

쥐의 외안근 부분 절개술 후 데코린과 종양성장인자-베타의 발현

임영진¹ · 김규남¹ · 이나은¹ · 김성재¹ · 유지명^{1,2}

경상대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 경상대학교 건강과학연구원²

목적: 쥐의 외안근에 부분 절개를 시행한 후, decorin과 TGF- β 의 발현을 확인해보고자 하였다.

대상과 방법: 수컷 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐 열 마리의 우안 상직근을 노출시킨 후 부분 절개술을 시행하였고, 좌안은 상직근을 노출시킨 후 결막을 다시 봉합하였다. 수술 2주일 후 양안에서 상직근을 채취하여 Hematoxylin-eosin, Masson's trichrome 염색 및 면역조직화학염색을 시행하였다.

결과: 대조군에 비해 실험군에서 Hematoxylin-Eosin 및 Masson's trichrome으로 염색한 조직 주변으로 불규칙하고 밀집되어 있는 섬유 다발이 많이 관찰되었으며, 면역조직화학법에서 손상 받은 근육 세포주변에서 decorin과 TGF- β 가 강하게 발현한 것을 확인할 수 있었으며, 이중염색에서 TGF- β 가 발현한 자리에서 decorin이 함께 발현한 모습을 확인할 수 있었다.

결론: 쥐의 외안근을 부분 절개한 실험군에서 decorin이 발현하는 것을 확인할 수 있었으며, 이중 면역조직화학염색을 통해 TGF- β 가 발현하는 위치에서 decorin이 함께 발현하는 것을 확인하였다.

〈대한안과학회지 2013;54(1):143-148〉

사시 수술 후 흔히 발생할 수 있는 외안근의 섬유화는, 수술 후 과교정 혹은 저교정을 유발할 수 있고 심한 경우 안구운동의 장애를 가져올 수 있으며, 사시수술 후 조정술이나 재수술을 어렵게 만든다.^{1,2} 이러한 수술부위의 섬유화는 과도한 출혈, 부주의한 술기나 반복적인 수술에 의한 조직손상, 봉합물질 같은 이물질에 대한 조직반응, 수술 후 감염 등에 의해 발생한다.³

수술 후 외안근의 섬유화를 막기 위해 Hwang and Chang^{4,5}은 조정봉합술을 시행한 사시환자에서 점탄물질, polytetrafluoroethylene 등을 사용하여 외안근 섬유화가 지연되는 것을 실험적으로 증명하였지만, 일시적으로 섬유화의 진행을 늦추는 것에 국한되어 조정봉합술 후 재조정 할 때까지의 짧은 기간 동안에만 효과가 있다는 단점이 있다.

보다 지속적인 항섬유화 효과를 얻기 위해, 사시 수술 후 외안근에서 발생하는 섬유모세포의 증식을 억제할 목적으로 스테로이드, mitomycin C, 5-FU 등의 항섬유화제제를

사용하였다.⁶⁻⁸ 하지만 항섬유화제제의 사용은 넓은 범위의 세포괴사, 안압상승 등의 시력에 위협이 되는 합병증을 유발하는 단점이 있다.

위 물질들과 같이 decorin은 tumor growth factor- β (TGF- β)의 antagonist로 작용하면서 TGF- β 의 기능을 저하시켜 조직의 섬유화를 차단하는 역할을 한다고 알려졌다. 이 물질은 혈관 내부의 민무늬 근육의 손상 후 회복과 정과 골격근의 이형성증과 같은 근육질환에서 정상적으로 발현한다.⁹⁻¹² 외안근에서도 decorin의 발현 여부를 확인하기 위해 쥐의 외안근에 부분 절개를 시행한 후, 정상적인 치유과정에서 decorin과 TGF- β 의 발현을 확인하였다.

대상과 방법

실험동물은 생후 8주, 체중 200-300 g의 수컷 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐 열 마리(KOATEC, Pyeongtaek-si, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하였다. 사육장 내 빛의 강도는 명주기 동안은 300 lux, 암주기 동안 3-5 lux로, 12시간 간격으로 명암주기환경을 설정하였다. 내부온도와 습도는 각각 22-23°C, 70%로 유지하였으며, 개별적으로 사육을 하였으며 경상대학교 의과대학 및 동물실험실에서의 동물사용에 관한 규정(Institutional Animal Care and Use Committee of Gyeongsang National University)을 준수하여 동물실험에 사용하였다.

■ 접수 일: 2011년 7월 11일 ■ 심사통과일: 2012년 6월 30일
■ 게재허가일: 2012년 10월 29일

■ 책임저자: 유지명

경상남도 진주시 강남로 79
경상대학교병원 안과
Tel: 055-750-8164, Fax: 055-758-4158
E-mail: YJM@gnu.ac.kr

* 이 논문의 요지는 2011년 대한안과학회 제106회 학술대회에서 구연으로 발표되었음.

모든 실험은 한 수술자에 의해 수술 현미경하에서 시행되었다. 육안적으로 안구에 병변이 없는 흰쥐 10마리의 우안에 상직근 부분 절개술을 시행하였다. 흰쥐를 Ketamine hydrochloride (Ketamine[®] 50 mg/ml) 100 mg/Kg과 xy-lazine hydrochloride (Rumpun[®] 32 mg/ml) 10 mg/kg을 근육주사를 하여 마취를 시킨 후, 실험군인 우안의 결막을 각막주변부에서 박리시키고 상직근을 노출시켜 상직근 부착부에서 2 mm 지점에서 상직근 넓이의 절반 길이로 부분 절개를 한 후 다시 결막을 7-0 nylon 봉합사를 이용하여 봉합하였다. 대조군인 좌안은 각막주변부에서 결막을 박리시키고 상직근을 노출시킨 후, 다시 결막을 7-0 nylon 봉합사로 봉합하였다.

수술 후 대조군과 실험군 모두에서 창상의 치유과정을 육안으로 확인하였으며, 염증이냐 창상 벌어짐과 같은 합병증의 발생이 없음을 확인하였다. 2차적인 세균감염을 막기 위해 1주일 동안 하루에 2번 Moxifloxacin HCl 5.45 mg (Vigamox[®])을 투여하였다. 조직학적 변화를 확인하기 위해, 2주일 후 10마리의 흰쥐 모두에서 Ketamine[®] 100 mg/kg과 Xylazine[®] 10 mg/kg으로 근육주사하여 마취한 후 희생시키고, 양안에서 각각 상직근을 채취하여 4% paraformaldehyde에 고정된 후 Ethanol과 Xylene 용액에 순차적으로 처리하여 탈수시키고 공기방울 제거를 위해 진공상태에서 파라핀에 침투시켰다. 5 µm 두께의 연속절편으로 만든 후 gelatin-coated superfrost glass slides에 mounting하였다.

Hematoxylin-Eosin 염색은 근육의 위치나 일반적 형태를 관찰하기 위해 실시하였다. 두 군의 근육조직 모두를 Ethanol과 Xylene에 담가 파라핀을 제거한 후 각각의 슬라이드를 Hematoxylin solution (Sigma, St Louis, CA)로 염색 후 세척하고 HCl 용액에 침적 후 다시 세척한 다음, Eosin solution (Sigma)에 염색 후 탈수시켰다. 준비된 조직은 수술자가 아닌 한 명의 관찰자에 의해 광학현미경하에서 40배와 100배의 비율로 관찰하였다.

근육 조직 주변의 교원섬유의 차이를 비교하기 위해 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 각각의 조직 절편 슬라이드의 파라핀을 제거하고 Bouin's solution (Sigma)으로 매염시켰다. Phosphotungstic acid-phosphomolybdic acid (Sigma)와 aniline blue (Sigma)로 교원섬유를 염색하였다. 염색이 끝난 조직은 수술자가 아닌 한 명의 관찰자에 의해 광학현미경하에서 40배와 100배의 비율로 교원섬유의 차이를 관찰하였다.

Decorin과 TGF-β의 발현을 확인하기 위해 면역조직화학법을 사용하였다. 이를 위하여 두 군 모두에서 적출한 상직근의 절편 중 일부를 10% 파라핀에 포매시킨 후 조직을 10 µm 두께로 잘라 절편을 제작하였으며 Xylene에 담가

파라핀을 제거하였고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% Ethanol에 각기 담수시키고 증류수로 세척한 후 0.5% H₂O₂를 포함한 methanol로 반응시켰다. 1차 항체는 polyclonal anti-rabbit decorin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 monoclonal anti-tumor growth factor antibody (Sigma)를 사용하였고, 2차 항체로 biotinylated anti-rabbit IgG antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 면역형광 염색은 Alexa Fluor[™]-594 goat anti-rabbit IgG (Pierce [Rockford, IL, USA] and Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 Alexa Fluor[™]-488 chicken anti-goat IgG (Pierce [Rockford, IL, USA] and Invitrogen)로 실온에서 반응시킨 후, 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), (Sigma)를 0.003% H₂O₂로 처리하여 발색시켜 IX2-DSU disk scanning confocal microscope (Olympus, Wendenstrasse, Hamburg, Germany)를 사용하여 관찰하였다.

결 과

모든 실험에서 수술 후 감염이나 수술부위의 괴사와 같은 합병증은 나타나지 않았다. 수술 후 2주일째, 대조군 10안에 비해 실험군 10안에서 조직의 섬유화가 더욱 많이 발생한 것을 확인할 수 있었다. Hematoxylin-Eosin으로 염색한 조직표본을 광학 현미경으로 관찰한 결과 실험군에서 근육 세포 주변으로 불규칙하고 밀집되어 있는 섬유 다발이 관찰되었으며(Fig. 1), Masson's trichrome으로 염색한 실험군에서 회복된 근세포 사이로 밀집되어 있는 섬유 다발이 불규칙하게 배열되어 있는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2).

면역조직화학법으로 decorin과 TGF-β의 발현여부를 확인한 결과, 실험군의 손상 받은 근육 세포주변에 decorin과 TGF-β가 발현한 것을 확인할 수 있었으며, 이중염색을 한 조직에서는 TGF-β가 발현한 자리에서 decorin이 같이 발현한 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

Decorin은 24개의 leucine이 풍부한 아미노산으로 구성된 중심단백질에 하나의 glycosaminoglycan side chain으로 연결된 크기가 작은 proteoglycan이다.¹³ Decorin은 신체의 다양한 조직에서 발견되며, 여러 단백질과 반응하여 기질의 구조유지와 세포의 유착, 이동 및 증식에 생화학적으로 중요한 역할을 하고 있다.¹⁴⁻¹⁶ Decorin은 성장인자와 직접적으로 반응하여(p21, p27) cyclin-dependent kinase 억제물질들을 증가시켜 세포의 증식을 억제하는 효

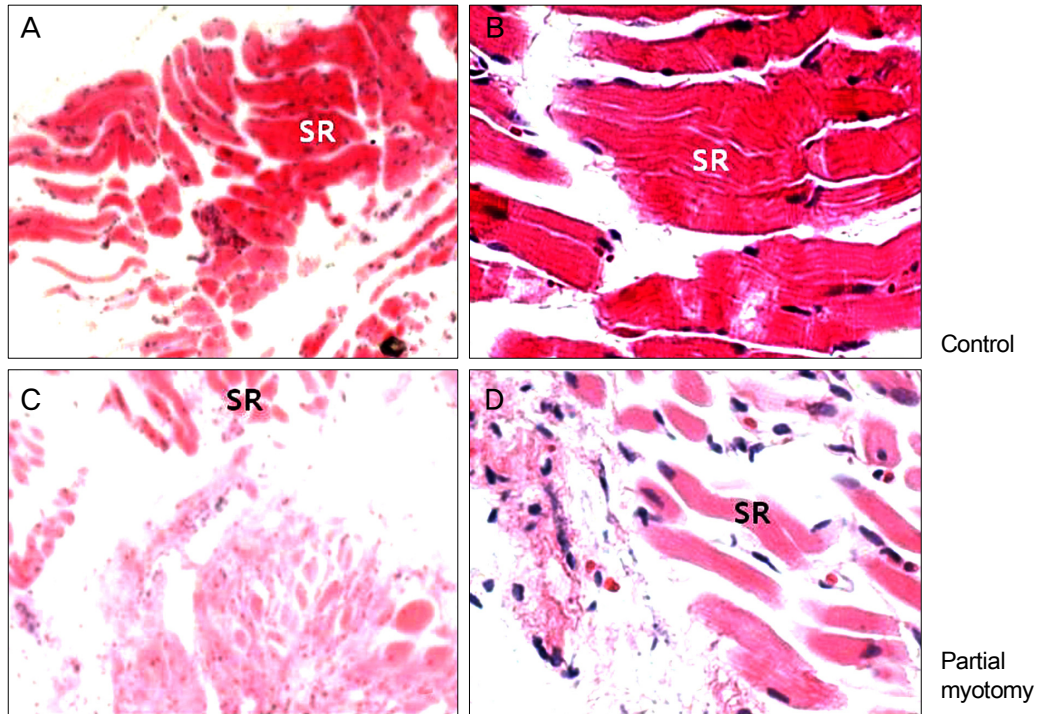


Figure 1. Light microscopic findings of the superior rectus muscles at 2 weeks after operation (H&E stain). (A, $\times 40$; B, $\times 100$) Control group. (C, $\times 40$; D, $\times 100$) Experimental group. The increasing density of fibrosis is observed in the experimental groups compared with control groups. SR = superior rectus.

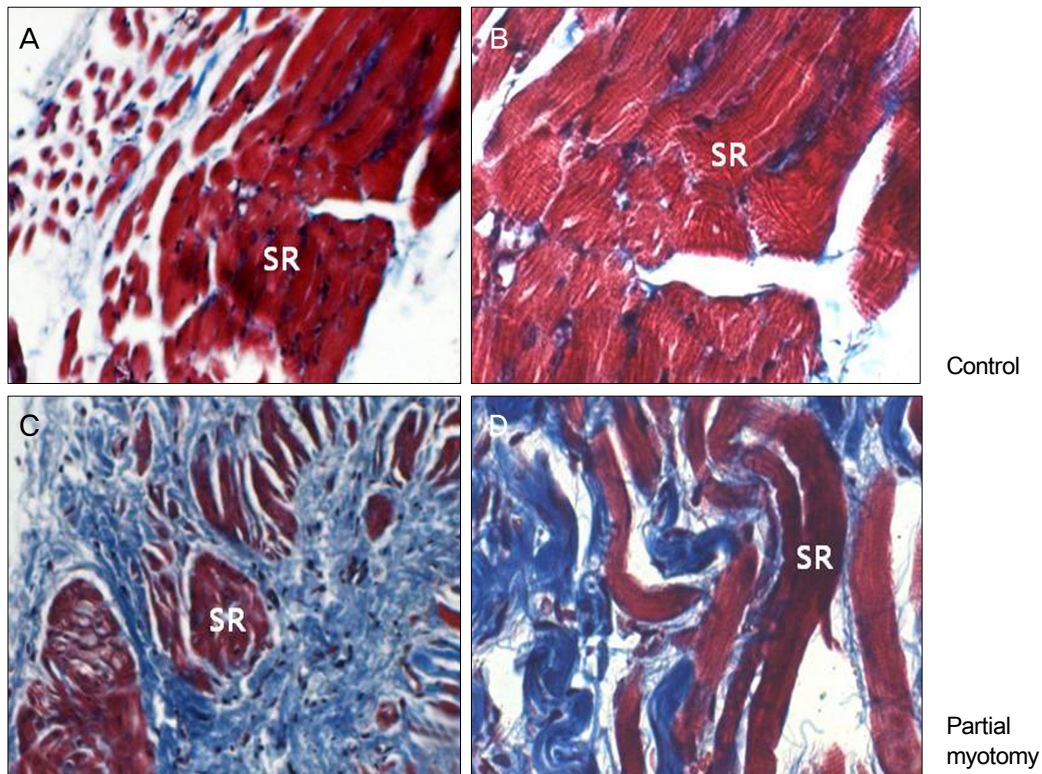


Figure 2. Light microscopic findings of the superior rectus muscles at 2 weeks after operation (Masson's trichrome stain). (A, $\times 40$; B, $\times 100$) Control group. (C, $\times 40$; D, $\times 100$) Experimental group. The irregularity of fibrotic bands is observed more than in the experimental groups compared with control groups. SR = superior rectus.

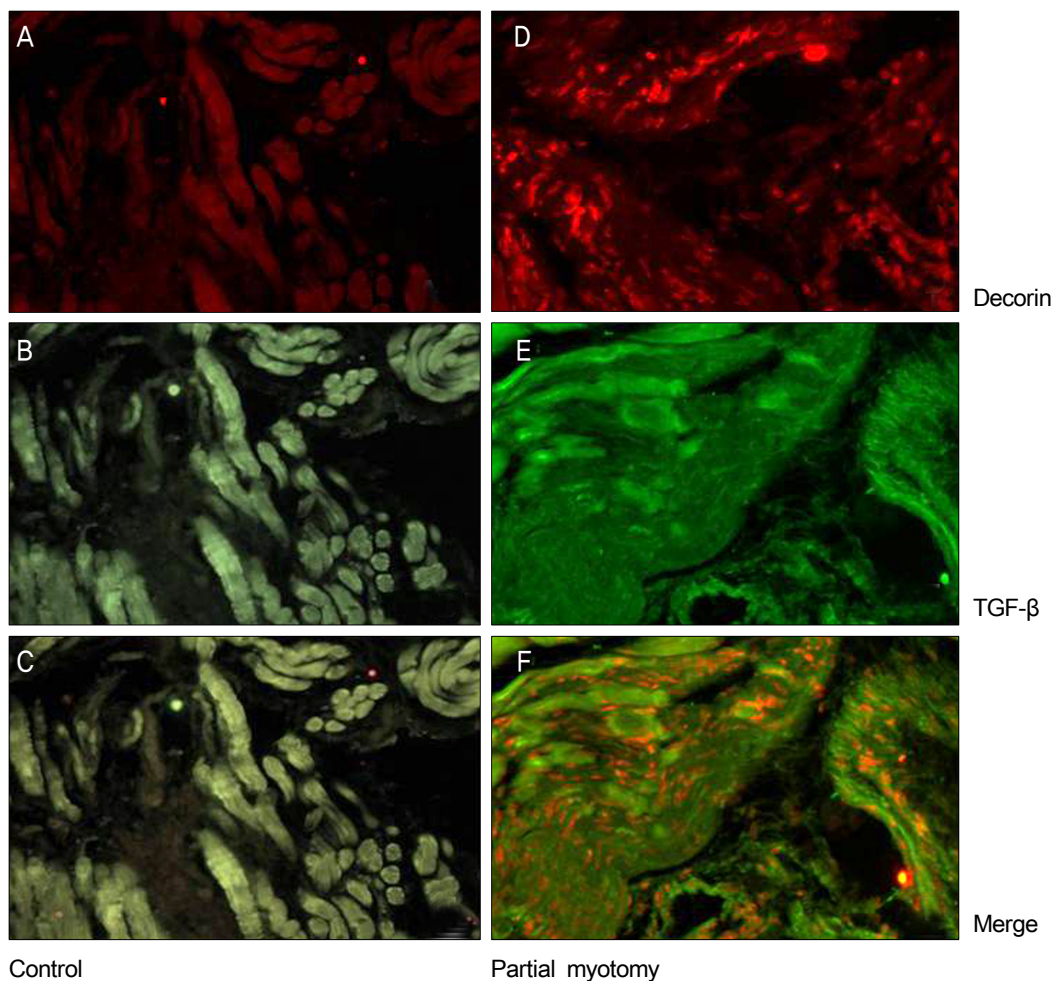


Figure 3. The immunohistochemical staining of decorin (A, D $\times 200$), TGF- β (B, E $\times 200$) and merging (C, F $\times 200$) at 2 weeks after operation. (A, B, C) No definite immune activity decorin or TGF- β were found. (D, E) The immune activity of decorin and TGF- β is observed. (F) Decorin and TGF- β are expressed at the same sites.

과를 나타내며,^{17,18} 상처 치유 인자인 TGF- β 와 결합하여 생화학적 활성도를 억제하여 섬유화 반응의 억제에 영향을 주는 것으로 알려졌다.^{19,20} Honardoust et al²¹는 정상 피부에서 비후흉터(Hypertrophic scar)보다 많은 decorin이 발현되는 것을 면역화학염색을 통해 밝혀내었고, Reich-Schupke et al²²은 Varicose vein 수술 중에 채취한 조직을 분석한 결과 잘린 정맥 끝에서 보다 신생혈관이 자라난 부분에서 decorin이 더욱 많이 발현한다 하였다. 저자들은 외안근에서도 이와 같은 반응이 일어나는지 알아보기 위해서 쥐에서 외안근을 실험적으로 손상시킨 후, decorin과 TGF- β 가 발현되는 것을 확인하고자 하였다.

Grefte et al²³은 쥐의 가자미근을 완전 절제를 한 후 2주일 후에 섬유화 골격이 가장 활발하게 형성된다고 실험적으로 증명하였으며, Aärimala et al²⁴은 근육이 손상된 후 1주일 후에 근 섬유들이 재생되기 시작하여 2주일 후에 섬유화 반응이 가장 활발하며 근섬유들의 재생이 멈춘다고 하였다.

이에 본 실험에서는 쥐에서 근절개술 후 2주일 후에 근육조직을 대조군과 동시에 채취하였고 Hematoxylin-Eosin, Masson's trichrome으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 실험군에서 회복된 근세포 사이로 밀집되어 있는 섬유 다발이 불규칙하게 배열되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 소견은 Woo et al²⁵이 토끼의 외안근을 절제한 후 2주일 후에 채취한 조직을 광학현미경으로 관찰했을 때 나타난 불규칙하고 밀집되어 있는 섬유 다발의 모습과 유사한 형태이었다.

Border et al²⁶은 사구체 신염을 앓고 있는 쥐에 TGF- β 를 주입하면 decorin의 발현이 증가하고 이는 생화학적으로 TGF- β 의 활성을 떨어뜨려 세포 외 기질물질의 합성을 저하시키면서 섬유화 반응을 감소시킨다 하였다. 또한 Mohan et al²⁷은 상처를 일으킨 각막이 치유되는 과정에서 TGF- β 가 발현되어 keratocyte를 myofibroblast로 전환시키며 각막의 섬유화를 유발하는 것과 동시에 decorin이 과

도발현(overexpression)되면서 TGF- β 을 억제시켜 각막의 섬유화를 저하시키면서 각막의 투명성을 유지할 수 있다고 하였다. 본 실험에서는 면역조직화학염색 결과에서 외안근의 부분절개를 시행했을 경우, 손상을 받았을 것으로 생각되는 근육세포 사이의 교원질섬유층을 따라 decorin이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, TGF- β 와 decorin을 이중면역조직화학염색을 시행했을 경우, 실험군의 근육세포 사이에서 TGF- β 가 발현되는 곳과 같은 위치에서 decorin이 발현하는 것을 볼 수 있다. 이는 TGF- β 와 decorin이 생화학적으로 직접적인 상호작용이 있다고 생각할 수 있다.

Decorin의 섬유화 억제반응 대한 연구는 신장, 폐, 골격근 등의 여러 장기에서 실험적으로 시도 되었지만,²⁸⁻³¹ 외안근에서 직접적으로 decorin의 발현이 증명된 연구는 없었다. 저자들은 실험적으로 쥐의 외안근을 부분 절제한 후, 정상적인 치유과정 중에 decorin이 발현하는 것을 확인할 수 있다. 특히 이중 면역조직화학염색을 통해 TGF- β 가 발현하는 위치를 따라 decorin이 함께 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 외안근에서 decorin이 작용하는 항섬유화 기능에 대한 연구로 외상환자에서 외안근의 손상이 있을 경우나 사시 수술 후에 외안근의 과도한 섬유화를 예방할 수 있는 방법을 모색해 볼 수 있을 것이며, 이를 위해서는 향후 발현 decorin의 발현시기에 따른 정량적 분석을 위한 연구와 decorin이 외안근 상처 치유과정에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- Metz HS. Restrictive factors in strabismus. *Surv Ophthalmol* 1983;28:71-83.
- Dunlap, EA. Surgery of muscle adhesions and effects of multiple operations. *Br J Ophthalmol* 1974;58:307-12.
- Gomel V, Urman B, Gurgan T. Pathophysiology of adhesion formation and strategies for prevention. *J Reprod Med* 1996;41:35-41.
- Hwang JM, Chang BL. Use of Viscoat for delayed postoperative adjustable suture strabismus surgery in rabbits. *Binocul Vis Strabismus Q* 1996;11:137-42.
- Hwang JM, Chang BL. Delayed reattachment of extraocular muscles in rabbits using thin polytetrafluoroethylene. *Ophthalmic Surg Lasers* 1997;28:59-64.
- Oh SO, Chang BL, Lee J. Effect of mitomycin C on delayed adjustment in experimental strabismus surgery. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:51-8.
- Kim JH, Jeong SY, Jung MH, Hwang JM. Use of polyurethane with sustained release dexamethasone in delayed adjustable strabismus surgery. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1450-4.
- Hwang JM, Chang BL. Combined effect of Interceed and 5-fluorouracil on delayed adjustable strabismus surgery. *Br J Ophthalmol* 1999;83:788-91.
- Siriwardena D, Khaw PT, King AJ, et al. Human antitransforming growth factor beta(2) monoclonal antibody--a new modulator of wound healing in trabeculectomy:a randomized placebo controlled clinical study. *Ophthalmology* 2002;109:427-31.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;360(6402):361-4.
- He F, Zhang Q, Kuruba R, et al. Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:746-51.
- Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, et al. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain* 2005;128(Pt 11):2546-55.
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998;17:1-19.
- Thiesen SL, Rosenquist TH. Expression of collagens and decorin during aortic arch artery development: implications for matrix pattern formation. *Matrix Biol* 1995;14:573-82.
- Merle B, Malaval L, Lawler J, et al. Decorin inhibits cell attachment to thrombospondin-1 by binding to a KKTR-dependent cell adhesive site present within the N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 1997;67:75-83.
- Merle B, Durussel L, Delmas PD, Cl  zardin P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. *J Cell Biochem* 1999;75:538-46.
- De Luca A, Santra M, Baldi A, et al. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1996;271:18961-5.
- Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, et al. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:777-84.
- Hildebrand A, Romar  s M, Rasmussen LM, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;302(Pt 2):527-34.
- Kaname S, Ruoslahti, E. Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor-beta 1. *Biochem J* 1996;315(Pt 3):815-20.
- Honardoust D, Varkey M, Hori K, et al. Small leucine-rich proteoglycans, decorin and fibromodulin, are reduced in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2011;19:368-78.
- Reich-Schupke S, Mumme A, Altmeyer P, Stuecker M. Decorin expression with stump recurrence and neovascularization after varicose vein surgery--a pilot study. *Dermatol Surg* 2011;37:480-5.
- Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42:813-9.
- A  rimaa V, K      inen M, Vaitinen S, et al. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscul Disord* 2004;14:421-8.
- Woo KJ, Lee KS, Choi DG, Choi MY. The effect of subconjunctival injection of bevacizumab after resection of muscle in rabbit models. *J Korean Ophthalmol Soc* 2010;51:423-9.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;360:361-4.

- 27) Mohan RR, Tovey JC, Gupta R, et al. Decorin biology, expression, function and therapy in the cornea. *Curr Mol Med* 2011;11:110-28.
- 28) Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, et al. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 1996;2:418-23.
- 29) Giri SN, Hyde DM, Braun RK, et al. Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Biochem Pharmacol* 1997;54:1205-16.
- 30) Fukushima K, Badlani N, Usas A, et al. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 2001;29:394-402.
- 31) Grisanti S, Szurman P, Warga M, et al. Decorin modulates wound healing in experimental glaucoma filtration surgery: a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:191-6.

=ABSTRACT=

Decorin and TGF- β Expression after Partial Myotomy of the Extraocular Muscle in Rat

Young Jin Lim, MD¹, Gyu Nam Kim, MD¹, Na Eun Lee, MD¹, Sung Jae Kim, MD¹, Ji Myong Yoo, MD, PhD^{1,2}

*Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University School of Medicine¹, Jinju, Korea
Institute of Health Science, Gyeongsang National University School of Medicine², Jinju, Korea*

Purpose: To report the expression of decorin and TGF- β in partial myotomy of the extraocular muscle in rats.

Methods: Partial myotomy of the superior rectus muscle was performed on the right eye of 10 Sprague-Dawley rats followed by exposure of the left superior rectus muscle and a simple suture of the conjunctiva. The bilateral superior rectus muscle was obtained from all rats at 2 weeks postoperatively. The tissues were observed under light microscopy with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome staining and immunohistochemistry.

Results: Histological examinations of the surgical area at 2 weeks after postoperatively showed irregularly concentrated fibrosis on light microscopy with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining of the experimental eyes. Immunohistochemistry showed that expression of decorin was in the same location as TGF- β in the experimental group.

Conclusions: The expression of decorin was found in the healing process after partial myotomy of the extraocular muscle in rats. Immunohistochemistry showed that expression of decorin was in the same location as with TGF- β .

J Korean Ophthalmol Soc 2013;54(1):143-148

Key Words: Decorin, Extraocular muscle, Fibrosis, Tumor growth factor

Address reprint requests to **Ji Myong Yoo, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Hospital
#79 Gangnam-ro, Jinju 660-702, Korea
Tel: 82-55-750-8164, Fax: 82-55-758-4158, E-mail: YJM@gnu.ac.kr