세포의 배양에 대한 성장인자의 효과

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 안과학교실

차 홍 원

=Abstract=

Effects of growth factors on rabbit corneal endothelial cell culture

Hungwon Tchah, M.D.

Department of Ophthalmology, University of Ulsan, Asan Medical Center

In order to investigate the effects of epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF) and transforming growth factor- β (TGF- β), rabbit corneal endothelial cells were cultured. After adding growth factors individually or in combination, DNA synthesis of corneal endothelial cells was measured. EGF and FGF increased DNA synthesis of corneal endothelial cells at all concentration tested (0.03ng/ml-300ng/ml) compared with the control. The maximum increase of DNA synthesis was shown at the concentration of 0.3-10ng/ml of EGF or 10-30ng/ml of FGF. TGF- β reduced DNA synthesis of corneal endothelial cells at all concentration tested (0.03ng/ml-10ng/ml). DNA synthesis of corneal endothelial cells was more increased when EGF and FGF were added in combination. TGF- β inhibited DNA synthesis induced by EGF or FGF when added at the same time. These results indicate that combination of EGF and FGF has maximum effect in DNA synthesis increase of rabbit corneal endothelial cells.

Key words; corneal endothelial cells, growth factors, DNA synthesis

서 론

각막의 투명성을 정상적으로 유지하기 위해선 각막의 수분함량조절이 필수적인데 각막내피의 Na-K pump가 이 수분함량조절에 중요한 역할을 담당하

고 있다¹⁾

인체의 각막내피세포는 쥐나 토끼의 각막내피세포와는 달리 in vivo 상태에서는 세포분열을 거의 하지 않으므로 각막내피세포가 손상되었을 때 주변의 세포가 커지면서 손상된 부위를 감싸주고 있다²⁻⁴⁾.

본 연구는 부분적으로 아산생명연구소 연구비의 보조로 이루어졌음.

그러므로 여러 외상으로 각막내피세포가 손상을 받을 때마다 이로 인하여 세포수는 감소하게 된다. 또 정상안에서도 외상없이 노화 현상으로 각막내피수는 나이가 들수록 감소한다. 이 세포수가 한계수치 이하가 되면 즉 단위세포가 한계 크기 이상으로 커지면 세포가 부전증(decompensation)에 빠져 각막의 수분함량조절에 이상이 생기고 이로인해 각막실질에 수분함량이 늘어나 각막이 불투명해질 수 있다. 이러한 인체 각막내피세포도 실험실내에서(in vitro) 조건만 맞으면 세포분열을 한다는 것이 알려져 있다⁵⁾.

각막내피세포는 또 각막이식수술의 성공을 결정짓는 매우 중요한 요소이다. 이식된 각막의 각막내피세포의 건강성에 따라 수술후 이식된 각막의 부종감소정도, 감소속도등이 영향을 받고 이는 다시 수술성공에 큰 영향을 미치기 때문이다. 그래서 수술적전까지 이식할 각막의 각막내피세포를 보다 건강하게 보존하고자 여러가지 저장용액이 개발되었고, 현재도 새로운 개발용액이 개발중이다.

이러한 저장용액에 어떤 물질을 첨가하여 각막을 보관시 각막내피세포의 세포분열을 촉진시켜 각막내피세포의 숫자를 늘리거나 또는 세포를 건강한 상태로 계속 유지 시킬 수 있다면 각막이식수술시 각막내피세포의 부전증으로인한 수술실패는 줄일 수 있을 것이다. 이러한 첨가물질로 여러 growth factor를 고려해 볼 수 있는데 epidermal growth factor(EGF)는 여러 표피세포의 증식을 촉진시키는 것으로 알려져 있고, fibroblast growth factor(FGF)는 주로 중배엽에서 유래된 세포의 증식을 촉진시킨다 한다. 이들 모두 각막내피세포의 증식도 촉진시킨다는 보고들이 있다⁶⁻⁸⁾. 한편 transforming growth factor- β (TGF- β)는 내피세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있는데 조건에 따라 그 효과가 크게 변화하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

본 실험에서는 EGF, FGF, TGF- β 를 각각 혹은 서로 적절농도로 혼합하여 각막배양액에 첨가하여 이 성장인자들이 각막내피세포 성장에 미치는 영향을 조사하여 각막내피성장을 최대로 촉진시키는 성장인자의 혼합비율, 농도들을 알아보아 새로운 각막저장용액 개발에 기초자료로 삼고자 한다.

재료 및 방법

1. 토끼 각막내피세포 배양

토끼각막내피세포배양은 이미 발표된 방법¹⁰⁾을 이용하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. 토끼(New Zealand White, 1.5-2.0Kg)의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨후 안구를 적출한다. 적출된 안구는 5% Betadine 용액에 3분간 담구어 살균시킨 후 ice-cold phosphate buffered saline(PBS)로 3-4회 세척하여 남아 있는 Betadine 용액을 없앤다. 그후 무균적으로 각막편을 약 1-2mm의 공막환과 함께 안구에서 분리한다.

각막내피세포 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Sigma, D-5523)에 아래물질을 첨가하여 1.35% chondroitin sulfate(Sigma, S-8529), 0.22% Sodium bicarbonate(Sigma, S-4019), 0.595% HEPES(Gibco, cat #845-1344 IN), 1% Penicillin/streptomycin 용액(Gibco, cat #600-1540 AG), 1% Sodium pyruvate, 10% Fetal calf serum(FCS, Gibco, cat #200-1640 AJ)이 되도록 한다.

이 배양액을 분리한 각막과 함께 평판 접시에 넣은 후, 95% 공기, 5% CO₂, 37°C 에서 1시간 배양후 각막을 꺼내어 serum이 첨가되지 않은 DMEM 배양액으로 2-3회 세척한 후 새로운 평판 접시에 각막의 내피쪽이 위에 오도록 잘 놓은 후 현미경하에서 Descemet막을 분리한다. 이 막을 0.25% trypsin(Gibco, 840-7250IL), 0.1% EDTA(Junsei chemical Co., LTd 890-1267IM)용액에 약 10분간 넣어 Descemet막으로 부터 내피세포를 분리한다. 내피세포분리 여하에 따라 한 두차례 더 trypsin을 처리한다. 내피세포는 4°C, 1700RPM으로 10분간 원심분리한후 10% FCS/DMEM 배양액으로 세포를 2×10⁵개/ml의 농도가 되도록 내피세포 농축액을 희석하여 25ml flask(Falcon 3013)에 약 5ml 넣고, 95% 공기, 5% CO₂, 37°C에서 배양한다. 이때 일주일에 2회씩 배양액을 갈아주며, 10여일간 배양시킨후 1:2의 비율로 계대배양을 실시한다.

2. 각막내피세포 DNA 합성 측정

이차계대 배양된 토끼각막내피세포를 0.25%

Trypsin-0.1% EDTA 용액으로 3분간 처리하여 세포가 flask에서 떨어지면 fetal calf serum이 포함된 배양액을 넣어 trypsin 작용을 정지시킨다. 이 세포 현탁액을 4°C 1700RPM으로 10분간 원심분리하여 세포를 모은후 10% FCS/DMEM 배양액과 혼합하여 24well(Costar 3524)에 well당 2×10^4 개/ml의 농도로 1ml씩 각각 분주한다. well plate를 95% 공기, 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 세포가 well에 부착 되기를 기다린다.

그후 각 well에 FCS이 없는 배양액을 넣고 EGF (Recombinant Murine EGF, Genzyme 1213-00), TGF- β (Human natural TGF- β Genzyme 1294-01), FGF(Bovine FGF R & D 133-FB)을 각각 첨가하여 각 well에서의 농도를 0.03ng/ml에서 300ng/ml까지 변화시킨다. 이때 오차를 줄이기 위해 3well당 같은 농도의 약제를 사용한다.

다시 이 well plate를 95% 공기, 5% CO₂, 37°C에서 48시간동안 배양한후, 3H-Thymidine(DU PONT, NET 027)을 well당 1 μ ci가 되도록 고르게 첨가하고 다시 95%공기, 5% CO₂, 37°C에서 18시간 배양한다. PBS나 plain DMEM용액으로 2번 정도 세포를 씻어준후 10% Trichloroacetic acid(TCA, Sigma, T-4885)를 well당 1ml씩 넣고 실온에서 2~10분간 방치한후 ethanol: ether=3:1를 섞은 용액으로 세척하여 well에 남아있는 TCA를 제거한다. 그후 실온에서 well 내부에 있는 용액을 말린후, 0.2N NaOH용액을 well당 500 μ l씩 넣고 110°C에서 10분간 고온처리를 하여 세포를 well에서 떼어낸다. 그후에 3ml vial에 1N HCl 100 μ l와 well에서 채취한 세포 용액을 섞고, aquasol-2 용액(DUPONT, NEN-240) 3ml를 더 넣어 잘 섞은후, β -counter 기계(Canbera Packrd)에 넣어 각 vial에서 나오는 β -ray를 측정했다. 이때 첫번 vial은 background로 aquasol-2 용액만 넣은것을 사용한다.

특정농도 약제의 초과는 세 well의 β -ray의 평균치를 구하여 측정한다.

결 과

1. 각 성장인자의 단독효과

EGF의 효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서

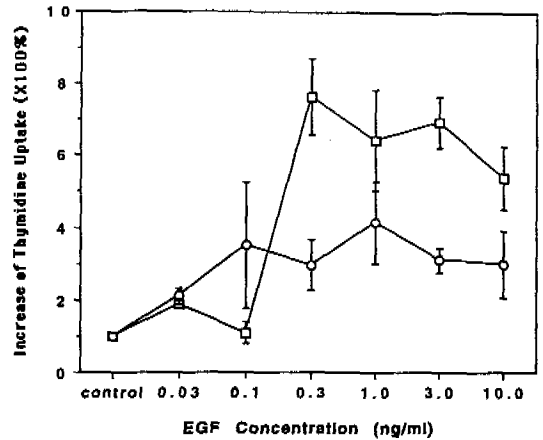


Fig. 1. Effect of EGF on Rabbit Corneal Endothelial Culture

EGF의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 EGF의 효과를 측정된 결과 EGF를 0.3-1ng/ml 농도로 첨가하였을 때 대조군에 비해 최대치인 약 4-7배의 각막내피세포의 DNA 합성증가가 있어 이때의 EGF 농도에서 각막내피세포 성장촉진 효과가 최대이었으며, 이보다 EGF의 농도가 증가하였을 때는 EGF에 의한 각막내피세포 성장촉진효과가 더이상 증가하지 않았고 같은 수준을 유지하거나 오히려 좀 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1). EGF를 1ng/ml에서 300ng/ml까지 첨가하여 조사한 군에서는 한번의 예에서는 Fig. 1과 마찬가지로 EGF를 1ng/ml의 농도로 첨가하였을 때에 대조군에 비해 가장 많은 (약 5 배) 각막내피세포의 DNA 합성증가를 보여 각막내피세포 성장촉진효과가 가장 컸고, 이보다 EGF의 농도가 증가하였을 때는 EGF에 의한 각막내피세포 성장촉진효과가 더이상 증가하지 않았고 같은 수준을 유지하였다(Fig.2). 그러나 다른 예에서는 EGF를 10-30ng/ml의 농도로 첨가하였을 때 최대의 각막내피세포 성장촉진효과를 보였고 이보다 더 EGF의 농도가 더 증가할 때 EGF에 의한 각막내피세포 성장촉진 효과는 오히려 좀 감소하는 경향을 보였다 (Fig.2).

FGF의 효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서 FGF의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 FGF의 효과를 측정된 결과 FGF의 농도가 1ng/ml

이 되도록 첨가한 군에서 대조군에 비해 약 4배 가

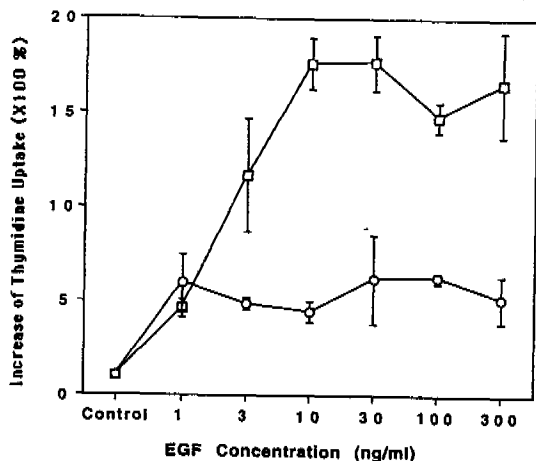


Fig 2. Effect of EGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

량의 각막내피세포 DNA 합성증가가 있었다. FGF 농도가 높아질수록 각막내피세포 DNA 합성증가 효과는 증가하여 10ng/ml을 첨가한 경우엔 한 예에선 약 8배, 다른 한 예에선 약 15배 증가하여 이 농도의 FGF에 의해 각막내피세포 성장촉진효과가 가장 컸다(Fig. 3). FGF를 1ng/ml에서 300ng/ml까지 고

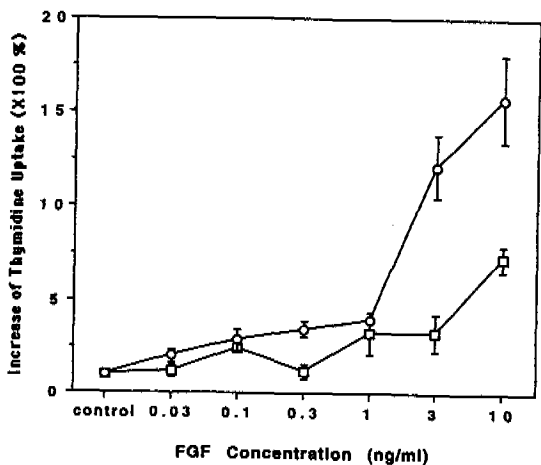


Fig 3. Effect of FGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

농도로 첨가하여 각막내피세포 성장촉진효과를 조사한 군에서는 Fig 3과 유사하게 FGF를 10-30ng/ml의 농도로 첨가하였을 때에 대조군에 비해 가장 차이가 나게 약 40-45배의 각막내피세포의 DNA 합성증가를 보였고 이보다 FGF의 농도가 증가하였을 때

는 FGF에 의한 각막내피세포 성장촉진효과가 더 이상 증가하지 않았고 오히려 좀 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

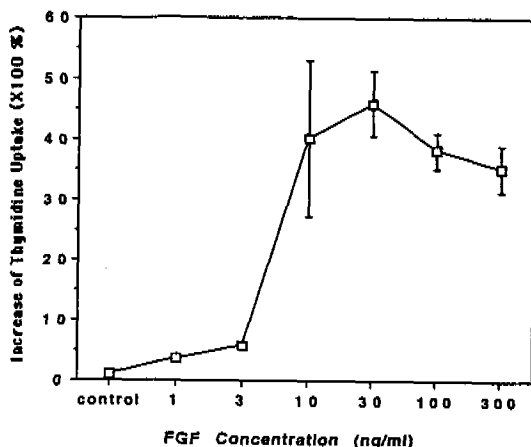


Fig 4. Effect of FGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

TGF- β 의 효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서 TGF- β 의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 TGF- β 의 효과를 측정된 결과 한 예에서 TGF- β 의 농도가 0.03ng/ml이 되도록 첨가한 군에서 대조군에 비해 각막내피세포 DNA 합성증가가 있었으나 그 정도는 1.3배로 미미하였고 TGF- β 를 첨가한 다른 모든 예에서는 각막내피세포의 DNA 합성이 대조군에 비해 감소하여, TGF- β 에 의한 각막내피세포의 성장촉진효과는 관찰되지 않았다. TGF- β 의 농도가 증가할수록 각막내피세포의 DNA 합성은 더욱 감소하였다(Fig. 5).

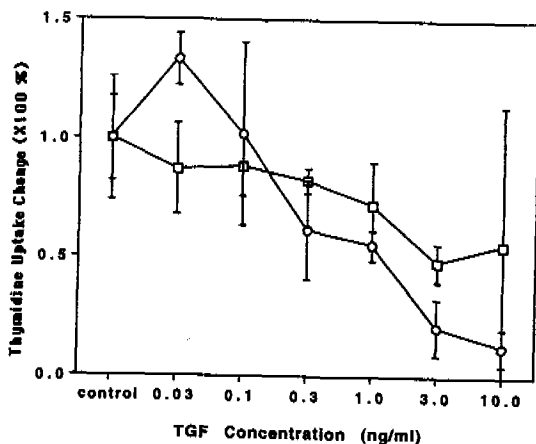


Fig 5. Effect of TGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

2. 각 성장인자의 병합효과

EGF와 FGF의 병합효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서 FGF의 농도를 1ng/ml와 10ng/ml로 고정하고 EGF의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 각막내피세포 배양에 대한 EGF와 FGF의 병합효과를 측정된 결과 각막내피세포의 DNA합성은 FGF 농도가 10ng/ml이고 EGF의 농도가 0.3ng/ml일때 대조군보다 약 90배까지 증가하였고 EGF농도가 1-3ng/ml일때는 대조군보다 약 70배 증가하여 각막내피세포 성장촉진 효과가 EGF와 FGF를 단독으로 첨가하였을때 보다 컸다(Fig.6).

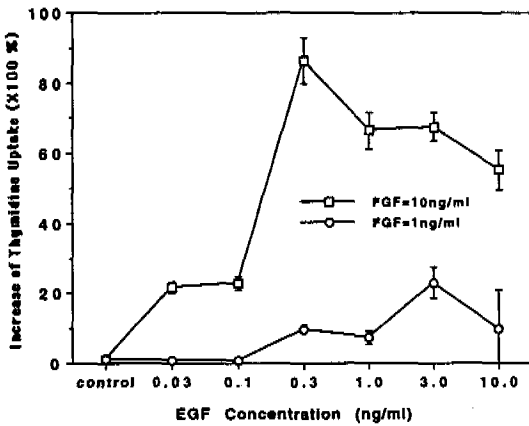


Fig 6. Effect of EGF and TGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

FGF의 농도를 1ng/ml로 하였을때는 EGF의 농도가 3ng/ml일때 각막내피성장촉진효과가 제일 컸다. 이러한 각막내피세포 성장촉진효과를 EGF의 농도를 3ng/ml이상으로 증가시켜도 더 커지지는 않았다(Fig 6).

EGF와 TGF-β의 병합효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서 TGF-β의 농도를 1ng/ml로 고정하고 EGF의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 각막내피세포배양에 대한 EGF와 TGF-β의 병합효과를 측정된 결과 각막내피세포의 DNA합성은 EGF의 농도가 0.1ng/ml이하일 때는 대조군에 비해 오히려 약간 합성이 감소하는 현상을 보였다. EGF의 농도가 0.3ng/ml이상에서도 TGF-β(1ng/ml)와 같이 첨가하였을 때는 각막내피세포의 DNA합성은

대조군에 비해 증가하지 않았다.(Fig 7).

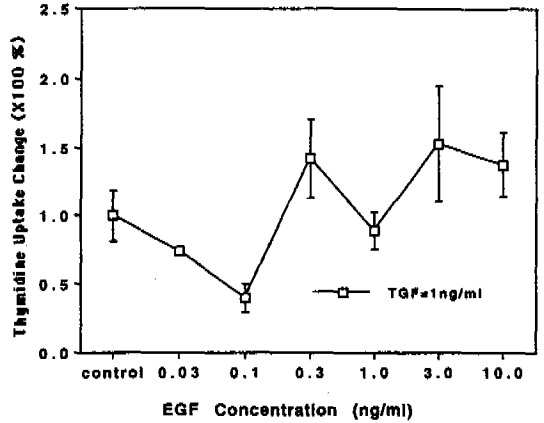


Fig 7. Effect of EGF and TGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

FGF와 TGF-β의 병합효과 : 토끼각막내피세포를 배양하면서 TGF-β의 농도를 1ng/ml로 고정하고 FGF의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 각막내피세포배양에 대한 FGF와 TGF-β의 병합효과를 측정된 결과 각막내피세포의 DNA합성은 FGF의 농도가 0.3ng/ml이하일 때는 증가현상이 없었고 오히려 약간 합성이 감소하는 현상을 보였다. FGF의 농도가 1ng/ml이상에서는 TGF-β와 같이 첨가하였어도 DNA합성증가가 있었으나 합성증가폭은 FGF를 단독으로 사용하였을 경우보다는 그 폭이 낮았다 (Fig. 8).

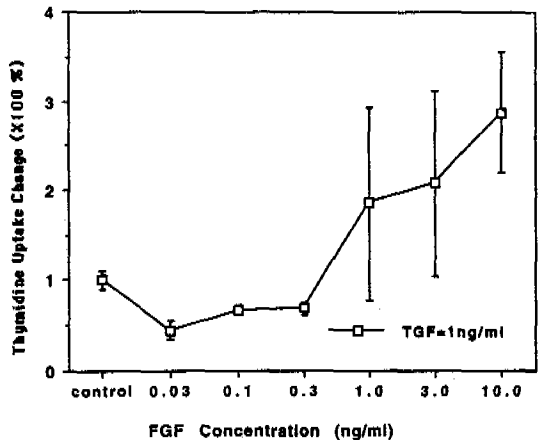


Fig 8. Effect of FGF and TGF on Rabbit Corneal Endothelial Cell Culture

고 찰

EGF는 Cohen등에 의해서 생쥐의 악하선에서 처음 분리된 물질로 53개의 아미노산 polypeptide (MW. 약 6KD)로 구성되어 있다^{11, 12)}. 사람에서는 소변, 타액, 유액에서 주로 검출되고, 혈액내에서도 소량 존재하는 것으로 알려져 있다. 또 눈물에서 0.7-8.1ng/ml방수에서 0-1.3ng/ml 농도로 검출되는데 안구내에선 각막상피, 내피, 실질세포, 누선등에서 EGF의 messenger RNA가 발견되어 이러한 곳에서 생성되는 것이 아닌가 추측하고 있다¹³⁻¹⁶⁾. EGF는 주로 상피조직 세포의 증식을 촉진시키는 효과가 있는데 혈관내피세포등에서도 증식을 촉진시키는 효과가 있다.

각막내피세포 배양액에 EGF를 첨가한 경우 첨가하지 않는 경우 보다 각막내피세포의 증식이 5-10배 가량 촉진되었다. 그러나 EGF가 10ng/ml-30ng/ml를 초과한 경우엔 더 이상 세포증식 촉진 효과가 나타나지 않았는데 이는 아마도 내피세포의 EGF수용체가 이미 포화상태에 이르러 더 이상 효과를 발휘하지 못하는 것으로 추측된다. 이러한 세포증식효과는 기존의 보고들^{7, 17, 18)}과 일치하나 증식효과의 효율면에서는 서로 상이점이 많다. 본 실험에선 이차계대 배양된 토끼 각막내피세포를 이용하였는데 계대배양되지 않은 각막내피세포를 이용하였을때(예비실험)는 오히려 EGF의 효과가 약간 저하되는 양상을 보였다. 이러한 점들로 미루어 보아 세포상태와 조건에 따라 EGF의 효과의 정도가 다르게 나타날 수도 있으리라 생각된다. 그러나 최대의 증식효과를 나타내는 EGF의 농도는 본실험에서는 공히 0.3-10ng/ml로 향후 실험에서 EGF의 농도가 1ng/ml이면 최대의 각막내피세포증식 효과를 나타낼수 있다고 하겠다.

FGF는 Gospodarowicz^{19, 20)}에 의해 뇌하수체에서 처음 분리되었는데 염기성(basic)과 산성(acidic)의 2가지 형태로 존재하여 혈관의 내피세포같은 중배엽에서 유래된 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 분자량은 염기성 FGF는 15-16KD, 산성 FGF는 15-15.5KD²¹⁻²³⁾이다. 눈에서 발견되는 FGF는 주로 염기성 FGF이다. 본 실험에선 사용된 FGF도 염기성 FGF이다. 각막내피 세포배양

액에 FGF를 첨가한 경우 각막내피세포의 증식효과가 약 10배 가량 증가하였다. 김¹⁷⁾등은 배양된 토끼 각막내피세포에서 FGF의 성장촉진효과를 측정한 결과 FGF는 아무런 효과가 없다고 보고하였고 Gospodarowicz⁷⁾는 FGF가 100ng/ml에서 최적의 효과가 있다 하였으나 본 실험에서는 FGF에 의한 각막내피성장촉진효과가 EGF에 의한 성장촉진보다 오히려 약간 강하였으며 FGF의 농도가 10-30ng/ml일때 최대의 증식효과를 보였다. 이는 아마도 각막내피세포의 조건이 다르거나 사용한 FGF의 종류가 다르기 때문이라 생각된다. 그러나 FGF에 의한 각막내피성장촉진은 확실한 사실로 생각된다.

TGF-β는 분자량 25KD의 polypeptied로 현재까지 4종류가 알려져 있다⁹⁾. 이 물질은 fibroblast의 증식을 촉진하는 효과가 있으나 대부분 세포에선 증식억제효과를 나타내는데 소의 각막내피세포를 이용하여 TGF-β의 효과를 측정한 Muller등⁸⁾은 이 물질이 각막내피세포증식을 억제한다 하였으나 Plouet등²⁴⁾은 1ng/ml이하의 농도에선 각막내피세포배양을 증진시키고 그 이상의 농도에선 억제 한다고 하였다. 본 실험에선 TGF-β의 농도를 0.03ng/ml에서 10ng/ml까지 변화시켜 실험하였는데 TGF-β농도가 1ng/ml이하에서도 각막내피세포 증진을 억제시켜 Muller등⁸⁾과 유사한 결과를 얻었다. TGF-β의 각막내피세포 증진 억제 효과는 농도가 증가할수록 더욱 현저하였다.

TGF-β는 다른 성장인자의 활동을 조절한다는 보고도 있는데 FGF에 의한 신생혈관촉진효과를 TGF-β가 억제하며, FGF에 의한 osteoblast 증식효과를 촉진시키는 것이 좋은 예이다^{8, 25)}. 각막내피세포에선 TGF-β가 EGF의 FGF의 세포증식촉진효과를 향상시키는 것으로 보고²⁴⁾되었으나 본 실험에선 TGF-β가 오히려 EGF가 FGF의 세포증식효과를 억제하였다. 이는 Muller등⁸⁾의 결과와 일치한다. Plouet등²⁴⁾은 TGF-β가 1ng/ml일때 FGF의 효과를 보다 촉진시킨다고 하였으나 본 실험에선 TGF가 0.03-10ng/ml일때 전농도에 걸쳐 FGF의 작용을 억제하였다.

EGF와 FGF를 같이 투여한 경우엔 FGF의 농도가 10ng/ml이고 EGF의 농도가 0.3-3ng/ml일때 최적의 세포증진 효과로 보였는데 이는 FGF, EGF단

독으로 투여 할때의 효과 보다는 월등 우수한 것이었다. 단독으로 투여시 최적의 세포증식 효과를 나타내는 각각의 농도로 두 물질은 동시에 투여하는 것이 각막내피세포 증식에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 이는 각막내피세포내의 EGF와 FGF수용체가 서로 따로 작용하고 있음을 의미하는 것이며 서로간에 synergy효과가 있음을 할 수 있다.

TGF-β는 상처회복과정의 여러단계에 관여하는 것으로 알려져 있으나 각막내피상처 치유과정에 관여하는지는 아직 확실하지 않다. 설사 관여한다하더라도 각막내피 세포의 증식을 촉진시키는 것이 아닌 것은 이 실험의 결과로 알 수 있었다. 각막을 각막저장용액에 보관시에는 실제로 각막내피의 상처를 유발하여 치유되게 하는 과정이 아니며 TGF-β는 세포 증식에도 효과가 없으므로 각막저장용액에 이 물질의 첨가는 고려해 볼 필요가 없을 것이다. EGF와 FGF는 각막내피세포를 증식시키는 효과가 있는 것은 확실하며 그 효과는 같은 농도일 경우 FGF가 더 크다는 것을 알 수 있었다. 이들 성장요소들은 세포증식효과 이외에도 세포의 형태를 변화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있는데 EGF는 내피세포에서 생성하는 collagen의 종류에는 영향을 끼치지 않으나 FGF는 생성되는 collagen종류에 영향을 주며, 세포를 fibroblast같은 모양으로 변화시킨다²⁶⁾. 그러나 이는 in vitro상태에서 측정된 것으로 특별히 손상이 없는 각막내피세포가 in vivo에서 이러한 형태학적 변화 및 collagen 형성 변화를 가져오는지는 알 수 없다. 각막저장용액에 이 성장요소는 첨가하기 전에 미리 이러한 점을 좀더 연구해 보아야 할 것이라 생각한다. 현시점에서 세포증식면에서만 보면 EGF와 FGF는 혼합하여 이용하는 것이 효과를 극대화 할수 있으나 상기 기술한 이유등으로 EGF는 단독으로 사용하는 것이 좀더 가능한 방법이라 생각한다.

끝으로 성장인자를 각막저장용액에 첨가하기 전에 한가지 고려해야 할것은 성장인자에 의한 MHC항원의 변화이다. MHC항원은 각막거부반응에 주된 항원으로 작용하는데 Tchah등의 보고²⁷⁾에 의하면 EGF등이 각막세포등의 MHC발현도를 변화시킬 수 있다 하였으므로 이에 대한 연구도 더 필요하리라 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Lim J : Na⁺ transport across the rabbit corneal endothelium. *Curr Eye Res* 1981;1:255-258.
- 2) Dohlman CH : Physiology of the cornea. In : Smolin G, Thoft RA, ed. *The cornea*. 2nd ed, Boston/Toronto, Little, Borwn and Company, 1987;pp.3-14.
- 3) Capella JA : Regeneration of endothelium in diseases and injured cornea. *Am J Ophthalmol* 1972;74:810-817.
- 4) Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL : Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol* 1976;94:1791-1796.
- 5) Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Lei-bowitz HM : Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. *Ophthalmol* 1984;91:1129-1134.
- 6) 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* 1989;30:1991-1996.
- 7) Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR : Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* 1977;25:75-89.
- 8) Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Bohlen P, Birchmeier W : Inhibitory action of transforming growth factor-β on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5600-5604.
- 9) Lyons RM, Moses HL : Review, Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990;187:467-473.
- 10) 차홍원 : 각막내피세포의 배양. 조직세포 배양법. 이재담(공저) : 1994;P31-56, 군자출판사.
- 11) Cohen S : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-1562.

- 12) Savge C, Hash J, Cohen S : Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1989;218-253.
- 13) Parelman J, Nicolson M, Pepose JS : Epidermal growth factor in human aqueous humor. *Am J Ophthalmol* 1990;109:603-604.
- 14) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Wata nabe H, Kinoshita S, Manabe R, Oshiden K, Yanaihara C : Presence of epidermal growth factor in human tears, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(suppl):55.
- 15) Gospodarowicz D, Mescher AI, 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* 1977;25:631-649.
- 16) Fabricant RN, Alpar AJ, Centifanto YM, Kaufman HE : Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1981;99:305-308.
- 17) 김기산, 한덕기 : 배양가토각막내피세포의 창상 치유에 대한 Fibronectin, Hyaluronic acid 및 Growth factors의 효과. *한안지* 1992;33:430-456.
- 18) Samples JR, Binder PS, Nayak S : Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors. *Exp Eye Res* 1991;52:121-128.
- 19) Gospodarowicz D : Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature (London)* 1974;249:123-127.
- 20) Gospodarowicz D : Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* 1975;250:2515-2520.
- 21) 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* 1985;4:1951-1956.
- 22) 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* 1984;81:5364-5368.
- 23) 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* 1985;122:323-393.
- 24) Pluet J, Gospodarowicz D : Transforming growth factor β -1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells. *J Cell Physiol* 1989;141:392-399.
- 25) 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* 1987;105:957-963.
- 26) Kay EP, Gu X, Ninomiya Y, Smith RE : Corneal endothelial modulation : A factor released by leukocytes induces basic fibroblast growth factor that modulates cell shapes and collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:663-672.
- 27) Tchah H, Holland EJ, Pearlstein CS, Skelnik D, Chan CC, N : M, Lindstrom RL : Modification of corneal MHC antigen expression by various corneal storage methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989 ; 30(supp) : 342.