



家兎角膜上皮細胞増殖能に及ぼす上皮増殖因子あるいはインスリン様成長因子-1とサブスタンスPの効果

原, ルミ子
片上, 千加子
山本, 節

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 59(1/2/3/4):9-16

(Issue Date)

1999-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177406>



家兎角膜上皮細胞増殖能に及ぼす上皮増殖因子

あるいはインスリン様成長因子-1と

サブスタンスPの効果

原 ルミ子*, 片 上 千加子**, 山 本 節**

* 新日鉄広畑病院眼科

** 神戸大学医学部眼科学教室

(平成10年12月17日受付)

要 約

神経麻痺性角膜症の発症に関与すると推測されるサブスタンスP (SP) の角膜上皮に対する作用を解明する目的で, SPの角膜上皮細胞増殖能に対する作用を上皮増殖因子 Epidermal growth factor (EGF) あるいはインスリン様成長因子-1 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) との併用により in vivo, in vitro の実験系で検討した。in vivo の実験として, 白色家兎角膜中央部に直径6 mmの上皮欠損を機械的に作製し, SP (S群), EGF (E群), IGF-1 (I群), SP+EGF (SE群), SP+IGF-1 (SI群), 対照として生理的食塩水 (C群) を1日6回点眼し, 各群の治癒経過を比較検討した。48時間後に強角膜片を摘出し, ^3H -チミジンで標識後オートラジオグラフィに供した。in vitro 実験としては, 家兎角膜上皮細胞をEGFあるいはIGF-1添加または非添加のもとSPを含む培養液中で24時間培養し, ^3H -チミジンオートラジオグラフィに供した。in vivo 実験では, SE群, SI群において角膜上皮欠損の治癒が促進された。 ^3H -チミジンオートラジオグラフィの結果, in vivo, in vitro いずれの実験においてもC群, S群に比しE群, SE群, SI群において角膜上皮細胞増殖能が促進された。以上の結果より, SPとEGFあるいはIGF-1との併用は角膜上皮創傷治癒を促進し, 角膜上皮細胞増殖能を促進することが明らかとなった。

I 緒 言

角膜上皮障害は通常比較的速やかに修復される。角膜上皮の修復は, 上皮細胞の伸展・増殖・分化の3段階で行われる¹⁾²⁾³⁾。しかし, 時に正常な創傷治癒機構が働かず, 上皮欠損が遷延化することがある。その

ような病態の一つに三叉神経障害に伴って角膜上皮障害を生じる神経麻痺性角膜症が知られているが, その発症に神経伝達物質の一つであるサブスタンスP (SP) の関与が示唆されている。SPは11個のアミノ酸からなるペプチドであり⁴⁾⁵⁾, その作用については, 平滑筋細胞, 線維芽細胞, 内皮細胞の増殖を促進することが報告⁶⁾⁷⁾されているが, 角膜上皮細胞に対する作用については明らかにされていない。近年SPが細胞増殖促進因子との相互作用により角膜上皮の伸展を促進することが報告⁸⁾され, その作用が解明されつつあるが角膜上皮細胞増殖能に対する作用については未だ不明の点が多い。今回我々は, 細胞増殖因子であるEpidermal growth factor (EGF) およびInsulin-like growth factor 1 (IGF-1) との相互作用によるSPの角膜上皮細胞増殖能に及ぼす影響をin vivo, in vitro 両実験系において検討したので報告する。

II 実験方法

1. in vivo実験

実験には, 成熟白色家兎 (Japanese White, 体重2~3 kg) 16匹32眼を用いた。家兎に塩酸ケタミン (ケタラル®) の筋肉内注射による全身麻痺と0.4%塩酸オキシプロカイン (ベノキシール®) による点眼麻酔を施した後, 両眼角膜中央部に直径6 mmの上皮欠損をメスにて機械的に作製した。家兎を6群に分け, 角膜上皮欠損作製直後から3時間間隔で1日6回以下の点眼を行った。

S群: SP (BACHEM社) を1 mg/mlの濃度に生理的食塩水で溶解したもの

E群: EGF (大塚製薬より供与) を10 μg /mlの濃度に生理的食塩水で溶解したもの

SE群: SPおよびEGFの両者

キーワード: サブスタンスP, EGF, IGF-1, 角膜上皮細胞増殖能, 神経麻痺性角膜症

I群: IGF-1 (BACHEM社)を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に生理的食塩水で溶解したもの

SI群: SPおよびIGF-1の両者

C群: 生理的食塩水 (対照群)

角膜上皮欠損作製直後, 6, 18, 24, 30, 42, 48時間後に上皮欠損部をメチレンブルーにて染色し, 前眼部写真撮影を行い, 欠損面積をNIH-imageにて測定した。また, 角膜上皮欠損作製48時間後にベントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®]) の静脈内注射で致死させた後眼球を摘出し, 強角膜片を $10\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -チミジン (amersham, $100\sim 130\text{Ci}/\text{mmol}$) を含むDulbecco's minimum essential medium (DME) (GIBCO) 中で, 37°C , 4時間標識した。その後, 10%ホルマリンで固定し, 型のごとくパラフィン包埋後, 強角膜切片を作製し, オートラジオグラフィーに供した。すなわち, 既報⁹⁾の方法に準じて暗室内で乳剤 (50%Konica NR-M2, コニカ) に浸した後に乾燥させ, シリカゲル入りの暗箱の中で 4°C で3週間露出させた。露出後フジレンドール (富士フィルム) で5分間現像し, フジレンフィックス (富士フィルム) で5分間定着させ, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡下において角膜上皮細胞による ^3H -チミジンの取り込みを観察した。

尚, 実験は「動物の保護および管理に関する法律」に従った。

2. in vitro 実験

2代目培養家兎角膜上皮細胞 (Corne Pack, クラボウ社製) を16穴チェンバースライド (Nalge Nunc International, Naperville, USA) に 5.0×10^3 細胞/穴播種し増殖用無血清液体培地 (RCGM) で5日間培養し, sub-confluent の状態となったところで培養液を増殖剤を含まない基礎培地 (RCBM) と交換し, 24時間さらに培養した。その後SPを 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M含んだRCBMと交換し, EGF ($10\text{ng}/\text{ml}$) あるいはIGF-1 ($10\text{ng}/\text{ml}$) 添加, 非添加のもと24時間培養し, ^3H -チミジン ($10\mu\text{Ci}/\text{ml}$) で4時間標識した後, カルノア固定液で15分間固定後上述の方法に準じてオートラジオグラフィーに供した。対照にはSPもEGFあるいはIGF-1も含まないRCBMのみで培養したものを用いた。HE染色後光学顕微鏡下で ^3H -チミジンの取り込みを観察した。

尚, 得られた結果はFischerのPLSDの多重比較検定を用いて各群間あるいは対照群との間の有意性を検定した。

III 結 果

1. in vivo 実験

1) 角膜上皮欠損治癒経過

SPとEGF点眼による経時的角膜上皮欠損治癒経過を図1に, またSPとIGF-1点眼による経時的角膜上皮欠損治癒経過を図2に示す。角膜上皮欠損作製直後の欠損面積を基準に, その欠損率の経時的な変化を表したものである。各群とも殆どlag phaseを伴わずほぼ直線的に欠損面積の減少が認められた。角膜上皮欠損作製18時間後までは各群においてその創傷治癒に殆ど差を認めなかったが, 24時間以降C, S群に比しE, SE群あるいはSI群において創傷治癒が促進され, 48時間後ではSE群およびSI群は特に他群に比し創傷治癒促進が認められた。

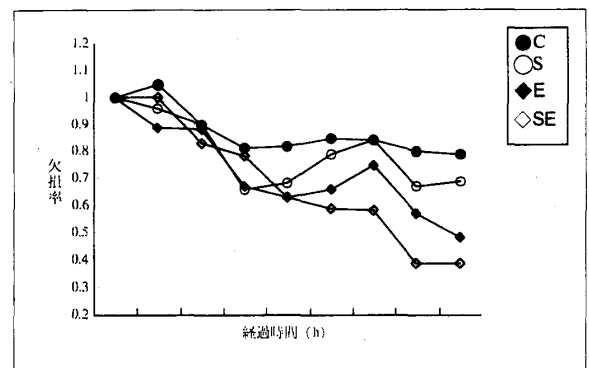


図1 SPとEGF点眼による角膜上皮欠損治癒経過
経時的に撮影した前眼部写真をもとに, NIH-imageを用いて上皮欠損面積を測定し, 横軸には時間を, 縦軸には角膜上皮欠損作製直後の面積を基準に各撮影時間における角膜上皮欠損面積をその比率で表した。C, S, E, SEは各々上皮欠損作製後生理食塩水, SP, EGF, SP+EGFを点眼したものの治癒経過を示す。

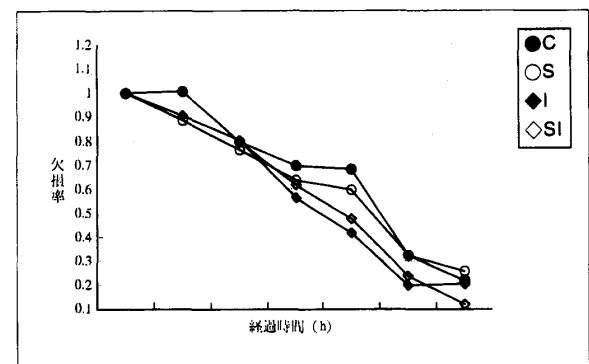


図2 SPとIGF-1点眼による角膜上皮欠損治癒経過
図1と同様に角膜上皮欠損面積の比率を経時的に表した。C, S, I, SIは各々上皮欠損作製後生理食塩水, SP, IGF-1, SP+IGF-1を点眼したものの治癒経過を示す。

2) ^3H -チミジンオートラジオグラフィー

^3H -チミジンオートラジオグラフィーの結果をそれぞれ図3, 図4に示す。これを各群10切片において1切片当たりの上皮基底細胞数および ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数を計測し, C群の切片における上皮基底細胞数を基準に各切片の ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数を補正し, その平均値をグラフに表したものが図5, 図6である。 ^3H -チミジン取り込み細胞数はC群と比較してS群では殆ど差を認めなかったが, E群, SE群においては有意に増加しており, 特にSE群においてはE群よりもさらなる増加を認めた($P<0.001$)。また, IGF-1との併用については, C群と比較してS群, I群では有意差を認めなかったが, SI群において有意に増加していた。($P<0.001$)

2. in vitro 実験

各群の ^3H -チミジンオートラジオグラフィーの結果を表1に示す。計10回の培養を行い, 各培養実験において各群それぞれ無作為に選んだ4個の顕微鏡視野中の全細胞数に対する ^3H -チミジン取り込み細胞数の割合を計測し, 平均化したものを比較すると, SP単独添加群においては, 対照群と比較していずれの濃度においても有意な増加は認められなかった。EGF単独

表1 ^3H -チミジン取り込み培養角膜上皮細胞の比率

家兎角膜上皮細胞をチェンバースライド上でSPを含んだ培養液中でEGFあるいはIGF-1を添加, 非添加のもと24時間培養し, ^3H -チミジンにて標識後, オートラジオグラフィーに供した。各群の無作為に選んだ4個の顕微鏡視野中の全細胞数に対する ^3H -チミジン取り込み上皮細胞数の割合を, 対照群のそれを1とした比率を示す。

*対照群に対し有意差を認めた。(Fischerの検定 $P<0.01$)

SP濃度	0	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
非添加群	1	0.98 ± 0.37	1.20 ± 0.76	1.44 ± 0.57
EGF添加群 ($10\text{ng}/\text{ml}$)	$4.08 \pm 2.25^*$	$7.50 \pm 3.36^*$	$6.49 \pm 3.08^*$	$9.38 \pm 4.87^*$
IGF-1添加群 ($10\text{ng}/\text{ml}$)	1.11 ± 0.35	$2.33 \pm 0.68^*$	$2.25 \pm 0.45^*$	$2.71 \pm 0.17^*$

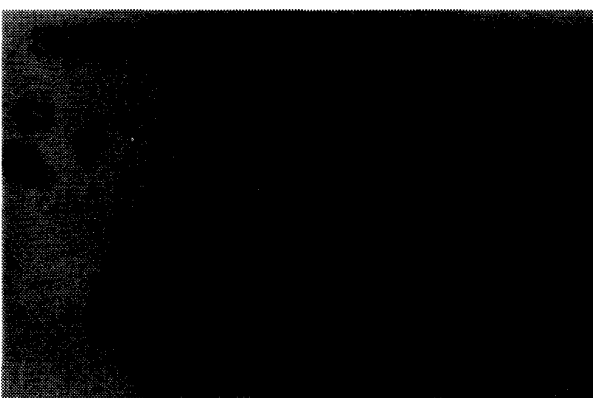
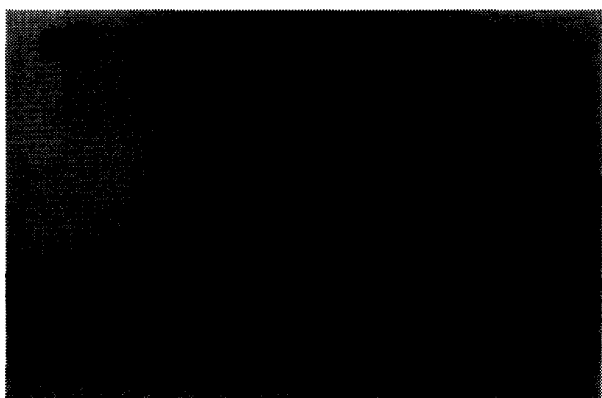
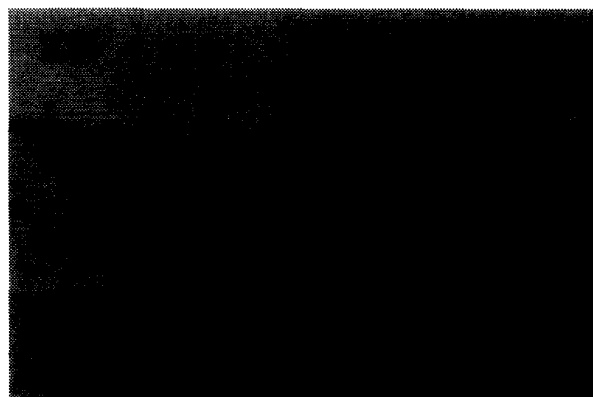
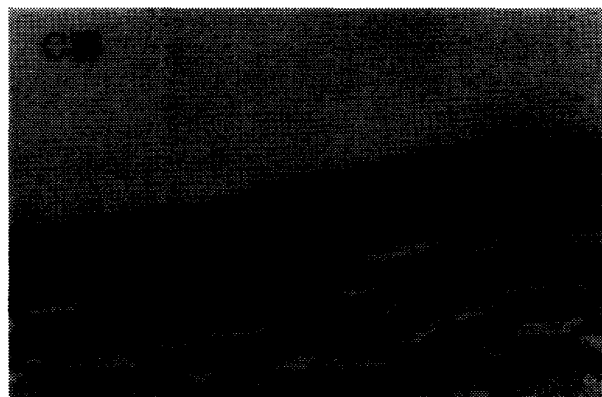


図3 ^3H -チミジンオートラジオグラフィー

家兎角膜上皮欠損を円靱刀にて作製し, 生理的食塩水(C群), SP(S群), EGF(E群)またはSP+EGF(SE群)を1日6回点眼した。48時間後に摘出した強角膜片を ^3H -チミジンにて標識し, オートラジオグラフィーに供した。E群, SE群において他群に比較して多数の ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞がみられる。▼は ^3H -チミジン取り込み細胞を示す。バーは $200\mu\text{m}$

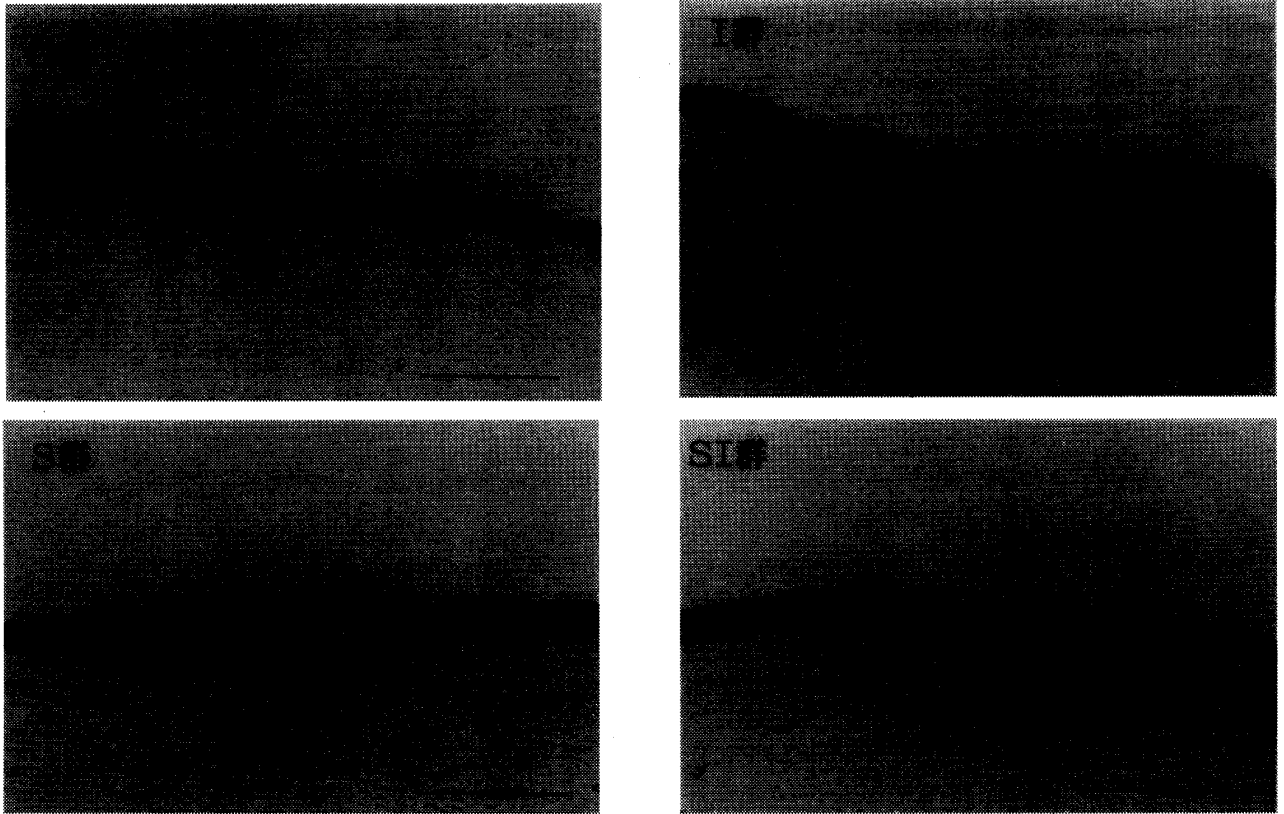


図4 ^3H -チミジンオートラジオグラフィー

家兎角膜上皮欠損を円靱刀にて作製し、生理的食塩水 (C群), SP (S群), IGF (I群) またはSP+IGF-1 (SI群) を1日6回点眼した。48時間後に摘出した強角膜片を ^3H -チミジンにて標識し、オートラジオグラフィーに供した。SI群において他群に比較して多数の ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞がみられる。

▼は ^3H -チミジン取り込み細胞を示す。バーは $200\mu\text{m}$

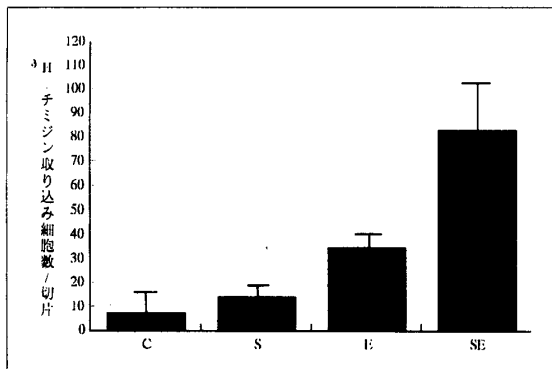


図5 SPおよびEGF点眼による ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数 (in vivo 実験)

各群各々10枚の ^3H -チミジンオートラジオグラフィーの切片において ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数および上皮基底細胞数を計測し、C群の基底細胞数を基準に ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数を補正し、平均値±標準偏差を示したグラフである。E群、SE群において他群に比較して ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数の有意の増加を認め、SE群においてはさらなる増加を認める。(いずれも $P<0.001$)

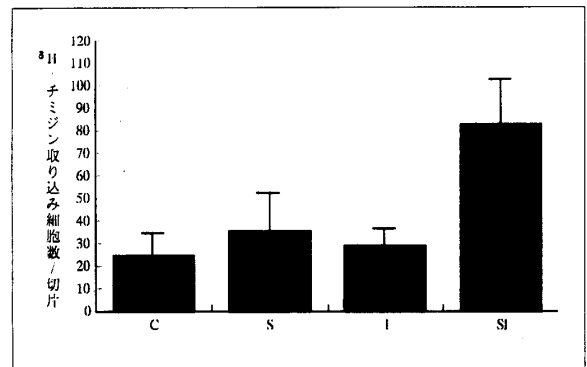


図6 SPおよびIGF-1点眼による ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数 (in vivo 実験)

図5同様に各切片における ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数の平均値±標準偏差を示したグラフである。SI群において他群に比較して ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数の有意の増加を認める。(P<0.001)

添加群においては対照群と比較して³H-チミジン取り込み細胞数の増加が認められ ($P < 0.01$), SPとの併用によりさらなる増加を認めた。 ($P < 0.001$)

IGF-1 単独添加群においては対照群と比較して有意な増加は認められなかったが, SPとIGF-1 との併用添加群では対照群と比較し, 有意な取り込み細胞数の増加を認めた。 ($P < 0.01$) EGF, IGF-1 添加群において, いずれもSPの濃度による依存性はなかった。

IV 考 察

三叉神経障害に伴って角膜上皮障害を生じる神経麻痺性角膜症の発症に神経伝達物質の一つであるSPの関与が示唆されている。SPは Tachykinin family の一つであり, 11個のアミノ酸よりなるペプチドで⁴⁾⁵⁾, その作用については, 平滑筋収縮作用, 血管拡張作用, 肥満細胞からのヒスタミン遊離作用等が報告されている^{10) 11) 12)}。また平滑筋細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞に対し増殖促進作用を有するとの報告⁶⁾⁷⁾もある。角膜においては, 知覚神経である三叉神経が分布しており, 角膜および虹彩には多くのSP陽性線維が免疫染色により証明¹³⁾されている。今回神経麻痺性角膜症の発症機序解明の一助とするため, SPの角膜上皮細胞に対する作用を解明する目的で, in vivo, in vitro 両実験を行った。

まず白色家兎を用いた in vivo 実験において, SPとEGFを点眼した実験では, 角膜上皮欠損治癒は48時間後, EGFを点眼した群 (E群) およびSPとEGFの両者を点眼した群 (SE群) において他の2群 (C群, S群) に比し有意に促進されていた。さらにSE群においてはE群よりも治癒の促進を認めた。創傷治癒経過を比べると, 18時間後までは各群に大差を認めず, 24時間後よりその創傷治癒速度に差が認められた。角膜上皮の創傷治癒は, 細胞の伸展 (移動)・分裂 (増殖)そして分化の3段階で行われており¹⁾²⁾³⁾, 分裂 (増殖)が活発になるのは12ないし24時間後とされている²⁾¹⁴⁾。今回の実験においてみられるように, 上皮欠損作製後一定時間をおいてその群間の創傷治癒速度に差が生じ始めていることから, SE群での治癒促進は増殖段階で起こっていることが推察される。そこで各群における角膜上皮細胞増殖能を³H-チミジンオートラジオグラフィにより検討した。その結果上皮欠損作製48時間後の角膜上皮細胞増殖能は, E群およびSPとEGFを併用したSE群において他のC群, S群に比較し有意に亢進していた。またSE群においてはE群よりもさらなる亢進を認めた。EGFの角膜上皮細胞

増殖促進作用についてはすでに報告されている¹⁵⁾。今回の実験結果よりSPは単独では角膜上皮細胞増殖能促進作用を有しないが, EGFとの相互作用によりEGF単独による角膜上皮細胞増殖促進作用を増強させることが明らかとなった。そこで, 次に同じ細胞増殖因子の1つであるIGF-1とSPとの相互作用について検討した。角膜上皮欠損治癒は48時間後, SPとIGF-1の両者を点眼した群 (SI群) においてのみ他の群に比し有意に促進されており, ³H-チミジン取り込み細胞数もSI群において他のC群, S群, I群に比較し有意に亢進していた。IGF-1はSPと同様単独点眼では角膜上皮細胞増殖能促進を認めなかった。IGF-1は網膜血管内皮細胞や網膜色素上皮細胞の増殖を促進し^{16) 17)}, IGF-1投与により糖尿病網膜症が悪化したとの報告¹⁸⁾もあるが, 角膜上皮細胞に対しては, 今回の実験では単独では増殖能に影響を与えなかった。以上の結果よりSPはEGFやIGF-1等の細胞増殖因子との相互作用により, 角膜上皮細胞増殖能を促進し, 角膜上皮欠損の修復を促進することが明らかとなった。

次に 培養家兎角膜上皮細胞を用いた in vitro の系で, SPの角膜上皮細胞増殖能に対する作用を検討した結果, 対照群やSPあるいはIGF-1の単独添加群に比し, EGF単独添加群およびSPとEGFあるいはIGF-1の併用群において³H-チミジン取り込み細胞数の増加が認められ, in vitro の系でもSPはEGFあるいはIGF-1との相互作用により角膜上皮細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

SPの角膜上皮細胞に及ぼす作用についてはこれまで不明の点が多かった。しかし, 教室の川上らは¹⁹⁾神経麻痺性角膜症の実験モデルであるカブサイシン投与ラットにおいて角膜におけるSPの発現の減弱と角膜上皮細胞増殖能の低下が認められたことより, SPの角膜上皮細胞増殖能への関与を示唆した。

前述したように, SPはヒト平滑筋細胞やヒト線維芽細胞あるいは血管内皮細胞に作用し, その増殖を促進したり⁶⁾, また血中のT-リンパ球の増殖を促進する²⁰⁾など, 様々な細胞に作用しその増殖能を直接促進させる報告が散見される。しかし今回の実験で明らかな様に角膜上皮細胞に対しては直接的な増殖促進作用を有しないと考えられる。しかし細胞増殖因子の一つであるEGFあるいはIGF-1との併用によりその増殖能を促進することが明らかとなった。その効果は in vitro 実験よりも in vivo 実験においてより顕著であった。IGF-1とSPとの相互作用については西田らが角膜上皮の伸長を促進すると報告^{8) 21)}しているが, 増殖能に対しては器官培養において³H-チミジンの取り込みに影響を与えなかったと報告²¹⁾しており, 今回の実

験と相反する結果となっている。しかし、今回の我々の実験においても培養角膜上皮細胞を用いた *in vitro* 実験においては、対照群あるいはSP、IGF-1 単独添加群と両者の併用群との間で *in vivo* 実験にみられるように顕著な³H-チミジン取り込み細胞数の増加を認めなかったことより、SPとIGF-1 あるいはEGFの角膜上皮細胞増殖能に対する促進作用は、角膜上皮細胞に対する直接的なものではなく、間に他の因子を介した間接的な作用であると推測される。そう考えると、上皮細胞のみの培養系において、顕著な増殖能の促進効果が発現されなかったことが理解しやすい。西田らは、SPとIGF-1 との相互作用により細胞外マトリックスであるフィブロネクチンを介して上皮の伸長を促進することを明らかにしている²²⁾が、同様に、細胞増殖に関しても何らかの他の因子を介した作用が示唆される。

今回の実験結果から、SPとEGFあるいはIGF-1 との併用が、角膜上皮創傷治癒を促進し、それは、角膜上皮細胞の伸展のみならず増殖の促進によるものであることが明らかとなった。今後、この相乗効果の機序についてのさらなる研究が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Nishida T, Nakamura M, Murakami J, Mishima H, Otori T: Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system. *Invest Ophthalmol* 33:2464-2469, 1992.
- 2) HS Dua, JAP Gomes, A Singh: Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 78:401-408, 1994.
- 3) Ilene KG, Guy V: Corneal epithelial wound healing. In: Nisida T: Coneal healing responses to injuries and refractive surgeries. Kugler, Hague, Nettherlands, 1-9, 1998.
- 4) Von Euler US, Gaddum JH: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72:74-87, 1931.
- 5) Pernow B: Substance P. *Pharmacol Rev* 35:85-141, 1983.
- 6) Nilsson J, von Euler A, Dalsgaard CJ: Stimulation of connective tissue growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63, 1985.
- 7) Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S: Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 90:399-401, 1988.
- 8) Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T: The NK1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor-1. *Br J Ophthalmol* 120:547-552, 1997.
- 9) Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M: Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1837-1845, 1991.
- 10) Donald G, Payan MD: Neuropeptide and inflammation The role of substance P. *Ann rev Med* 40:341-352, 1989.
- 11) Burnstock G: Autonomic neuro effector junctions, Reflex vasodilatation of the skin. *J Invest Dermatol* 69:45-57, 1977.
- 12) Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B: Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol* 71:233-235, 1978.
- 13) Miller A, Costa M, Furness JB, Chubb IW: Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neuroscience Letters* 23:243-249, 1981.
- 14) Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG: Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol* 15:4-14, 1976.
- 15) Steven EW, YU-Guang HE, Jian W, James D.Z, James V, Gregory S.S: Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Eye Res* 59:665-678, 1994.
- 16) Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C: Insulin-like growth factor 1 acts as angiogenic agent in rabbit cornea and retina: Comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 34:282-291, 1993.
- 17) Le of EB, Wharton W, Van Wyk JJ: Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin-C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res*

141:107-115, 1982.

- 18) 重藤 真理子, 佐川 卓司, 石橋 達朗, 中島 直樹, 梅田 文夫, 名和田 新 : Insulin-like growth factor-1 投与後に憎悪した糖尿病網膜症の1例. 臨眼 51:1251-1255, 1997.
- 19) 川上 淳子, 片上 千加子, 山本 節 : カプサイシン投与ラットにおける角膜上皮の変化. 日眼会誌 100:653-659, 1996.
- 20) Payan D, Brewster D, Goetzel E: Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. J Immunol 131:1613-1615, 1983.
- 21) Nishida T, Nakamura M, Ofji K, Ted WR, Mark JM, Christopher JM: Synergistic effects of substance P with Insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. J of Cellular Physiology 169:159-166, 1996.

The Effect of Substance P with EGF or IGF-1 on Corneal Epithelial cell Proliferation in Rabbits

Rumiko Hara*, Chikako Katakami**, Misao Yamamoto**

*Department of Ophthalmology, Sinnittetsu Hirohata Works Hospital

**Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

ABSTRACT

Neuroparalytic keratopathy, a corneal epithelial disorder caused by dysfunction of the trigeminal nerve, has been implicated to be associated with the decrease of the amount of substance P (SP) in the cornea. To elucidate the pathogenesis of neuroparalytic keratopathy, we examined the effect of SP on corneal epithelial cell proliferation comparing with that of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1). The epithelium of rabbit corneas was removed 6mm in diameter and treated with eye drops of SP, EGF, IGF-1, SP+EGF, SP+IGF-1, or physiological saline as the control. Corneas were excised 48 hours after the removal of the epithelium, labeled with ^3H -thymidine and subjected to autoradiography. In vitro study was also performed by culturing rabbit corneal epithelial cells in culture medium containing SP with or without EGF or IGF-1 and by labeling cells with ^3H -thymidine for the subsequent autoradiographical study. Both in vivo and in vitro studies demonstrated that EGF, SP+EGF and SP+IGF-1 but not SP alone stimulated corneal epithelial cell proliferation and that SP enhanced the effect of EGF and IGF-1. These results indicate that SP may potentiate the action of EGF and IGF-1 to stimulate corneal epithelial cell proliferation.

Key Words: Substance P, EGF, IGF-1, Corneal epithelial cell proliferation, Neuroparalytic Keratopathy