

다공성 안와충전물에서 혈관생성 및 유지에 대한 혈관전구세포와 섬유소의 역할

양재욱¹ · 이호영¹ · 박세광² · 양영일³

인제대학교 의과대학 부산백병원 안과학교실¹, 인제대학교 의과대학 부산백병원 미생물학교실²,
인제대학교 의과대학 부산백병원 병리학교실³

목적: Medpor[®]판 내로의 섬유혈관화에 대한 내피전구세포(Endothelial progenitor cells)와 섬유소(Fibrin)의 효과에 대하여 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인체지방조직에서 내피전구세포를 분리 증식시킨 후 Fluorescence activated cell sorting (FACS)을 이용하여 표현형을 확인하고 그 순도를 분석한 후 athymic nude mice 20마리를 대상으로 복강 내 마취를 시킨 후 마우스 등(back)의 양측 상부에는 내피전구세포와 섬유소로 처리한 Medpor[®]판을, 하부 우측에는 섬유소를 처리한 Medpor[®]판을, 그리고 하부 좌측에는 아무처리도 하지 않은 Medpor[®]판을 각각 피하지방층에 무균적 방법으로 삽입하였다. 삽입 후 7일째 마우스를 희생시킨 후 각각의 유착도와 혈관 형성 정도는 무게와 혈구세포 양을 비교하는 정량분석을, 미세혈관형성과 세포성장의 측정에는 Hematoxylin & Eosin 염색 및 Toluidine blue 염색의 정성적인 방법을 사용하였다.

결과: 내피전구세포와 섬유소를 처리한 군은 다른 군에 비하여 증가된 무게와 백혈구 및 적혈구가 증가 되어 있었으며 ($p<0.001$), 섬유소만을 처리한 군에서도 처리하지 않은 군에 비하여 무게 증가($p<0.01$)와 혈구세포의 증가 ($p<0.001$)를 확인할 수 있었다. 정성적으로도 Medpor[®]판에 내피전구세포와 섬유소를 처리한 군에서는 혈관형성과 조직의 유착정도가 3군 중 가장 높았으며 섬유소만을 처리한 군에서는 유착의 정도는 덜 하지만 Medpor[®]판 단독 삽입군에 비하여 조직유착정도와 섬유혈관형성은 증가하였다.

결론: Medpor[®]판에 적용시킨 내피전구세포와 섬유소는 각각 섬유혈관 증식과 조직유착력을 향상시킨다는 것을 확인할 수 있었고 두 가지를 병행하여 적용했을 경우 상승효과를 확인할 수 있었다.

〈한안지 49(7):1135-1145, 2008〉

안구적출술이나 안구내용제거술로 제거된 안구의 용량을 대체할 목적으로 다공성 안와충전물(porous orbital implant)인 Medpor[®] (Porex Surgical, College Park, CA, USA)가 많이 사용되고 있다. Medpor[®]의 구성 성분인 합성폴리에틸렌(synthetic polyethylene)은 구멍의 크기가 수산화인회석보다 작고, 표면이 소수성이므로 섬유혈관증식이 더 늦게 되는 것으로 밝혀져 있지만,¹⁻⁶ 생체내에서 잘 분해되지

않고 대량생산이 가능하며, 표면에 있는 400 μ m의 구멍을 통하여 안와충전물 내로의 섬유혈관화가 가능하고, 또한 외안근을 부착시킬 수 있어 안와삽입물과 안와가 한 개체로 형성될 수 있도록 하는 아주 유용한 제품이다.

그러나 다공성 안와충전물의 두 가지 중요한 단점은 내부구멍(internal lacunae)이 미세농양의 발병 장소가 될 수 있고 거친 표면이 조직미란의 원인으로 작용한다는 점이다.^{7,8} 일반적으로 안와충전물의 감염 및 노출률은 약 5~20% 정도가 되며 섬유혈관화가 완성되기 전까지 이와 같은 위험성은 항상 존재한다. 따라서 안와충전물 내로의 섬유 혈관화를 보다 빠르고 완벽하게 이룰 수 있는 방법이 안와충전물의 수술성공 및 합병증에 영향을 미치는 가장 중요한 요소가 될 수 있다.⁵ 보다 빠르고 완벽한 섬유혈관화가 임상적으로 매우 중요하기 때문에 섬유혈관화를 촉진시킬 수 있는 여러 가지 수술방법 및 혈관형성인자에 대한 연구가 많았다.^{7,8}

〈접수일 : 2007년 11월 20일, 심사통과일 : 2008년 4월 10일〉

통신저자 : 양 재 욱

부산시 부산진구 개금동 633-165

인제대학교 부산백병원 안과

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

E-mail: jwsyhyo@yahoo.co.kr

* 이 논문은 2005학년도 인제대학교 부설연구소 연구비에 의하여 연구되었음.

그러나 transforming growth factor- β ,^{9,10} basic fibroblast growth factor,¹¹⁻¹³ platelet-derived growth factor,¹⁴ vascular endothelial growth factor¹⁴⁻¹⁸ 등과 같은 여러 성장인자들의 외부 주입을 통하여 혈관화촉진을 일으키려는 시도는 이러한 물질들에 반응하여 혈관 신생을 형성하는 혈관 내피세포 수의 제한 때문에 확실한 효과를 보이지는 못하고 있다.

새로운 시도로써 사용되는 내피전구세포(Endothelial progenitor cells)는 기존혈관의 분화(angiogenesis)와 이에 관련된 혈관세포증식(vasculogenesis)에 관여하여 새로운 혈관형성에 도움을 주며 혈관 내피세포의 수와 밀도를 동시에 증가시킬 수 있다. 내피전구세포는 인간의 골수(bone marrow), 말초 단핵구 세포(peripheral mononuclear cells) 및 지방조직(adipose tissue)에서 구할 수 있으나, 방법이 침습적이며 생성된 내피전구세포수의 제한이 있어, 본 연구에서는 인간의 복부지방조직에서 내피전구세포를 분리 하였으며,^{19,20} Medpor[®]판에 내피전구세포를 처치할 때 신생혈관 및 섬유아세포 증식 작용과 조직 접합 효과가 있는 섬유소(Tisseel[®] Kit, Baxter)를 같이 처치하여 Medpor[®]판의 섬유혈관화의 상승효과를 athymic nude mouse를 사용하여 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 재료 및 대상

A. Medpor[®]판(sheet)

Medpor[®] (Porex Surgical Inc., CA, U.S.A.)는 원판 형태로 제작하여 사용하였다. 평균 구멍의 크기가 150~300 μm 인 1 mm 두께의 Medpor[®]판을 피부 생검 천공기(KAI sterile dermal biopsy punch, KAI MEDICAL, Oyana, Japan)를 사용하여 지름 8 mm로 제작하고 에틸렌 옥사이드 가스 살균 처리한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

B. Tisseel[®] Kit

Tisseel[®] Kit (BAXTER AG., Vienna, Austria)는 Medpor[®]의 소수성을 감소시키고 유착력을 증가시키는 용도로 사용하였는데, 이는 상품화된 섬유소아교(fibrin glue)로 동결 건조된 섬유소원, Factor XIII, 트롬빈, aprotinin용액 및 calcium chloride용액으로 구성되어 있으며 사용방법은 주성분이 섬유소원인 접합단백을 섬유소 분해 억제제인 aprotinin용액에 녹여 섬유소원용액을 만들고, 한편으로는 트롬빈을 calcium

chloride용액에 녹여 트롬빈용액을 만든 후 이 두 용액을 섞으면 응고가 발생하여 사용하게 된다. 동결건조 형태의 피브리노겐과 트롬빈을 10 mM phosphate buffered saline (PBS)에 각각 10%, 100 U/ml로 녹여 분주한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

C. Athymic nude mice

내피전구세포와 섬유소의 Medpor[®]판에서의 안착과 혈관형성의 증진에 대한 효과 확인을 위해서 인간 유래의 세포와 단백질에 거부반응을 보이지 않는 athymic nude mice (Jackson Laboratory, Maine, USA) 20마리를 사용하였다. 사용된 마우스의 평균 체중은 100~200 g이었으며, 주령은 7~8주령이었다.

D. Cell culture media

내피전구세포의 배양은 10일간 endothelial basal medium (EBM) (Cambrex, San Diego, CA)에 5% fetal bovine serum, human vascular endothelial growth factor, human fibroblast growth factor-2, human epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, 그리고 ascorbic acid를 첨가하여 사용하였다.

2. 지방 조혈 세포(ASCs)의 분리 및 내피전구세포 배양

A. 지방조직(Adipose tissue) 채취와 조직 분해

인간 유래의 지방줄기세포는 정상 성인 복부 지방에



Figure 1. Thin Medpor[®] sheets (Porex Surgical Inc., CA, U.S.A.) were cut to 8 mm in diameter and were used after sterilization.

서 채취하였다. 5 ml 주사기로 흡입한 지방을 멸균된 가위로 잘게 절단하고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Life Technologies)으로 다시 세척하였다. 소화액 0.1% clostridial collagenase (Worthington Biochemical), 10 mg/ml porcine heparin (Sigma) in Medium 199에서 37°C, 30 분간 처리하였고, 멸균된 거즈를 사용하여 분해 되지 않은 조직을 제거한 뒤에 세포를 900 X g로 10분간 원 침하였다.

B. 내피세포(Endothelial cell) 표지 및 분리

분리된 세포를 0.5 ml의 HBSS로 부유한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Ulex europaeus agglutinin (UEA)-1 (Sigma)을 150 µg/ml 첨가하고 4°C에서 10분간 처리하여 흡수 시켰다. 67 µm nylon filter mesh로 세포 응괴를 풀어 준 후 세포수를 측정하였다. 3×10^6 세포를 Magnetic associated cell sorting (MACS) buffer (0.5% bovine albumin, 2 mM EDTA in PBS)로 세척하고 anti-FITC-MACS magnetic nanospheres (Mitenyi Biotec, Auburn, CA)를 처리하였다. UEA-1을 흡수한 세포를 mini-MACS column (Mitenyi Biotec)로 분리하였다.

C. 내피전구세포의 특성 확인

내피전구세포의 특성 확인은 fluorescence-activated cell sorting (FACS)으로 하였다. 2×10^5 세포를 vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin: BD PharMingen, San Diego, Calif.), CD31 (BD PharMingen), CD34 (BD Pharmingen), FITC-UEA-1, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated low-density lipoprotein (DiLDL) (Biomedical Technologies, Stoughton, MA), 그리고 FITC-labeled von Willebrand factor (BD PharMingen)로 4°C에서 30분간 염색한 후 유세포분석기 fluorescence-activated cell sorter (FACS) SCAN flow cytometer (Becton Dickinson Bio sciences, San Diego, CA)와 공초점현미경(confo cal microscope)(LSM510 Meta; Carl Zeiss, Germany)으로 분석하였다.

3. Medpor®판의 내피전구세포와 섬유소처리와 athymic nude mouse에의 이식

섬유소와 트롬빈을 각각 최종 1%, 1 U/ml가 되도록 serum free EBM으로 희석하였다. 이때 내피전구

세포를 첨가하여야 하는 경우에는 1×10^6 cell/ml의 내 피전구세포가 부유된 serum free EBM을 사용하였다. 내피전구세포가 첨가된 또는 첨가되지 않은 섬유소 와 트롬빈을 동일 부피로 4°C에서 혼합하였다. 혼합액 을 Medpor®판에 300 µl씩 올려서 37°C에서 20분간 굳힌 후 뒤집어 반대편에도 동일하게 처리하였으며, 섬유소가 처리된 Medpor®판은 endothelial growth medium (EGM)으로 37°C에서 2일간 더 배양하였다.

Pentobarbital을 160 mg/kg의 용량으로 복벽 내 주입하여 마취시키고 마우스 등(back)의 양측 상부에는 내피전구세포와 섬유소로 처리한 Medpor®판을, 하 부 우측에는 섬유소를 처리한 Medpor®판을, 그리고 하부좌측에는 처리하지 않은 Medpor®판을 각각 피하 지방층에 무균적 방법으로 삽입한 뒤 피부와 근육층을 6-0 vicryl로 봉합한 후 항생제 연고를 도포하였다.

4. Medpor®판 유착도와 혈관형성 분석

7일째에 마우스 20마리를 희생하여 유착된 조직과 함께 이식된 Medpor®판을 분리한 뒤, 조직의 유착정 도를 확인하기 위하여 분리된 조직의 무게를 각각 측정 하고 lysis buffer로 4°C에서 24시간 조직내 혈구세포 를 용출시켰다. 용출된 용액은 Hematology system (ADVIC™120, BAYER)로 혈구세포를 측정하였다.

유의성에 대한 통계처리는 Wilcoxon signed rank test를 사용하였다.

Medpor®판의 혈관형성을 조직학적으로 확인하기 위하 여 포르말린에서 고정한 후 plastic resin으로 블록을 제 작하였다. 1 µm 두께로 조직을 절단한 후 Hematoxylin & Eosin염색과 Toluidine blue로 염색하여 미세혈 관형성과 세포성장을 확인하였다.

결 과

1. 지방조혈세포의 분리 및 내피전구세포 배양

성인의 복부에 존재하는 피하지방조직으로부터 내피 전구세포를 분리하여 관찰한 결과 Figure 2A와 같이 지방 줄기 세포에서는 세포크기와 세포질공포(cytoplasmic vacuoles)가 크지만 Figure 2C와 같이 분 화가 된 경우에는 세포크기와 세포질공포가 작아지면서 명확해짐을 관찰할 수 있었다. Figure 2B와 같은 Nile red O 염색 (DAPI nuclear counter staining) 을 해 본 결과 파란색의 핵주위로 노란색으로 염색되는 것을 볼 때 지방 조혈 세포에서 기원한 내피전구세포라 는 것을 알 수 있었다.

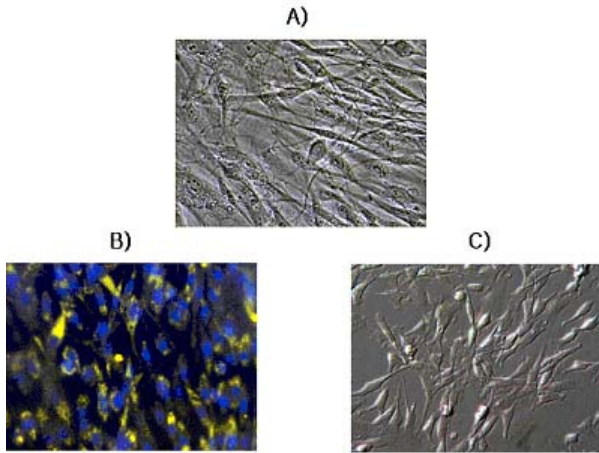


Figure 2. Adipose stem cells (ASCs) and endothelial progenitor cells (EPCs). (A) Light microscope image of cultured ASCs; (B) Nile red O staining of ASCs (DAPI nuclear counter staining); (C) Phase contrast microscope image of cultured EPCs.

2. 내피전구세포 특성 분석

분리된 내피전구세포의 특성을 형광이 표지된 CD31, CD34, UEA-1, acLDL 그리고 von Willebrand factor (factor VIII)로 염색하여 유세포 분석기와 공초점현미경으로 확인하였다(Fig. 3, 4). 지방 조혈 세포로부터 내피전구세포를 biotin-conjugated anti-human CD34 항체로 분리한 후 FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated anti-CD31과 PE (phycoerythrin)-conjugated anti-CD34로 염색한 결과 분리된 내피전구세포의 순도는 99%로 아주 높았으며, 내피전구세포의 특성인 UEA-1과 acLDL 섭

취(uptake) 또한 45~52%로 확인되었다(Fig. 3A). 분리된 내피전구세포를 세포배양하면 초기 분리시 보다 세포의 크기가 증가되었으며, 2일째에는 CD34의 발현에 변화가 없었으나 10일째에는 전구세포(progenitor cell)의 특성인 CD34의 발현이 감소되었다(Fig. 3B). 또한 von Willebrand factor가 전체 세포질에 넓게 발현되고 있었으며, 계속 분화를 유도하면 세포가 길게 뻗어서 자라면서 미세관(microtubule)을 형성하였고, CD31의 발현도 높았다(Fig. 4).

3. 내피전구세포와 섬유소의 Medpor®판 이식에 미치는 영향 분석

A. Medpor®판의 내피전구세포와 섬유소 처리 및 이식수술

얼음에서 1 % 섬유소원과 1 U/ml의 thrombin을 혼합하고 8 mm 크기의 Medpor®판에 올려 섬유소응결(fibrin clot)을 형성하고 37℃에서 굳혔다. 섬유소응고가 형성된 Medpor®판을 EGM에서 2일간 배양하였다(Fig. 5A). 내피전구세포를 첨가하는 경우에는 섬유소원과 thrombin의 희석을 내피전구세포가 1x10⁶ cell/ml로 포함된 배지를 사용하였다. 상부 양측에는 내피전구세포와 섬유소로 처리한 Medpor®판을, 하부 우측에는 섬유소를 처리한 Medpor®판을, 그리고 하부 좌측에는 처리하지 않은 Medpor®판을 각각 피하 지방층에 삽입하였다(Fig. 5B).

B. 마우스 희생 후 수술 소견

수술 후 일주일째에 마우스를 Ether로 안락사 시키고 이식된 Medpor®판을 제거하였다.

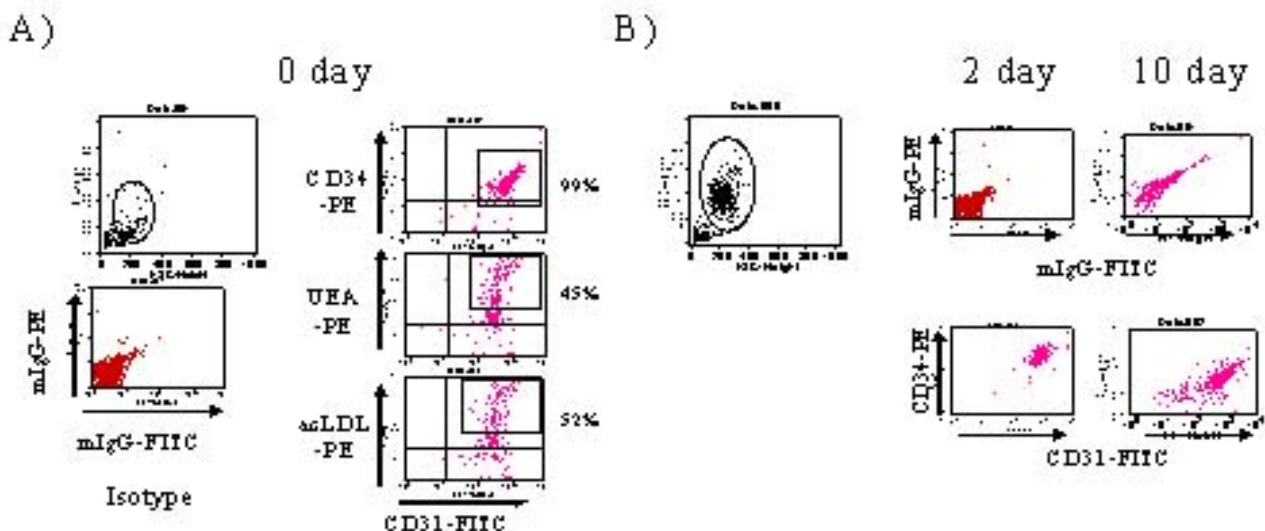


Figure 3. Flow cytometry analysis of isolated and cultured EPCs.

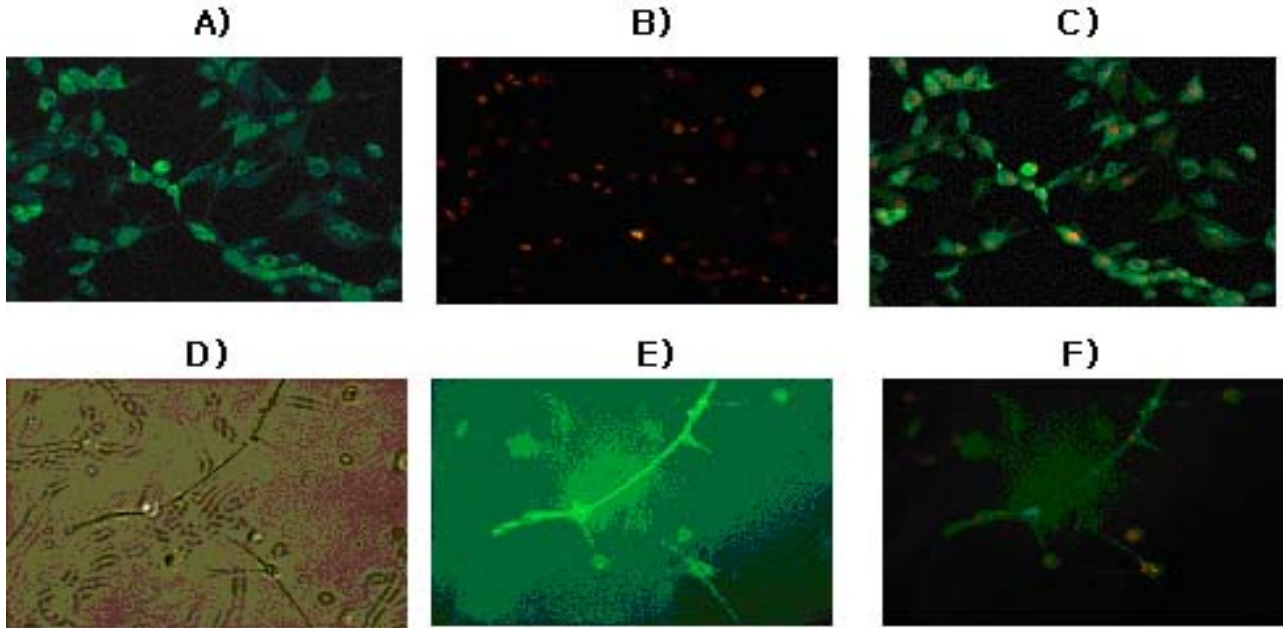


Figure 4. Confocal microscope image of EPCs. (A) FITC-labeled von-Willebrand factor staining; (B) PI staining; (C) overlapping (merge) image of A and B; (D) Phase contrast image of EPCs in 3-dimensional matrix culture; (E) FITC-labeled CD31; (F) PI & CD31 staining.

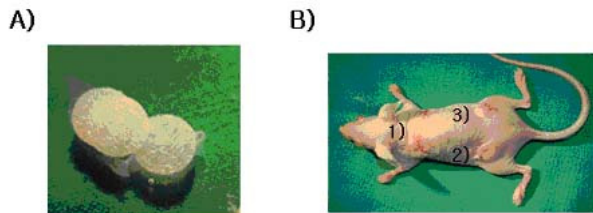


Figure 5. Medpor® sheet and postimplanted mouse. (A) Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; (B) postoperated mouse 1) RUQ (Right upper quadrant) & LUQ (Left upper quadrant) were implanted with Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin. 2) LLQ (Left lower quadrant) was with untreated Medpor® sheet. 3) RLQ (Right lower quadrant) was with Medpor® sheet treated with fibrin.

Medpor® 판만을 이식한 부위에는 혈관형성을 확인할 수 없었으나, 섬유소를 처리한 Medpor® 판과 내피 전구세포와 섬유소를 처리한 Medpor® 판을 이식한 부위에는 혈관형성을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 섬유소를 처리하지 않은 Medpor® 판은 주변조직과의 유착이 없었으나 섬유소만을 처리한 또는 내피전구세포와 섬유소를 처리한 Medpor® 판은 주변 조직과의 유착이 심하였다.

C. Medpor® 판의 무게 및 혈관세포 정량 분석

내피전구세포와 섬유소의 처리에 따른 조직 유착과 혈관 형성을 정량적으로 분석하기 위하여 회수된 Medpor® 판의 무게를 측정하고 혈액세포를 측정하였다. 회수된 Medpor® 판의 평균 무게는 내피전구세포와

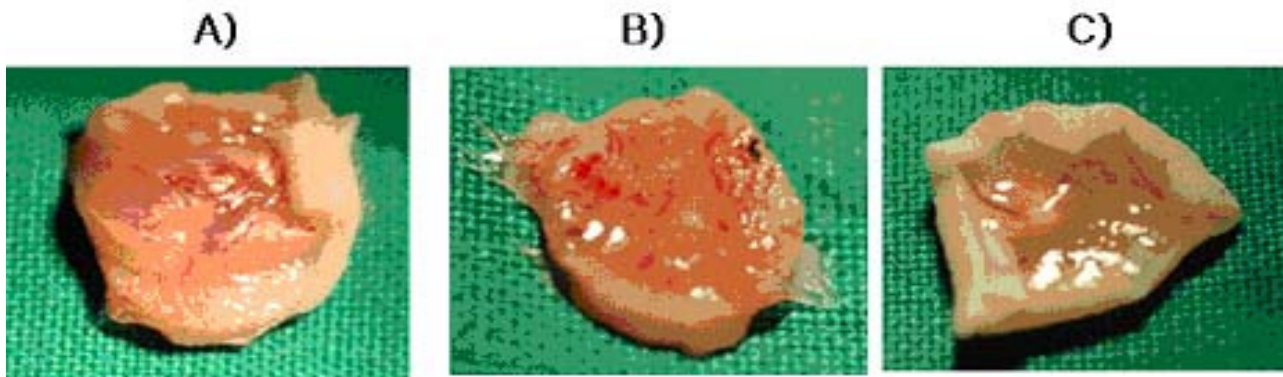


Figure 6. Gross examination of Medpor® sheet; (A) Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; (B) Medpor® sheet treated with fibrin; (C) Untreated Medpor® sheet.

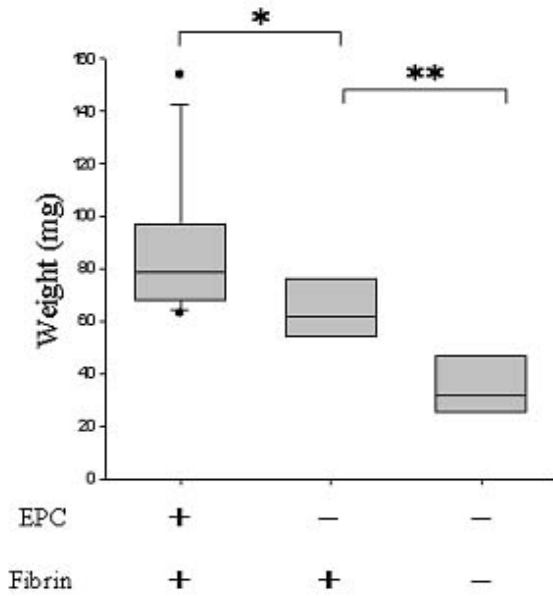


Figure 7. Weight of Medpor® sheet. * $p<0.001$, ** $p<0.01$.

섬유소를 처리한 경우 86.2 ± 25.2 mg, 섬유소만을 처리한 경우 64.6 ± 12.9 mg 그리고 처리하지 않은 경우 35.4 ± 15.3 mg이었다(Fig. 7).

헤모글로빈의 양은 측정되지 않았으나 백혈구와 적혈구는 확인이 되었으며, 내피전구세포와 섬유소를 처리한 경우 백혈구는 0.23 ± 0.02 ($\times 10^3$ cells/ μ l), 적혈구는 0.1 ± 0.01 ($\times 10^3$ cells/ μ l), 섬유소만을 처리한 경우 백혈구는 0.13 ± 0.01 ($\times 10^3$ cells/ μ l), 적혈구는 0.1 ± 0.01 ($\times 10^3$ cells/ μ l), 그리고 처리하지 않은 경우 백혈구는 0.02 ± 0.01 ($\times 10^3$ cells/ μ l), 적혈구는 0.0 ± 0.01 ($\times 10^3$ cells/ μ l)이었다. 내피전구세포와 섬유소를 처리한 군은 다른 군에 비하여 무게가 증가되었고 백혈구 및 적혈구도 증가되어 있었다($p<0.001$). 섬유소만을 처리한 군에서도 처리하지 않은 군에 비하여 무게 증가($p<0.01$)와 혈구세포의 증가($p<0.001$)를 확인할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Quantitation of blood cells in Medpor® sheet (mean±standard deviation)

	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)
EPCs+Fibrin [†]	$0.23 \pm 0.02^*$	0.1 ± 0.01
Fibrin [†]	$0.13 \pm 0.01^*$	0.1 ± 0.01
Medpor® only [§]	0.02 ± 0.01	0.0 ± 0.01

* $p<0.001$; [†] Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; [‡] Medpor® sheet treated with fibrin; [§] Untreated Medpor® sheet.

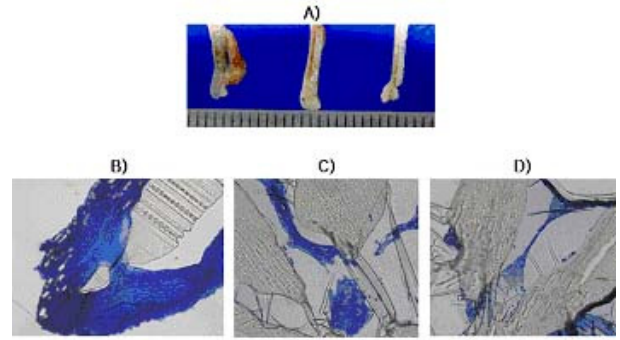


Figure 8. Implanted Medpor® sheet and its toluidine blue staining; (A) Gross finding of implanted Medpor® sheet; (B) Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; (C) Medpor® sheet treated with fibrin; (D) Untreated Medpor® sheet.

D. Medpor®판 내의 병리조직 소견

내피전구세포와 섬유소의 처리에 따른 조직 유착과 혈관 형성을 정성적으로 분석하기 위하여 회수된 Medpor®판을 포르말린으로 고정한 후 plastic resin 블록을 제작하고 1 μ m의 두께로 절단하여 조직 슬라이드를 만든 뒤 toluidine blue와 H&E로 염색하였다.

Toluidine blue 염색 결과 내피전구세포와 섬유소 처리 군과 섬유소 처리 군에서 처리하지 않은 군에 비하여 높은 세포밀도를 확인할 수 있었으며, 또한 섬유소처리 군에 비하여 내피전구세포와 섬유소처리 군에서 더 높은 세포밀도를 확인할 수 있었다(Fig. 8).

H&E 염색 상 Medpor®판 외벽을 비교 하였을 때 내피전구세포와 섬유소처리 군에서 조직의 조밀도가 높고 혈관의 분포가 많았다. 섬유소 처리 군에서도 처리하지 않은 군에 비하여 혈관분포 및 조밀도가 높게 나타났다(Fig. 9).

Medpor®판 내벽을 비교 하였을 때 내피전구세포와 섬유소처리 군에서 나머지 두 군에 비해 혈관의 분포가 많았다. 섬유소 처리 군에서도 처리하지 않은 군에 비하여 혈관분포가 높게 나타났으며 처리 하지 않은 군에서도 소량의 출혈 소견 이외에 약간의 혈관형성이 관찰되었다(Fig. 10).

고 찰

다공성 안와충전물의 사용으로 안구를 제거해야 하는 환자들의 미용적 만족도를 높일 수 있게 되었으나, 안와충전물의 감염 및 노출 등의 합병증 발생이 항상 문제가 되어왔다. 이러한 합병증을 예방하기 위해 다공성 삽입물을 안와 내에 삽입 시 자기유래나 동종유래의 물질인 골막 또는 사체의 공막으로 감싸 국소조직의 미란을 줄이고 삽입을 용이하게 하는 방법이 사용되고 있

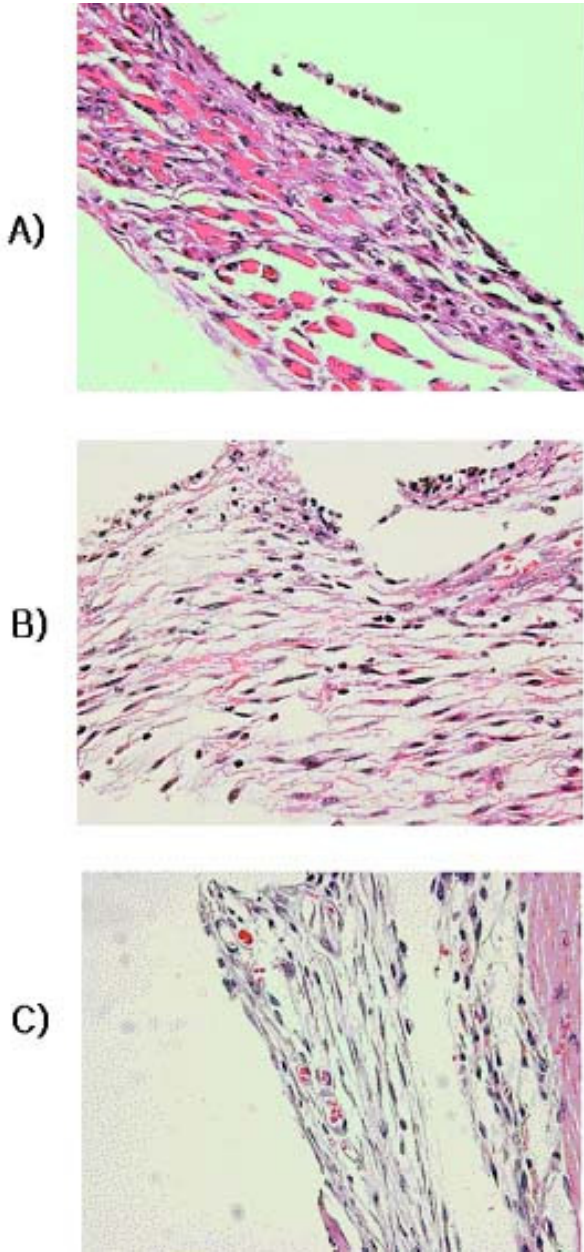


Figure 9. H&E staining of external wall of implanted Medpor®; (A) Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; (B) Medpor® sheet treated with fibrin; (C) Untreated Medpor® sheet.

다.²¹⁻²³ 또한 이러한 다공성 충전물의 혈관화에는 6~10개월 이상의 긴 시간이 필요하며, 의안의 움직임과 peg의 안정성을 위하여 필요한 천공술이 완전한 혈관화가 이루어진 후에야 가능하므로 섬유혈관화의 속도에 따라 환자의 완전한 재활이 이루어지는 시기가 달라지는 단점이 보고 되기도 하였다.²⁴

안와 내에는 섬유혈관화를 가능하게 하는 두 가지 골막 외 조직(extraperiosteal tissue)인 지방과 근육이 있다. 안와 내에 삽입된 다공성 삽입물이 먼저 접촉

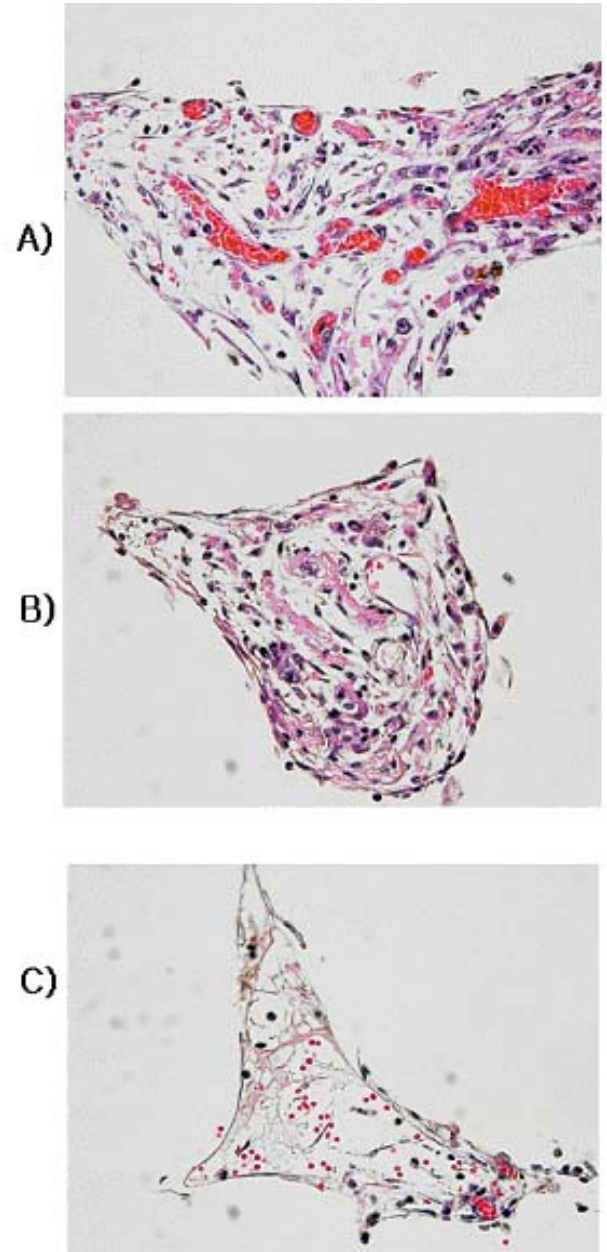


Figure 10. H&E staining of internal spaces of implanted Medpor®. (A) Medpor® sheet treated with EPCs and fibrin; (B) Medpor® sheet treated with fibrin; (C) Untreated Medpor® sheet.

한 지방과의 생체적합성(biointegration)이 이루어지려면 12개월이 소요된다. 그러나 다공성 폴리에틸렌 입방체를 지방보다는 골격근(skeletal muscle)에 삽입 시에 더 빨리 용화가 되고 특히, 근낭(fibrous capsule)을 제거하였을 때에 삽입물의 보다 많은 부분이 근 섬유와 접촉함으로써 섬유모세포침윤이 빨라진다. 따라서 수술 시에 외안근의 5~6 mm 앞부분의 근막을 제거한 후 일반적인 부착부위보다 좀 더 앞쪽으로 부착시킨 후 후방고정봉합을 시행한다.²⁵

그러므로 위에 언급된 안와 내로 다공성 삽입물 삽입 시에 공막으로 보호하는 방법은 삽입물 주위에 섬유막을 증가시켜서 주위조직과 삽입물 사이의 조직 미란을 감소시키지만 생체융합성이 감소하여 삽입물의 노출과 감염을 감소시키는 데는 도움이 되지 않았다. 그러므로 공막을 완전히 남겨둔 안구내용물제거술에서 다공성 삽입물의 노출이 많이 발생한다고 알려져 있다.⁴

이와 같은 합병증의 발생률은 삽입물이 생체융합성을 나타낼수록 감소되며 주위에 더욱 두터운 섬유막을 형성하게 된다. 따라서 삽입물의 섬유혈관화를 촉진시키는 기술을 개발하는 것이 절실히 요구되어져 왔다.

혈관화를 촉진시키기 위한 방법으로 혈관생성인자들이 관심을 끌고 있다. 그 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF) 등은 안구 내 여러 조직에서 세포의 증식을 활성화하고 창상치유를 촉진시킨다는 사실이 밝혀졌고, 이런 성장인자를 이용한 안와충전물의 혈관화를 촉진시키려는 연구가 시도되었다. 그 중에서도 bFGF는 새로운 모세혈관 형성에 필요한 여러 가지 세포학적 과정을 자극하여 창상치유에 필요한 신생혈관, 육아조직 그리고 상피화를 촉진시키는데, 내피세포에 의해 형성된 것이 기저세포 내에 일단 저장되게 된다.^{5,26}

Bigham et al²⁶은 recombinant human basic fibroblast growth factor (Rh-bFGF)를 사용한 토끼실험에서 bFGF로 처리한 수산화인회석(hydroxyapatite) 충전물 및 다공성 폴리에틸렌 충전물 군 모두에서 혈관화가 촉진되었다고 발표하였고, Soparkar et al⁹도 토끼실험에서 다공성 폴리에틸렌충전물의 섬유아세포 축적율이 epidermal growth factor (EGF)와 bFGF를 사용한 군에서 5주 후에 2~4배 높다고 하였다.

그러나 bFGF의 적정농도에 대한 정확한 문헌이 없으며 실제 임상에서 사용될 때 전신흡수에 따른 부작용 등이 고려되어야 한다. 결정적으로 여러 성장인자들의 외부 주입을 통하여 혈관신생을 일으키려는 시도는 이러한 물질들에 반응하여 혈관 신생을 형성하는 혈관 내피세포 수의 제한 때문에 확실한 효과를 보이지는 못하고 있다.

기존의 내피세포(endothelial cells, ECs)는 기존 혈관의 분화(angiogenesis)와 이에 관련된 혈관세포 증식(vasculogenesis)에 관여하지만 양이 적다는 단점이 있다. 그러나 내피전구세포는 새로운 혈관형성에 도움을 주며 혈관 내피세포의 수와 밀도를 동시에 증가시킬 수 있다. 이와 같은 내피전구세포에는 골수(bone marrow),²⁷ 말초단핵세포(human peripheral mo-

nonuclear cells)^{28,29} 및 지방조직¹⁰에서 배양된 내피전구세포가 있는데 골수의 경우에는 최근 들어 암 치료에 비교적 널리 사용되고 있으며 안전한 방법이지만 침습적이어서 위험이 따른다. 또한 말초단핵세포에서 내피전구세포를 분리하기 위해서는 말초혈액 50 ml에서 645 CD34+cells per milliliter 밖에 분리되지 않아 사용되어지는 혈액 양에 비하여 양이 적은 단점이 있었다.³⁰

저자들이 실제 말초혈액에서 내피전구세포를 분리하였을 때 증폭이 되지 않는 단점이 있어 인간복부지방 조직에서 분리하였다. 지방 조직 세포로부터 분리된 내피전구세포를 FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated anti-CD31과 PE (phycoerythrin)-conjugated anti-CD34로 염색한 결과 분리된 내피전구세포의 순도는 99%로 아주 높았으며, 내피전구세포의 특성인 UEA-1과 acLDL 섭취 또한 45~52%로 확인되었다.

그러나 분리된 내피전구세포를 세포배양을 하면 2일째에는 CD34의 발현에 변화가 없었으나 10일째에는 전구세포의 특성인 CD34의 발현이 감소되므로 배양 후 10일 이내의 내피전구세포를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

그러나 연구과정에서 내피전구세포단독으로 Medpor[®] 판에 처치한 경우 Medpor[®]가 소수성이고 생체조직이 아니므로 유착력이 떨어진다. 그래서 신생혈관 및 섬유아세포 증식을 유도시키는 작용과 접합효과에 의한 분리된 조직의 접합에 이용 될 수 있는 상품화된 섬유소(Tisseel[®] kit, Baxter)를 같이 처치하였다.

Rosenthal et al²⁹은 혈소판/섬유소원/트롬빈 혼합체를 이용하여 토끼에서 표층각막이식을 실시하였다. 이것은 혈장 내에 풍부한 섬유소는 지혈작용, 창상세포 반응유도, 기질형성을 위한 사상체의 형성, 신생혈관 및 섬유아세포 증식을 유도시키는 한편 접착 작용도 갖고 있는 물질로 알려져 왔다.

섬유소접착제의 창상치유에 대한 효과는 크게 세 가지인데, 첫째는 지혈효과로서 혈종의 형성을 피할 수 있게 하고, 두 번째는 접합효과가 있어 분리된 조직의 접합에 이용 될 수 있으며, 세 번째로 섬유소 아교 자체가 생리적 물질로서 섬유아세포 증식에 영향을 주어 창상치유에 도움이 될 수 있다고 한다.³¹ 섬유소 아교의 장력은 섬유소원의 농도와 섬유소 알파-사슬 사이의 교차결합에 비례하여 커지는 반면 아교의 분해속도는 적용부위에서의 아교층의 두께, 그 부위의 섬유소 분해 활성도의 정도, aprotinin의 양 등에 달려 있다. 이것을 사용할 때 트롬빈의 농도선택을 달리함으로써 응고 시작시간을 조절 할 수 있는데, 즉 트롬빈 500단위를

사용할 경우 응고는 수초이내에 일어나며 트롬빈 4단위를 사용하면 60초 이내에 응고가 시작된다. 섬유소원과 트롬빈의 농도를 높이면 결합력은 뛰어나지만 세포의 이동이 떨어지므로 생리적 농도인 0.25%보다 높은 0.5%로 설정하여 세포의 이동을 용이하게 하였다.

또한 섬유소는 proenzymes, enzyme inhibitors, extracellular matrix molecules and cells과 결합하여 상처받은 조직의 치유에 관여한다.³² Greer and Andreadis³³은 조직재생동안 다양한 섬유소의 기능에 대하여 보고하였는데 섬유소원과 결합하여 간접적으로 표피세포(epidermal cell)이동을 촉진한다고 하였다. 섬유소 응결은 상처조직과 견고한 결합을 형성하여 세포의 이동과 증식에 대한 발판(scaffold)으로서의 역할과 세포기능의 매개체(modulator)로 작용한다.

섬유소는 직접적으로는 thrombin,³⁴ basic fibroblast growth factor (bFGF),³⁵ platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (TGF- β)와 결합하고 간접적으로 bFGF, heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), PDGF and VEGF와 같은 heparin-binding growth factors와 결합한다.³⁶ 그러나 이와 같은 섬유소의 장점에도 불구하고 내피전구세포를 동시에 처치한 군에서 섬유소만 처치한 군 보다 Medpor[®] 판의 외벽과 내벽의 조직 조밀도와 혈관 분포가 많이 나타났으며 Medpor[®] 판의 평균무게가 통계적으로 유의하게($p<0.001$) 증가되어 있었다.

백혈구와 적혈구 수치도 높게 나타났는데 이는 Medpor[®] 판 분리 시 혈종이나 출혈이 없어 검체의 오염 및 주위 조직으로의 염증이 없었으므로 이와 같은 세포가 신생혈관내의 혈액세포에서 기원한 것이라고 생각된다.

본 연구 결과에서 보듯이 보다 빠른 섬유혈관화가 임상적으로 중요한 안구적출술 후의 Medpor[®] 삽입술 경우에 내피전구세포를 처치함으로써 혈관화를 동시에 얻어 혈관 내피세포의 수와 밀도를 동시에 증가시킬 수 있다. 이때 섬유소를 함께 처치하여 유착력을 향상시키고 신생혈관 및 섬유아세포의 증식을 유도시키는 작용으로 창상치유에 도움이 될 수 있다. 또한 향후 내피전구세포와 더불어 섬유소의 사용에 대한 보다 많은 연구가 필요하며 치료적 개념으로 사용할 때 어떻게 Medpor[®] 나 주위조직에 내피전구세포를 적절히 주입하느냐에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

- 1) Choi JC, Iwamoto MA, Bstandig S, et al. Medpor[®] motility coupling post: a rabbit model. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1999;15:190-201.
- 2) Mawn LA, Jordan DR, Gilberg S. Scanning electron microscopic examination of porous orbital implants. *Can J Ophthalmol* 1998;33:203-9.
- 3) Rubin PA, Nicaeus TE, Warner MA, Remulla H. Effect of sucralfate and basic fibroblast growth factor on fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene alloplastic implants using a novel rabbit model. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1997;13:8-17.
- 4) Remulla HD, Rubin PA, Shore JW, et al. Complications of porous spherical orbital implants. *Ophthalmology* 1995;102:586-93.
- 5) Rubin PA, Popham JK, Bilyk JR, Shore JW. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1994;10:96-103.
- 6) Karesh JW, Dresner SC. High-density porous polyethylene (Medpor[®]) as a successful anophthalmic socket implant. *Ophthalmology* 1994;101:1688-95.
- 7) Jordan DR, Brownstein S, Jolly SS. Abscessed hydroxyapatite orbital implants. *Ophthalmology* 1996;103:1784-7.
- 8) Karciglu ZA. Actinomyces infection in porous polyethylene orbital implant. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235:448-51.
- 9) Soparkar CN, Wong JF, Patrinely JR, Appling D. Epidermal and fibroblast growth factors enhance fibrovascular integration of porous polyethylene implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2000;16:337-40.
- 10) Kader KN, Moore LR, Saul JM, et al. Isolation and Purification of Canine Adipose Microvascular Endothelial cells. *Microvas Res* 2001;61:220-6.
- 11) Kenny D, Coughlan MG, Pagel PS, et al. Transforming growth factor beta 1 preserves endothelial function after multiple brief coronary artery occlusions and reperfusion. *Am Heart J* 1994;127:1456-61.
- 12) Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, et al. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther* 2001;8:523-33.
- 13) Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, et al. Coadministration of basic fibroblast growth factor and sucrose octasulfate (sucralfate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:941-8.
- 14) Li QF, Reis ED, Zhang WX, et al. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg* 2000;16:45-9.
- 15) Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, et al. Effect of time on the viability of ischemic skin flaps treated with vascular endothelial growth factor (VEGF) cDNA. *J Reconstr Microsurg* 1998;14:387-90.
- 16) Kryger Z, Dogan T, Zhang F, et al. VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in

- the rat. *Ann Plast Surg* 1999;43:172-8.
- 17) Kryger Z, Zhang F, Dogan T, et al. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: Examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 2000;53:234-9.
- 18) Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, et al. Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:1541-6.
- 19) Park Sh, Tepper OM, Galiano RD, et al. Selective Recruitment of Endothelial Progenitor Cells to Ischemic Tissues with Increased Neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 2004;113: 284-93.
- 20) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4167-71.
- 21) Buettner H, Bartley GB. Tissue breakdown and exposure associated with orbital hydroxyapatite implants. *Am J Ophthalmol* 1992;113:669-73.
- 22) Ainbinder DJ, Haik BG, Tellado M. Hydroxyapatite orbital implant abscess: histopathologic correlation of an infected implant following evisceration. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1994;10:267-70.
- 23) Beaver HA, Patrinely JR, Holds JB, Soper MP. Periocular autografts in socket reconstruction. *Ophthalmology* 1996;103: 149-8-502.
- 24) Perry AC. Integrated orbital implant. *Adv Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 1990;8:75-81.
- 25) Goldberg RA, Dresner SC, Braslow RA, et al. Animal model of porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1994;10:104-9.
- 26) Bigham WJ, Stanley p, Cahill JM Jr, et al. Fibrovascular ingrowth in porous ocular implants: the effect of material composition, porosity, growth factors and coatings. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1999;15:317-25.
- 27) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenital cells. *Embo J* 1999;18:3964-72.
- 28) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenital cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3422-7
- 29) Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol* 1975;14:872-.
- 30) Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM et al. Isolation of endothelial progenital cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg* 2002;35:827.
- 31) Schlag G, Redl H, Turnher M, Dinges HP. Importance of fibrin in wound repair. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1987;108:5-6.
- 32) Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann NY Acad Sci* 2001;936:355-7.
- 33) Greer DJ, Andreadis ST. A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003;121: 1210-6.
- 34) Pospisil CH, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JJ. Evidence that both exosites on thrombin participate in its high affinity interaction with fibrin. *J Biol Chem* 2003;278:21584-91.
- 35) Sahni A, Odriljin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1998;273:7554-9.
- 36) Clark RA. Fibrin Is a Many Splendored Thing. *J Invest Dermatol* 2003;121:111-2.

=ABSTRACT=

The Role of Endothelial Progenital Cells and Fibrin on Vascularization and Stability in Orbital Implant

**Jae Wook Yang, M.D., Ph.D.¹, Ho Young Lee, M.D.¹,
Sae Gwang Park, M.D., Ph.D.², Young Il Yang, M.D., Ph.D.³**

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Inje University¹, Pusan, Kora

Department of Microbiology, College of Medicine, Inje University², Pusan, Kora

Department of Pathology, College of Medicine, Inje University³, Pusan, Kora

Purpose: The effects of endothelial progenitor cells (EPCs) and fibrin on fibrovascular growth into porous polyethylene orbital implants (Medpor[®] sheet) were investigated using stem cells.

Methods: EPCs were separated from human adipose fat tissue for culture. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to identify the phenotype and to analyze the purity of EPCs cultivated from human adipose tissue. Processed Medpor[®] sheets were inserted in each quadrant of the subcutaneous fat layer under the dorsal surface of 20 anesthetized athymic nude mice, using sterile methods. Medpor[®] sheets processed with endothelial progenitor cells and fibrin were inserted into the two top quadrants, a Medpor[®] sheet processed with fibrin was inserted in the lower right quadrant, and an unprocessed Medpor[®] sheet was inserted in the lower left quadrant of each mouse. The mice were sacrificed on the seventh day. The adhesiveness and blood vessel formation were quantified by weight and the number of blood cells within the Medpor[®] sheets. Hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue stains were used to analyze fibrovascular and cell growth within the Medpor[®] sheets.

Results: The sheets processed with EPCs and fibrin were heavier and contained more white and red blood cells ($p<0.001$) than the other sheets. The sheets processed with fibrin alone were heavier ($p<0.01$) and contained more blood cells ($p<0.001$) than the unprocessed sheets. The degree of vessel formation and tissue adhesiveness was greatest in the group of Medpor[®] sheets processed with EPCs and fibrin. The sheets processed with fibrin only had greater tissue adhesiveness and fibrovascular proliferation than the unprocessed Medpor[®] sheets.

Conclusions: Endothelial progenitor cells and fibrin applied to Medpor[®] sheets improve fibrovascular proliferation and tissue adhesiveness. When both are applied together, a synergistic effect is seen.

J Korean Ophthalmol Soc 49(7):1135-1145, 2008

Key Words: Endothelial progenital cells, Fibrin, Fibrovascularization, Medpor[®] sheet

Address reprint requests to **Jae-Wook Yang, M.D., Ph.D.**

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Inje University of Medicine

#633-165 Kekum-dong, Pusanjin-gu, Pusan 614-735, Korea

Tel: 82-51-890-6016, Fax: 82-51-890-6329, E-mail: jwsyhyo@yahoo.co.kr