

TGF- α , - β_1 , and bFGF mRNA Expression of Lens Epithelial Cells in Senile and Diabetic Cataract

Bum Noon Hwang and Jun Her[†]

Department of Ophthalmology Busan Paik Hospital, Inje University

Anterior subcapsular cataract was developed by opacification with transdifferentiation and abnormal proliferation of lens epithelial cells (LECs) and pathological accumulation of extracellular matrix (ECM). After-cataract also be caused by a similar transdifferentiation of LECs remaining after surgery and the accompanying increase of ECM deposits. It is known that prostaglandin E2 and cytokine, such as TGF- β , bFGF, and IL-1, were associated with abnormal proliferation and transdifferentiation of LECs. The aim of this study was to detect the expression of transforming growth factor- α (TGF- α), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in LECs of senile and diabetic cataract. The expressions of these growth factors in lens epithelial cells were determined. The sample for growth factor determination were collected in senile cataract patients without metabolic disorder, especially diabetes mellitus and diabetic cataract patients. The mRNA expression of growth factors was detected by semi-quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by Southern blot analysis. Statistics were analysed using Wilcoxon rank sum test. Semi-quantitative RT-PCR/southern analysis of RNA obtained from thirty surgical specimens demonstrated that the level of mRNA expression of TGF- α , - β_1 and bFGF was increased in diabetic cataract lens tissues compared with senile cataract specimens but non-significant, bFGF and TGF- β_1 mRNA expression were detected in most patients, expression level of TGF- β_1 was most high on the basis of normal ocular concentration. Detection rate of TGF- α in diabetic cataract was 1.5 fold higher than in senile cataract ($P=0.098$). TGF- α , TGF- β_1 , and bFGF mRNA expression of LECs were detected in senile and diabetic cataract. In both patient groups, expression level of TGF- β_1 mRNA was high, so we suggest TGF- β_1 strong influence in development of senile cataract and of diabetic cataract also. TGF- α expression level was similar but more frequently detected in diabetic cataract than in senile cataract. In conclusion, TGF- α may be associated with early development of diabetic cataract.

Key Words: Growth factor, Lens epithelial cell, Senile cataract, Diabetic cataract

서 론

백내장은 수정체의 혼탁을 말하며, 안과영역에서 가장 흔한 시력저하 및 실명의 원인이 되는 질병이다. 60세가 지나면서 그 발생빈도가 급격히 증가하고, 그 진행 및 혼탁정도 역시 현저히 증가하는 성인병으로 의학기술의 발달로 인한 노령화 시대를 맞이하여 백내장이 안질환에 접하는 비율은 해마다 증가하는 추세이다. 백내장을 발생시키는 요인으로

연령 증가, 유전적 요인, 대사성 질환, 영양결핍, 약물, 방사선, 자외선, 적외선과 가시광선, 그리고 외상을 들 수 있으나 발병의 정확한 기전은 아직 알 수 없을뿐 아니라 그에 대한 예방도 거의 알려져 있지 않은 실정이다.

정상적인 수정체는 매우 잘 정렬되어 있는 두 가지의 세포, 섬유세포와 상피세포로 구성되어 있다. 상피세포만이 분화증식할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 분열된 세포가 앞쪽의 분화구역이라 불리는 부위에서 수정체 적도부위로 이동하면서 세포모양이 길어지고 섬유세포로 분화된다. 이때 수정체 상피세포의 섬유세포로의 분화의 이상이나, 비정상적인 증식, 그리고 세포외기질의 병적 축적에 의해 수정체의 투명성이 상실됨으로써 백내장이 발생된다. 또한 백내장 수술 후 발생하게 되는 후낭의 혼탁은 주로 적도부위에 잔존하는 수정체 상피세포의 증식, 후낭으로의 이동, 그리고 섬유모세포로의 화생과 함께 이들 세포로부터 비정상적인 콜라겐합성 등에

*논문 접수: 2002년 7월 22일

수정재접수: 2002년 9월 24일

[†]별책 요청 저자: 허준, (우) 614-735 부산광역시 진구 개금동 633-165번지, 인제대학교 의과대학 부산백병원 안과학교실

Tel: 051-890-6016, Fax: 051-890-6329

e-mail: hereye@ijnc.inje.ac.kr

*이 논문은 2001년도 인제대학교 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

의해 발생하는 것으로 알려져 있다.

수정체의 이러한 백내장성 변화와 후낭혼탁의 원인은 세포 증식과 분화를 조절하는 cytokine network의 변화에 기인한다고 생각되어 지고 있는데 TGF- α , - β , FGF, insulin-like growth factor (IGF), interleukin-1, -6 (IL-1, 6) 등이 주로 관계하는 것으로 알려져 있다.

이 중 Fibroblast growth factor (FGF) family는 정상적인 수정체의 기능을 유지하는데 중요하다²⁾. Acid fibroblast growth factor (aFGF)와 basic fibroblast growth factor (bFGF)는 수정체의 투명성을 유지하는데 중요한 α -, β -, 그리고 γ -crystalline의 발현을 증가시키며, 증식된 상피세포가 섬유세포로 분화하는데에 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다^{5,36)}.

TGF- α 는 다기능성 세포조절 단백질로 세포의 성장과 분화를 조절하며 창상치유에 있어 중요한 역할을 할뿐 아니라¹⁰⁾ 백내장 수술 후의 수정체상피세포의 증식과 분화에도 일정 부분의 역할을 한다고 알려져 있다³³⁾.

TGF- β family는 인공수정체의 퇴행성 변화와 수정체상피세포 배양시 백내장성 변화를 유발한다²⁵⁾. 뿐만 아니라 전낭하 백내장에서 관찰되는 α -smooth muscle actin (α SM)과 type I collagen이 TGF- β 처리를 한 수정체나 인공수정체에서 관찰되어져 TGF- β 의 변화가 백내장의 발생에 중요한 인자로 작용할 것으로 생각되고 있다^{15,42)}.

당뇨병은 수정체의 생리적 변화를 유발할 뿐만 아니라 백내장성 변화를 일으키게 되어, 당뇨병을 앓고 있는 사람의 수정체에서는 나이와 연관되어 빛의 산란이나 형광수차가 더 많이 증가된다. 당뇨병 환자에서 백내장은 당뇨병의 이환시기가 길수록, 그리고 여자일수록 더 높은 이환율을 나타내며, 노인성 백내장에 비하여 진행속도가 빠르다. 당뇨병에 의한 백내장은 형태학적으로는 단순한 노인성 백내장과 큰 차이를 보이지 않는다. von Heyningen과 Harding은 case control study를 통하여 50~79세 사이의 연령층에서 백내장의 발병률이 당뇨병을 앓고 있는 경우 정상인보다 높다고 하였으며³⁾, Hiller 등은 당뇨병의 이환시기와 백내장의 연관성을 이용하여 당뇨병에서의 백내장도 당뇨망막병증과 같이 당뇨합병증 중 하나임을 증명하였다³⁾. 소아 당뇨병에서의 백내장은 수정체에 축적되는 sorbitol에 의한 삼투압 변화로 발생한다. 그러나 성인 당뇨병에서의 경우 수정체내의 sorbitol이 증가하지만 그 양이 삼투압에 의한 조직의 손상을 유발할 수 있는 정도가 아니어서 다른 발병기전이 있을 것이라 추측되나 정확한 원인은 아직 밝혀져 있지 않다³⁾.

Lowe 등은 당뇨 쥐의 연구에서 안구내 성장인자의 mRNA level이 변화하며, 이때 bFGF, IGF-1 등의 mRNA level이 주로 변화되었다고 하였다²⁶⁾. 결과는 IGF-1 mRNA는 감소하였으나 반대로 bFGF는 증가하여 당뇨병의 안과적 합병증의 발생에 있어 cytokine의 변화가 일정 부분 영향을 미칠 것이라

고 하였다.

이상의 결과에서 보면 당뇨병에서 발생하는 백내장은 단순한 노인성 백내장과 비교해 볼 때 병리학적 소견과 발생 양상은 비슷하지만 그 발병기전은 다를 것으로 추측되지만 그 구체적인 증거는 없는 상태이다. 그리고 여러 성장인자들이 수정체상피세포의 백내장성 변화와 연관이 있다고 하나 당뇨병과 연관된 백내장에서의 cytokine과 growth factor의 발현에 대한 보고는 아직 없는 실정이다.

이 연구에서는 백내장 수술시 원형전낭절개로 얻은 전낭을 대상으로 당뇨병성 백내장과 노인성 백내장의 수정체상피세포에서 cytokine의 mRNA 발현양상을 분자기법을 통하여 비교 분석하고자 하였다. 이러한 cytokine의 역할을 규명하는 연구는 백내장의 억제와 후발성 백내장의 예방을 위한 치료에 도움을 줄 것이다.

재료 및 방법

1. 실험 대상

증식당뇨망막병증으로 유리절제술을 실시한 환자에서 수정체에 백내장성 변화를 보이는 환자 15례를 대상으로 하였고, 대조군으로는 당뇨병 등 다른 대사성 질환이 없는 노인성 백내장 환자 15례를 대상으로 하였다. 총 30례의 수술예정인 환자를 술전에 세극등현미경으로 조사하여 백내장의 형태를 구분하였다.

백내장 수술과정중 점탄물질을 전방에 주입하고 포셉으로 원형전낭절개를 하여 수정체상피세포가 붙어 있는 상태로 수정체 전낭을 채취한 후 즉시 cryovial에 넣어 액화질소용기에 냉동시킨 다음 RNA를 추출하기 전까지 -80°C 동결보관하였다.

연령분포는 당뇨병성 백내장 환자는 44~66세로 평균 55.9세였고, 남자 6례, 여자 9례였으며, 노인성 백내장 환자는 62~87세로 평균 71.5세였고, 남자 7례, 여자 8례였다.

2. 연구방법

1) 총 RNA 추출

Qiagen사의 total RNeasy kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 각 조직의 total RNA를 추출하였다. 1% mercaptoethanol이 첨가된 용해 완충제 1 ml를 조직에 첨가한 후 조직파쇄기 (Biospec product, WI, USA)로 조직을 완전히 파쇄하였다. 파쇄된 조직액을 QIAshredder 칼럼 (Qiagen, Germany)에 옮긴 후 10,000 x g에서 2분간 원심분리시켜 상층액을 회수한 다음, 70% 에탄올을 동일 부피로 첨가하여 RNeasy 칼럼에 loading 하여 resin에 RNA를 결합시켰다. 세척 완충제로 3회 세척한 후 3차 증류수로 RNA를 용출하였다. 실험에 사용하기 전까지 3 M sodium acetate와 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에서

보관하였다. RNA의 추출정도를 확인하기 위하여 0.8% agarose gel에 전기영동을 하여 4.7 kb와 1.8 kb의 ribosomal RNA band를 확인하였다.

2) Oligonucleotide primer 및 probe의 합성

각각의 cytokine에 특이적인 primer 염기서열은 Table 1에 표시하였다. Genomic DNA와 cDNA간의 증폭을 구분하기 위해 적어도 하나 이상의 intron이 포함되는 exon 부위를 primer로 설정하였다. Southern blot hybridization에 사용할 probe들은 선정된 primer들 사이에 존재하는 intron을 제외한 exon 부위에서 특이도가 50~60% 이상되는 부위로 설정하였다. 설정된 primer와 probe의 합성은 바이오니아(한국)에 의뢰하여 합성하였다. 각 primer 쌍을 사용하여 나타나는 RT-PCR 산물의 크기는 Table 1에 표시하였다.

3) First strand cDNA의 합성

약 2 µg의 total RNA에 oligo (dT) 2 µg을 넣고 70°C에서 10분간 전 처리한 후, 1 mM dNTP (Takara, Japan), 200 unit Moloney murine leukemia virus (MMLV) 역전사효소 (promega, USA)와 1x 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT)을 최종 25 µl가 되게 넣고 42°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 역전사효소의 활성을 제거하기 위해 95°C에서 5분간 열변성시켰다.

4) 증합효소 연쇄반응

증합효소 연쇄반응은 Premix PCR kit (바이오니아, 한국)를 이용하였다. DNA polymerase 2.5 unit, 1 mM dNTP가 있는 반응액에 합성된 cDNA 2 µl와 primer 쌍 20 pmol을 첨가하여 최종 반응액의 부피가 20 µl가 되게 조절하여 반응시켰다. 반응은 Gene Amp2400 (Perkin-Elmer corp., USA)를 사용하였으며, 반응조건은 Table 1의 각 성장인자의 annealing T_m 값에

따라 실시하였다. 변성은 96°C에서 30초 동안, annealing은 30초 동안, elongation은 70°C에서 1분간 실시하였고, cycle은 35회로 하였다. 반응이 끝난 후 4°C에 보관하면서 표적서열(target sequence)의 증폭여부를 1.2% agarose 젤 전기영동으로 확인하였다. RT-PCR을 통하여 증폭된 각 성장인자의 특이 band의 intensity는 NIH image analysis (Scion Incorp, USA)를 이용하여 측정하였다.

측정된 띠의 강도는 각 시료의 β-actin RT-PCR 띠 강도와와의 비 (density ratio)를 구하여 시료간의 변이를 최소화하였다.

5) Southern blot hybridization

(1) Southern transfer

β-actin을 기준으로 정량화된 각 검체의 RT-PCR 산물을 1.2% agarose 젤에서 TBE 완충액 (50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 3.3 V/cm 조건으로 1시간 동안 전기영동을 한 후, ultraviolet illuminator (UVP Inc, USA)를 이용하여 전기영동 사진을 찍었다.

먼저 젤을 퓨린제거 완충액 (0.25 M HCl)에 담구어 10분간 정치시킨 후 증류수로 두 번 젤을 씻고, 변성 완충액 (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에 담귀 45분간 정치시켜 젤 속의 DNA를 외가닥으로 만든 다음, Hybond-N+ 막 (Amersham, England)에 진공펌프 (TransVac-TE80; Scientific Instrument Inc, USA)를 이용하여 Southern transfer하였다. 이때 진공압력은 12.5 cmHg로 하였고, 1시간 동안 transfer시킨 다음 1,500 jule의 자외선을 5초간 조사하여 DNA를 Hybond-N+ 막에 교차연계 시켰다.

(2) Oligonucleotide probe의 end labelling

Hybridization을 시행하기 전에 각 probe DNA들은 5' end labelling법을 이용하여 방사성동위원소로 표지하였다. 100 pM의 probe DNA를 10 unit의 polynucleotide kinase (Promega,

Table 1. Oligonucleotide primer and probe sequence used in this study and product size of the amplified RT-PCR

Angigenin factor		Oligonucleotide primer and probe sequence	Product size	Annealing temperature
β-actin	s	5'-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3'	544 bp	62°C
	as	5'-AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG-3'		
	p	5'-GGC CCC CCT GAA CCC CAA GGC CAA-3'		
bFGF	s	5'-CAA GCG GCT GTA CTG CAA AAA C-3'	391 bp	60°C
	as	5'-CAG CTC TTA GCA GAC ATT GG-3'		
	p	5'-CTG CCC AGT TCG TTT CAG TGC CAC ATA CCA-3'		
TGF-α	s	5'-CGC CCT GTT CGC TCT GGG TAT-3'	240 bp	60°C
	as	5'-AGG AGG TCC GCA TGC TCA CAG-3'		
	p	5'-CCC GCC CGT GGC TGC AGC AGT GGT GTC-3'		
TGF-β ₁	s	5'-GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC-3'	337 bp	60°C
	as	5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC-3'		
	p	5'-GGG CAG GGC CCG AGG CAA AAG TTG-3'		

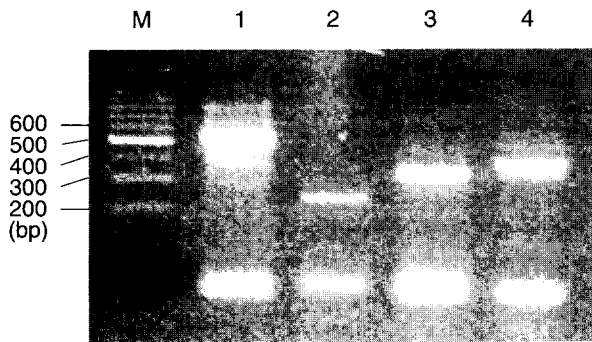


Fig. 1. Representative data for RT-PCR products of various cytokines (M: 100 bp ladder, Lane 1: β -actin, Lane 2: TGF- α , Lane 3: TGF- β_1 , Lane 4: bFGF).

USA)와 50 μ Ci의 [γ - 32 P] ATP와 함께 37°C에서 30분간 반응시켜 5' 말단에 32 P를 표지하였다. 반응 후 probe에 결합하지 않은 방사성동위원소는 sephadex G-50 spin column을 이용하여 제거하였다

(3) Southern blot hybridization

DNA가 부착된 Hybond-N+ 막을 prehybridization 용액 (6X SSC; 0.01 M sodium phosphate, pH 6.8, 1 mM EDTA, pH 6.8, 0.5% SDS, 100 μ g/ml salmon sperm DNA)이 들어 있는 교잡 용기에 넣고 68°C에서 2시간 동안 반응시켜 비특이 결합부위를 차단시켰다. 반응 후 32 P 방사성동위원소가 표지된 각 probe들을 1×10^6 cpm/ml가 되게 조정하여 넣어준 후 62°C에서 18시간 동안 hybridization을 실시하였다. 반응은 RMsks membrane에 대해 3단계로 세척을 실시하였다. 1차 세척은 실온에서 2X SSC, 0.1% SDS로 5분씩 2회 세척을 하고, 2차 세척은 35°C에서, 3차 세척은 45°C에서 각각 5분씩 시행하면서 Geiger counter로 바탕 소음을 측정하여 거의 소음이 사라질 때까지 세척하였다. 세척 후 Hybond-N+ 막을 Kodak X-AR (Kodak, USA) 필름에 -70°C에서 18시간 노출시킨 후 현상하였다.

3. 통계학적 처리

통계학적 검증은 SAS (release 6.12) 통계 패키지를 이용하여 Wilcoxon rank sum test를 실시하였으며, 통계학적인 유의성은 P값이 0.05이하인 경우로 하였다.

결 과

1. Total RNA의 추출 및 β -actin PCR

β -actin에 대한 RT-PCR 산물의 예상 크기는 544 bp이며, TGF- α 는 240 bp, TGF- β_1 은 337 bp, 그리고 bFGF는 391 bp이며, RT-PCR 결과 예상하였던 PCR 산물의 크기를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 사용하였던 30례 모든 조직에서 β -actin이

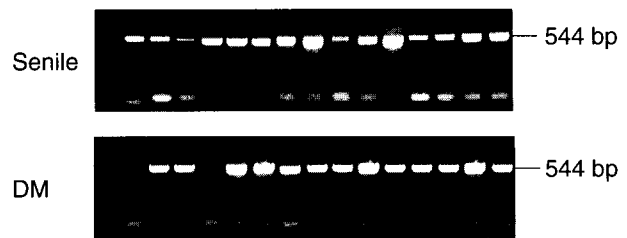


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of β -actin with RT-PCR products in lens extracts of senile and diabetic cataract.

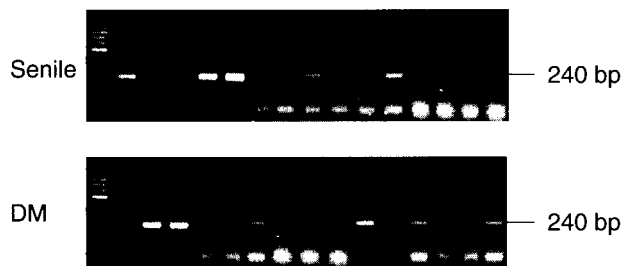


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of transforming growth factor- α with RT-PCR products in lens extracts of senile and diabetic cataract.

PCR 증폭이 되었지만 노인성 백내장에서 1례와 당뇨병성 백내장 2례에서 β -actin의 증폭이 미미하여 총 RNA의 추출상태를 의심하였으나, 당뇨병성 백내장 1례만이 전체 실험에서 음성으로 나와 이를 제외한 29례를 대상으로 결과를 분석하였다 (Fig. 2).

2. Transforming growth factor- α mRNA의 발현

TGF- α 에 대한 RT-PCR 결과 노인성 백내장 환자 전체 15례 중 6례에서 (40%), 당뇨병성 백내장의 경우 14례 중 9례에서 (64.3%)에서 양성 반응을 보여 당뇨병성 백내장에서 1.5배 높은 발현빈도를 보였다 ($P=0.098$) (Table 2, Fig. 3).

mRNA의 발현양을 비교하기 위하여 β -actin에 대한 발현밀도차 (density ratio)를 구한 결과 노인성 백내장의 경우 0.223 ± 0.314 였으며, 당뇨병성 백내장의 경우 0.319 ± 0.288 로 당뇨병성 백내장에서 TGF- α 의 발현양이 약간 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 3).

3. Transforming growth factor- β_1 mRNA의 발현

TGF- β_1 에 대한 RT-PCR 결과 노인성 백내장 환자 전체 15례 중 14례에서 (93%), 당뇨병성 백내장의 경우 14례 모두에서 (100%)에서 양성 반응을 보여 노인성 백내장과 당뇨병성 백내장에서 비슷한 발현빈도를 보였다 (Table 2, Fig. 4).

β -actin에 대한 density ratio는 노인성 백내장의 경우 0.899 ± 0.368 였으며, 당뇨병성 백내장의 경우 1.073 ± 0.503 로 당뇨병

Table 2. Positive rate of RT-PCR of cytokines in lens epithelial cells

Cytokines	Diabetic cataract (%)	Senile cataract (%)
TGF- α	9/14 (64.3)	6/15 (40)
TGF- β_1	14/14 (100)	14/15 (93)
bFGF	13/14 (93)	14/15 (93)

TGF- α : transforming growth factor- α
 TGF- β_1 : transforming growth factor- β_1
 bFGF : basic fibroblast growth factor

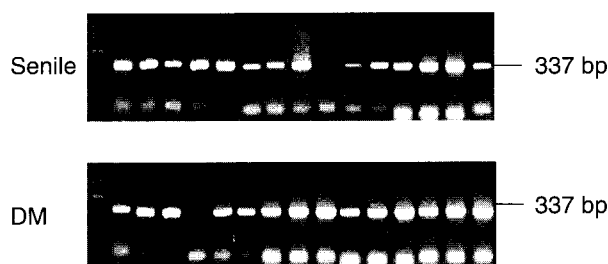


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of transforming growth factor- β_1 with RT-PCR products in lens extracts of senile and diabetic cataract.

성 백내장에서 TGF- β_1 의 발현양이 약간 증가되는 경향을 보였다 (Table 3).

4. Basic fibroblast growth factor mRNA의 발현

bFGF에 대한 RT-PCR 결과 노인성 백내장 환자 전체 15례 중 14례에서 (93%), 당뇨병성 백내장의 경우 14례 중 13례에서 (93%)에서 양성 반응을 보여 노인성 백내장과 당뇨병성 백내장에서 동일한 발현빈도를 보였다 (Table 2, Fig. 5).

β -actin에 대한 density ratio는 노인성 백내장의 경우 0.666 \pm 0.252였으며, 당뇨병성 백내장의 경우 0.818 \pm 0.274로 당뇨병성 백내장에서 bFGF의 발현양이 약간 증가되는 경향을 나타내었다 (Table 3).

5. Southern blot hybridization

RT-PCR의 정확도를 분석하기 위하여 PCR 산물을 Southern transfer하여 ³²P로 표시된 특이 소식자로 probe hybridization 한 결과 PCR을 통하여 증폭된 띠는 각각의 성장인자 특이 소식자에 잘 반응함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

고 찰

수정체는 혈관과 탐식세포가 없는 유일한 조직이며 배아기 때부터 한가지 종류의 세포로 구성되어 있다. 모든 수정체상피세포는 세포의 크기가 일정하고 매우 규칙적인 육각형 모

Table 3. Mean value of density ratio of RT-PCR products of cytokines

Cytokines	Diabetic cataract	Senile cataract
TGF- α	0.319 \pm 0.288	0.229 \pm 0.314
TGF- β_1	1.073 \pm 0.503	0.899 \pm 0.368
bFGF	0.818 \pm 0.274	0.666 \pm 0.252

TGF- α : transforming growth factor- α
 TGF- β_1 : transforming growth factor- β_1
 bFGF : basic fibroblast growth factor

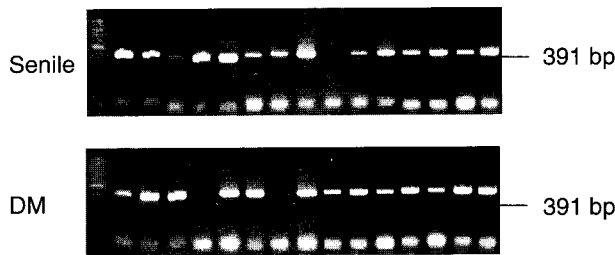


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of basic fibroblast growth factor with RT-PCR products in lens extracts of senile and diabetic cataract.

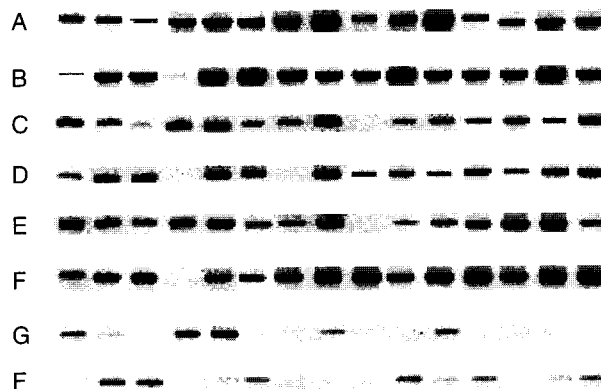


Fig. 6. Southern hybridization of RT-PCR products of each growth factor. A, C, E and G are senile cataracts and B, D, F and H are diabetic cataracts. A and B are β -actin, C and D are TGF- α , E and F are TGF- β_1 and G and H are bFGF.
 TGF- α : transforming growth factor- α
 TGF- β_1 : transforming growth factor- β_1
 bFGF : basic fibroblast growth factor

양이며, 세포간 간격을 볼 수 없는 단층을 이루고 있다. 정상적으로 수정체상피세포는 수정체 단백질의 생성 및 수정체 섬유세포의 퇴행, 탈핵, 선택적인 이온과 영양분의 수송 등을 담당한다. 이러한 활동들은 수정체상피의 위치에 따라 다르게 나타나는데, 적도부의 수정체상피세포는 수정체 단백질과 섬유질의 생성에 관여하고, 중심부의 수정체상피세포는 이온과 영양분을 수정체내로 선택적으로 수송하는 역할을 한다.

이와 같이 수정체상피세포는 수정체에서 대사가 가장 활발하며 수정체 섬유를 지속적으로 생산하므로 백내장의 원인과 진행을 알기 위하여 수정체상피세포에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

수정체의 분화과정은 수용성 단백질인 crystalline의 차별적인 발현으로 특정 지워진다. 포유동물의 수정체세포는 α -, β - 그리고 γ -crystalline을 발현하며, 수정체 내에서 이들의 분포와 발현양상은 특이적이다. 수정체상피세포의 증식, 이동, 그리고 섬유화세포로 분화하는 과정에서 가장 큰 변화를 보이는 것이 crystalline의 발현변화이며, α -crystalline 단백질과 mRNA는 수정체 전반에서 확인된다. β -와 γ -crystalline 단백질과 mRNA는 섬유화세포에서만 확인되며, 수정체상피세포에서 섬유화세포로 변형되는 과정에서 단계적으로 축적된다^{27,48}. 이 crystalline 단백질은 수정체의 투명도를 유지하는데 중요한 단백질로서 bFGF나 TGF- β 등의 세포성장인자들에 의해 발현이 조절된다.

정상 수정체에 존재하는 대표적인 cytokine으로는 bFGF와 TGF- β 를 들 수 있는데 수정체상피세포가 섬유세포로의 분화와 섬유화의 변화에 각각 중요한 역할을 하며, 여러 가지 단백질의 glycation 반응을 유발할 수 있는 환경을 조성하게 된다. 위의 두 가지 cytokine은 정상상태에서는 기능상의 균형을 이루고 있으나 여러 가지 외부자극이나 특히 안과수술 후 TGF- β 와 bFGF의 양이 변화한다는 보고가 있는데, 이러한 양적인 변화가 수정체상피세포의 물질대사에 영향을 미칠 수 있다.

Fibroblast growth factor (FGF)는 적어도 17개의 서로 다른 단백질로 구성되어 있으며, 태아형성 (embryogenesis), 사지, 귀, 뼈, 그리고 피부의 분화, 기관형성 (organogenesis), 혈관형성 (angiogenesis), 그리고 성장 등의 다양한 발달과정에 중요한 역할을 하는 단백질 성장인자이다^{1,34}. FGF-2로도 알려진 17 kDa 크기의 basic fibroblast growth factor는 신경외배엽, 중배엽, 그리고 신경관 (neural crest) 유래의 다양한 세포의 증식과 분화에 영향을 미친다. FGF는 heparin에 강한 친화성을 가지고 있으며, heparin과의 결합을 통하여 표적세포의 표면에 수용체를 유도하여 세포의 증식과 분화를 촉진한다. FGF는 섬유아세포의 성장과 혈관형성 (angiogenesis)에 주로 관여하며^{4,11,13}, 수정체에도 존재하여 수정체의 발달과정에도 일정 부분의 역할을 할 것이라 추측되고 있다.

1989년 Chamberlain과 McAvoy는 FGF-1과 FGF-2 같은 FGF family에 속하는 성장인자들은 농도 의존적인 방법으로 수정체상피세포의 증식과 섬유세포로의 분화를 조절한다고 가설을 제시하였으며, 여러 연구자들이 이를 뒷받침하는 증거를 발표하였다²⁹. 첫째, 수정체에서 분비형의 FGF-1을 발현하는 형질전환 마우스의 경우 수정체상피세포의 조기분화가 유도된다^{40,44}. 둘째, 수정체상피세포의 배양시 FGF-2를 첨가

한 결과 농도가 증가함에 따라 상피세포의 증식과 섬유세포로의 분화가 증가된다³⁹. 셋째, 수정체를 제외한 여러 안구 조직에서도 FGF-1과 FGF-2 등 FGF family의 성장인자들을 생성할 뿐만 아니라 이들의 특이 수용체인 FGFR1, FGFR2 (IIIb와 IIIc), 그리고 FGFR3을 발현하고 있다⁴⁷. 마지막으로 FGFR의 세포질내 기능성 분절을 발현하지 못하는 형질전환 마우스의 경우 FGF 지시 (signalling)를 받지 못하여 수정체상피세포가 섬유세포로의 분화가 되지 않았다³².

FGF-2로도 알려진 basic FGF (bFGF)는 17 kDa의 단백질로서 수정체상피세포의 배양시 상피세포의 분열을 촉진하며 수정체의 투명도를 유지하는데 중요한 crystalline과 collagen의 생성을 촉진한다³². 그리고 백내장 수정체 조직에서 높은 농도로 관찰되는 α -smooth muscle actin (α -SMA)의 세포내 농도를 감소시키는 등 정상적인 수정체 기능을 유지하는데 중요한 역할을 한다²¹. bFGF는 혈관생성인자로도 작용하며 당뇨병의 안과적 합병증에서도 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있으며, 실제로 streptozocin을 정맥으로 투여하여 제작된 당뇨병의 동물모델의 경우 망막조직에서 bFGF의 mRNA 발현이 정상에 비하여 2~3배 증가되었다고 한다^{17,26}. 하지만 당뇨병과 관련하여 수정체상피세포에서의 bFGF mRNA의 발현변화에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.

이 연구에서는 당뇨병성 백내장 환자의 수정체상피세포에서 bFGF의 mRNA의 발현이 증가되었으나 통계학적 유의성은 확인할 수 없었다 (Fig. 5). 백내장이 없는 정상 안구의 수정체상피세포에서 bFGF mRNA의 발현양에 대한 비교를 할 수 없어 bFGF의 발현이 백내장의 발생에 있어 미치는 영향을 분석할 수 없으나 당뇨병성 백내장과 노인성 백내장에 있어 수정체상피세포의 bFGF의 발현은 큰 차이가 없다고 할 수 있을 것이다 (Table 2).

TGF는 세포에 바이러스를 감염시킨 후에 분비되는 물질을 연구하는 과정에서 세포를 변형시키는 사이토카인으로 발견된 이후 여러 가지 기능이 밝혀져 왔다¹⁸. TGF군에는 α - β 가 존재하며 이중 TGF- α 는 상피세포의 증식이나 편평세포의 이행성을 촉진시키고 혈관형성을 유발하는 것으로 알려져 있으며¹⁴, TGF- β 는 25-KD의 단백질로서 세포의 이동과 성장을 조절하고 세포외기질의 합성과 분해를 조절한다¹⁸. TGF- α 와 상피성장인자 (epidermal growth factor)는 모두 상피성장인자 수용체를 매개로 하여 tyrosine kinase 활성도를 증가시켜 세포증식에 관한 신호전달을 하는 성장인자이다¹⁹. TGF- α 는 태반, 태생기 신장, 비인후실 (nasopharyngeal pouch), 이소낭 (otic vesicle) 등에서 일시적으로 생성되며⁷, 생체, 대장, 피부, 유방, 간, 신장 등에 널리 분포되어 있고, 이들 장기들의 항상성 성장과 발육을 조절한다고 생각된다²³. 정상피부의 각화세포 (keratinocyte)와 면역학적으로 활성화된 대식세포에서 생성되어 각화세포의 생성의 촉진, 분화와 증식, 상피세포의

성장과 분화, 맥관형성, 염증 및 염증에 의한 상처 치유와 재생기전에 관여한다^{9,14}). 안구조직에서 TGF- α 는 망막에서 주로 발현된다고 보고되었으나^{35,45}), Nishi 등은 정상 수정체와 백내장 환자의 수정체상피세포에서도 발현이 되어 수정체상피세포로의 증식과 분화에도 관여할 것이라 하였다³³).

생물학적 활성을 가진 TGF- β 는 25 kDa의 중합체로 390개의 아미노산과 412개의 아미노산이 이황화결합(disulfid linkage)으로 연결된 latency-associated protein으로 알려진 전구체의 분해로 생성된다. 생성된 전구체는 mannose-6-phosphate 수용체에 결합되어 plasmin과 같은 단백분해효소에 의해 분해되어 활성형의 중합체가 되며, α_2 -macroglobulin, proteoglycan decorin, 그리고 biglycan에 특이적으로 결합되어 불활성화된다. 인체 내에서 TGF- β 는 65~85%의 아미노산 상동성을 가진 TGF- β_1 , - β_2 , - β_3 의 세가지 isoform으로 존재하며, 각각의 isoform의 생물학적 기능의 차이는 아직 명확하지 않다^{12,20,22,30,31,38}). 인간의 수정체상피세포의 면역조직학적 염색으로 전반부와 적도부위의 수정체상피세포에서 관찰되며, 적도부위에서 보다 강하게 관찰된다²). 그리고 적도부위의 수정체상피세포는 TGF- β_1 과 - β_2 에 대한 수용체를 발현하고 있어 autocrine으로 작용할 것이라 추측되고 있다. TGF- β 는 세포주기의 G1 phase 후반부위에 작용하여 세포의 분열을 가역적으로 억제하는 기능을 가지고 있다⁴⁶).

수정체에서 TGF- β 는 수정체상피세포의 증식억제, 세포외기질의 증가, 그리고 α -SMA 생성 증가 등을 유발하여 수정체의 백내장성 변화를 일으킨다³⁰). 실제로 쥐의 수정체상피세포의 배양시 TGF- β 를 첨가해 주면 spindle-shaped 세포의 형성, 부분적인 수정체낭의 수축(wrinkling), apoptosis 형태의 세포사망, 그리고 세포외기질의 축적 등의 백내장성 변화를 관찰할 수 있다^{15,16,25,42}). 뿐만 아니라 전체 수정체 배양시에도 TGF- β 의 첨가는 전낭하에 세포외기질의 이상 침착과 세포성 용균반(cellular plaque)의 형성으로 수정체가 불투명해 진다¹⁵). Srinivasan 등은 활성화된 형태의 TGF- β_1 을 수정체에서 과발현하는 형질전환 마우스의 경우 생후 3주 내 전낭하 백내장이 발생함을 보고하여 TGF- β 의 in vivo에서의 백내장 유발능(cataractogenic activity)을 증명하였다⁴³).

이 연구에서는 대부분 노인성과 당뇨병성 백내장 환자에서 TGF- β_1 의 발현을 확인할 수 있었으며, mRNA의 발현양이 노인성 백내장 환자에 비하여 당뇨병성 백내장 환자에서 증가되어 있었으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 3). 정상 수정체 조직에서 TGF- β 의 농도가 450 pg/ml이고⁸), 상처를 입은 후 또는 안구 수술 후 2.3~8.1 ng/ml로 증가된다는 점을 고려하면⁴⁹), β -actin에 대한 density ratio가 1에 가깝다는 것은 TGF- β 의 발현이 매우 높은 상태라는 것을 알 수 있다. TGF- β 의 수정체상피세포에 대한 백내장성 영향을 생각할 때 노인성 백내장 환자뿐만 아니라 당뇨병성 백내장 환자에서도 백

내장의 발생에 있어서 TGF- β 는 중요한 역할을 할 것이다.

TGF- α mRNA의 발현양이 당뇨병성 백내장의 수정체상피세포에서 노인성 백내장에 비하여 조금 증가된 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 발현빈도는 노인성 백내장 환자에서 40%인 반면 당뇨병성 백내장 환자에서 64.5%로 1.5배 높게 발현되었다(Fig. 3).

이상의 결과로 노인성 백내장 환자와 당뇨병성 백내장 환자의 수정체상피세포에서 TGF- α , - β_1 , bFGF의 발현을 확인할 수 있었으며, 두 환자군 모두 수정체상피세포에서 높은 TGF- β_1 의 발현을 보여 당뇨병성 백내장도 노인성 백내장과 같이 TGF- β 가 깊이 관여함을 추측할 수 있었다. TGF- α 의 발현양의 차이는 없었으나 발현빈도가 당뇨병성 백내장에서 높아 당뇨병성 백내장의 조기 발병과 TGF- α 의 발현에 연관이 있을 가능성을 제시한다.

결 론

이 연구는 당뇨병성 백내장 환자와 대사성 질환이 없는 단순한 노인성 백내장에 있어서 성장인자들의 mRNA 발현을 비교하여 당뇨병성 백내장과 노인성 백내장의 차이를 알아보고자 하였다. 증식당뇨망막병증으로 유리체절제술을 실시한 환자의 백내장 15례와 노인성 백내장으로 수술을 받는 환자 15례의 전낭을 이용하여 수정체상피세포의 증식과 분화에 관여하는 TGF- α , - β_1 , 그리고 bFGF에 대한 RT-PCR과 Southern blot hybridization을 시행하여 다음의 결과를 얻었다.

당뇨병성 백내장 환자의 수정체상피세포에서 노인성 백내장 환자에서 보다 TGF- α , - β_1 , 그리고 bFGF의 mRNA 발현이 증가되어 있었으나 통계적인 유의성은 없었다($P>0.05$). TGF- β_1 과 bFGF는 대부분의 환자에서 발현이 확인되었으며, 특히 TGF- β_1 은 대조 유전자인 β -actin과 유사한 정도로 발현되어 높은 발현을 보였다. TGF- α 는 당뇨병성 백내장 환자에서 노인성 백내장 환자에 비해 1.5배 높은 빈도로 발현되었다($P=0.098$).

이상의 결과로 노인성 백내장과 당뇨병성 백내장 두 환자군 모두 수정체상피세포에서 높은 TGF- β_1 의 발현을 보여 당뇨병성 백내장도 노인성 백내장과 같이 TGF- β 가 관여함을 추측할 수 있었다. TGF- α 는 발현양의 차이는 없었으나 발현빈도가 당뇨병성 백내장에서 높아 당뇨병성 백내장의 조기 발병과 TGF- α 의 발현에 연관이 있을 가능성을 제시한다.

참 고 문 헌

- 1) Basilico C and Moscatelli D (1992): The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*, **59**: 115-165.
- 2) Border WA and Ruoslahti E (1992): Transforming growth

- factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, **90**: 1-7.
- 3) Brown NAP (1996): Lens disorders: Clinical manual of cataract diagnosis, 1st ed. London, Oxford, 176-179.
 - 4) Burgess WH and Maciag T (1989): The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*, **58**: 575-606.
 - 5) Chamberlain CG and McAvoy JW (1997): Fiber differentiation and polarity in the mammalian lens: a key role for FGF. *Prog. Retina Eye Res*, **16**: 443-478.
 - 6) Chow RL, Roux GD, Roghani M, Palmer MA, Rifkin DB, Moscatelli DA and Lang RA (1995): FGF suppresses apoptosis and induces differentiation of fiber cells in the mouse lens. *Development*, **121**: 4383-4393.
 - 7) Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL and Pittelkow MR (1987): Production and auto-induction of transforming growth factor alpha in human keratinocytes. *Nature*, **328**: 817-820.
 - 8) Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D and Streilein JW (1991): Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**: 2201-2211.
 - 9) Derynck R (1988): Transforming growth factor alpha. *Cell*, **54**: 593-595.
 - 10) Everitt JI and Walker CL (1997): Altered expression of TGF- α : an early event in renal cell carcinoma development. *Molecular Carcinogenesis*, **19**: 213-219.
 - 11) Gajdusek CM, Luo Z and Mayberg MR (1993): Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, **157**: 133-144.
 - 12) Gordon-Thompson C (1998): Differential cataractogenic potency of TGF-[beta]1, -[beta]2, and -[beta]3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**: 1399-1409.
 - 13) Gospodarowicz D, Neufeld G and Schweigerer L (1987): Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl*, **5**: 15-26.
 - 14) Groenen LC, Nice EC and Burgess AW (1994): Structure-function relationships for the EGF-TGF-alpha family of mitogens. *Growth Factors*, **11**(4): 235-257.
 - 15) Hales AM, Chamberlain CG and McAvoy JW (1995): Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**: 1709-1713.
 - 16) Hales AM, Schultz MW, Chamberlain CG and McAvoy JW (1994): Transforming growth factor- β_1 induces lens cells to accumulate α -smooth muscle actin, a marker for subcapsular cataracts. *Curr Eye Res*, **13**: 885-890.
 - 17) Karpen CW, Spanheimer RG, Randolph AL and Lowe WL Jr (1992): Tissue-specific regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels by diabetes. *Diabetes*, **41**: 222-226.
 - 18) Kim SK, Kim KW, Tae K, Park CW and Ahn MJ (1996): TGF- β_1 gene expression in nasal polyp tissues. *Korean J Otolaryngol*, **39**: 1786-1790.
 - 19) King JD, Stringer SP, Chegini N, Donnelly WH, Cassisi NJ and Schultz GS (1993): TGF α protein and receptor localization in laryngeal tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **146**: 512-520.
 - 20) Kingsley DM (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, **8**: 133-146.
 - 21) Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T and Negishi K (1995): Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**: 1701-1708.
 - 22) Laiho M and Keski-Oja J (1992): Transforming growth factor-beta as regulators of cellular growth and phenotype. *Crit Rev Oncog*, **3**: 1-26.
 - 23) Lam SM, Zhu D-F and Ahn JM (1999): Transforming growth factor- α and rhinitis. *Laryngoscope*, **109**: 1119-1124.
 - 24) Liu J, Chamberlain CG and McAvoy JW (1996): IGF enhancement of FGF-induced fiber differentiation and DNA synthesis in lens explants. *Exp Eye Res*, **63**: 621-629.
 - 25) Liu J, Hales AM, Chamberlain CG and McAvoy JW (1994): Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **35**: 388-401.
 - 26) Lowe WL Jr, Florkiewicz RZ, Yorek MA, Spanheimer RG and Albrecht BN (1995): Regulation of growth factor mRNA levels in the eyes of diabetic rats. *Metabolism*, **44**: 1038-1045.
 - 27) McAvoy JW (1978): Cell division, cell elongation and distribution of α -, band γ -crystallines in the rat lens. *J Embryol Exp Morphol*, **44**: 149-165.
 - 28) McAvoy JW and Chamberlain CG (1989): Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development*, **107**: 221-228.
 - 29) McAvoy JW and Chamberlain CG (1989): Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial

- cells depending on its concentration. *Development*, **107**: 221-228.
- 30) Meacock WR, Spalton DJ and Stanford MR (2000): Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol*, **84**: 332-336.
- 31) Myazono M, Ichijo H and Helden CH (1993): Transforming growth factor- β : latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*, **8**: 11-22.
- 32) Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, Shirasawa E and Ohmoto Y (1996): Effects of the cytokines on the proliferation and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol*, **80**: 63-68.
- 33) Nishi O, Nishi K, Wada K and Ohmoto Y (1999): Expression of transforming growth factor (TGF)-alpha, TGF-beta(2) and interleukin 8 messenger RNA in postsurgical and cultured lens epithelial cells obtained from patients with senile cataracts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **237**: 806-811.
- 34) Olwin BB, Arthur K, Hannon K, Hein P, McFall A, Riley B, Szebenyi G, Zhou Z, Zuber ME and Rapraeger AC (1994): Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. *Mol Reprod Dev*, **39**: 90-101.
- 35) Patel B, Hiscott P, Charteris D, Mather J, McLeod D and Boulton M (1994): Retinal and preretinal localization of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, **78**: 714-718.
- 36) Peek R, McAvoy JW, Lubsen NH and Schoenmakers JG (1992): Rise and fall of crystalline gene messenger levels during fibroblast growth factor induced terminal differentiation of lens cells. *Dev Biol*, **152**: 152-160.
- 37) Powers MR and Planck SR (1997): Immunolocalization of transforming growth factor-alpha and its receptor in the normal and hyperoxia-exposed neonatal rat retina. *Curr Eye Res*, **16**: 177-182.
- 38) Rifkin DB, Kojima S, Abe M and Harpel JG (1993): TGF-beta: structure, function, and formation. *Thromb Haemost*, **70**: 177-179.
- 39) Robinson ML, MacMillan-Crow LA, Thompson JA and Overbeek PA (1995): Expression of a truncated FGF receptor results in defective lens development in transgenic mice. *Development*, **121**: 3959-3967.
- 40) Robinson ML, Overbeek PA, Verran DJ, Grizzle WE, Stockard CR, Friesel R, Maciag T and Thompson JA (1995): Extracellular FGF-1 acts as a lens differentiation factor in transgenic mice. *Development*, **121**: 505-514.
- 41) Schreiber AB, Winkler ME and Derynck R (1986): Transforming growth factor- α : A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, **232**: 1250-1253.
- 42) Schulz MW, Chamberlain CG and McAvoy JW (1996): Inhibition of TGF- β induced cataractous changes in lens explants by ocular media and α_2 -macroglobulin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **37**: 1509-1519.
- 43) Srinivasan Y, Lovicu FJ and Overbeek PA (1998): Lens-specific expression of transforming growth factor beta1 in transgenic mice causes anterior subcapsular cataracts. *J Clin Invest*, **101**: 625-634.
- 44) Stolen CM, Jackson MW and Griep AE (1997): Overexpression of FGF-2 modulates fiber cell differentiation and survival in the mouse lens. *Development*, **124**: 4009-4017.
- 45) Tio M and Moges K (1997): The Drosophila TGF α homolog Spitz acts in photoreceptor recruitment in the developing retina. *Development*, **124**: 343-351.
- 46) Tucker RF, Shipley GD, Moses HL and Holley RW (1984): Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. *Science*, **226**: 705-707.
- 47) Ueno H, Gunn M, Dell K, Tseng A and Williams L (1992): A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem*, **267**: 1470-1476.
- 48) Van Leen RW, Breuer ML, Lubsen NH and Schoenmakers JG (1987): Developmental expression of crystalline genes: in situ hybridization reveals a differential localization of specific mRNAs. *Dev Biol*, **123**: 338-345.
- 49) Wallentin N, Wickstrom K and Lundberg C (1998): Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**: 1410-1418.
- 50) Wong CJ, Peiffer RL, Oglesbee S and Osborne C (1996): Feline ocular epithelial response to growth factors in vitro. *Am J Vet Res*, **57**: 1748-1752.