

각막상피제거술 후 흰쥐의 각막과 눈물샘에서의 신경성장인자의 변화

신혜영 · 양지욱 · 이영춘 · 김수영

가톨릭대학교 의과대학 안과 및 시과학교실

목적: 흰쥐에서 각막상피제거술 시행 전후 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 총 29마리의 흰쥐를 이용하여 대조군은 각막상피제거술을 시행하지 않았고, 실험군은 각막상피제거술을 시행하였다. 각막상피제거술 시행 전과 시행 후 1, 2, 3일째 각막과 시술 전과 시술 후 1일째 눈물샘에서 신경성장인자의 농도를 측정하였다. 시술 전과 시술 후 1, 7일째 각막과 시술 전과 시술 후 1일째 눈물샘에서 면역조직화학염색을 시행하여 시술 전후의 신경성장인자 발현 정도를 비교하였다.

결과: 각막상피제거술 후 1일과 2일째 각막의 신경성장인자의 농도는 시술 전보다 통계적으로 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 시술 후 1일째 눈물샘의 신경성장인자의 농도도 시술 전보다 유의하게 높았다($p = 0.001$). 각막과 눈물샘의 신경성장인자에 대한 면역화학염색에서 각막상피제거술 후 더 강한 염색 정도를 보여주었다.

결론: 흰쥐에서 각막상피제거술 후 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 각막상피 치유에 있어 신경성장인자가 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

〈대한안과학회지 2011;52(5):597-602〉

신경성장인자는 1950년 Rita Levi-Montalcini에 의해 발견된 이래 신경원세포에 의해 신경원의 발아를 유도하며 손상 받은 신경원의 기능을 회복시키는 중추신경원과 말초신경원의 생존에 중요한 인자로 알려졌으나, 최근에는 알레르기성 염증을 포함하여 신경계 이외의 광범위한 부분에서 성장인자로 기능하는 것으로 밝혀졌다.¹ 눈에서는 각막 상피, 결막, 눈물샘에서 신경성장인자를 생성하고, 다양한 수용체들이 각막 상피를 포함하여 여러 세포에 존재하는 것으로 알려져 있다.^{2,3} 신경성장인자와 신경성장인자수용체의 상호작용을 통해서 건강한 각막 감각과 상피를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.^{4,5} 최근, 신경성장인자가 여러 각막 질환의 치료로 도움이 될 수 있고, 신경성장인자의 점안이 각막지각도를 향상시킴으로써 신경영양성각막염에서 각막상피 치유를 촉진한다는 보고도 있었다.^{3,6}

기존 연구에서 쥐와 토끼, 개, 사람의 각막의 상피세포에서 신경성장인자와 그 수용체가 발현되고, 각막상피세포의 손상이 일어나면 신경성장인자의 발현이 증가한다는 보고들이 있었고, 신경성장인자가 각막상피세포의 이동과 증식에도 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀져 왔다.^{4,5,7} 또한, 사람과 흰쥐에서 각막상피뿐만 아니라 눈물샘에서도 신경성장인자의 수용체가 발현된다는 사실이 밝혀져 왔다.⁸⁻¹¹ 이와 같은 일련의 보고는 신경성장인자가 각막의 항상성을 유지하는 데 주요한 인자 중 하나로 작용하고 있음을 의미하는 것이다. 그러나 눈물샘과 각막 사이의 상호 작용에서 신경성장인자가 어떤 기전으로 작용하는지 아직 명확히 밝혀진 바는 없었다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐에서 우리는 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 발현양상을 살펴보고, 각막상피제거술을 시행한 흰쥐와 시행하지 않은 흰쥐의 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 농도를 비교하여, 각막상피상처에 따른 각막과 눈물샘에서의 신경성장인자의 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

■ 접수 일: 2010년 8월 13일 ■ 심사통과일: 2010년 11월 19일
■ 게재허가일: 2011년 3월 2일

■ 책임저자: 김수영

경기도 의정부시 금오동 65-1
가톨릭대학교 의정부성모병원 안과
Tel: 031-820-3110, Fax: 031-847-3418
E-mail: cassiopeia-su@hanmail.net

* 본 논문의 요지는 2008년 대한안과학회 제100회 학술대회에서 포스터로 발표되었음.

대상과 방법

연구대상

총 29마리의 흰쥐를 zoletil 50 (tiletamine+zolazepam, 50 mg/kg)과 rompun (sylazine hydrochloride, 15 mg/kg)을 복강 내 주입하여 마취시켰다. 대조군 5마리는 각막상피제거술을 시행하지 않았고, 실험군 24마리는 현미경하에서 microblade (Sharp point 78-6900; Surgical Specialties Corporation, Reading, PA, USA)을 이용하여 각막윤부를 제외한 약 13 mm² 크기의 각막상피제거술을 시행하였다. 대조군 5마리의 한쪽 각막과 눈물샘은 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 검사하기 위해 절제하였고, 다른 쪽 각막과 눈물샘은 신경성장인자의 면역조직화학염색을 위해 절제하였다.

각막과 눈물샘의 신경성장인자의 ELISA 분석

대조군으로 각막상피제거술을 시행하지 않은 5마리의 흰쥐와 각막상피제거술 후 24, 48, 72시간째 각각 5마리의 흰쥐에서 각막절제술을 시행하였다(n=5 animals/group).¹² 각막절제술은 중앙 직경 4.0 mm의 각막을 trephine하여 얻은 후 -80°C에 얼려서 보관하였다. 얼려서 보관했던 각막을 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 2% BSA, 1 M NaCl, 4 mM EDTA, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide과 protease inhibitors로 구성된 lysis buffer로 homogenized 시켜서 30분간 14,000 g에서 원심분리를 시행하였다. 상층액을 신경성장인자 assay에 이용하였다. 검체 내의 신경성장인자 수치는 Duoset ELISA Development system (R&D System Inc, Minneapolis, Minnesota, USA)을 이용하여 측정하였다. 두 군의 흰쥐에서 각막상피제거술 전과 각막상피제거술 후 24시간 경과했을 때 눈물샘 조직을 얻어서 신경성장인자의 농도를 동일한 방법을 이용하여 측정하였다(n=5 animals/group). ELISA 시행 전 각막과 눈물샘 내의 총 단백질 농도는 Bradford method에 의한 BCA protein assay kit를 이용하여 측정하였고, 정확한 분석을 위하여 검체 내 총 단백질 농도를 측정하여 총 단백질에 대한 신경성장인자의 농도(NGF/total protein [pg/μg])를 계산하였다.

각막과 눈물샘의 신경성장인자의 면역조직화학염색

각막상피제거술 전과 각막상피제거술 후 1일과 일주일째

각각 대조군 3마리, 실험군 3마리의 각막과, 각막상피제거술 전과 각막상피제거술 후 24시간 경과했을 때 각각 대조군 3마리, 실험군 3마리의 흰쥐의 눈물샘을 이용하였다. 각막상피제거술 후 1일째 흰쥐의 각막을 OCT compound에 포매한 후 냉각시켜 얼린 다음 냉동절편기를 이용하여 5 μm 두께로 조직절편을 제작하고 아세톤으로 고정하였다. 조직절편을 실온에서 10분간 TBST 완충액으로 수세하고, 내재성 peroxidase 활성을 제거시키기 위해 과산화수소로 전처리 하였다. 이후 blocking solution (goat serum, Histone plus broad spectrum, Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 10분간 반응시켰다.

면역조직화학 염색은 anti-mouse NGF polyclonal antibody를 1:700으로 희석시켜 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 조직절편을 TBST 완충액으로 수세하고, biotinylated secondary antibody로 10분간 반응시켰다. 다시 TBST 완충액으로 수세한 후 streptavidin HRP (horseradish peroxidase) complex와 10분간 반응시키고, 면역 복합체를 확인하기 위해 3,3'-diaminobenzidine를 사용하였다. 조직절편은 광학현미경(Olympus, BX32E01, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였고, 디지털 카메라(Prores-C121, Jenoptik, Jena, Germany)를 이용하여 조직 사진을 얻었다.

통계적 분석

통계적 분석은 SPSS 10.0 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였으며 ANOVA repeated measure와 Mann-Whitney U-test를 시행하여 각막상피제거술 전과 후의 신경성장인자의 발현양상의 변화를 분석하였다. p -value<0.05이면 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

각막과 눈물샘에서의 신경성장인자 농도

각막과 눈물샘에서 ELISA를 이용하여 각각의 분포와 각막상피제거술 시술 전과 후를 비교하였다. 각막상피제거술 후 1일째와 2일째 각막에서의 총 단백질에 대한 신경성장인자의 농도는 시술 전보다 통계적으로 유의하게 높았다(p <0.05, Fig. 1). 시술 후 3일째 각막에서는 시술 전보다 높은 농도를 보이긴 하였지만 그 차이가 통계적으로 유의하지는 않았다(p >0.05). 각막상피제거술 후 1일째 눈물샘에서의 총 단백질에 대한 신경성장인자의 농도가 시술 전보다 유의하게 높았다(p =0.001, Fig. 2).

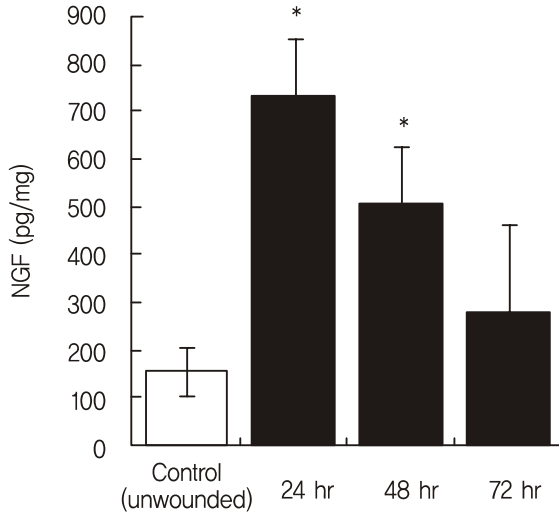


Figure 1. The nerve growth factor/total protein (NGF/tP, pg/mg) concentrations of rat corneal tissue after epithelial debridement. NGF protein levels were quantified in the cornea over time after complete epithelium debridement. Five animals were evaluated per time point. NGF levels of the corneal tissue significantly increased in the wounded group until 2 days after wounding. * $p < 0.05$, $n = 5$ per group, ANOVA repeated measure.

각막과 눈물샘에서의 신경성장인자의 면역조직화학염색

각막과 눈물샘에서 면역조직화학 방법으로 각각의 분포와 각막상피제거술 시술 전과 후를 비교하였다. 각막의 신경성장인자에 대한 면역화학염색에서 각막상피제거술 전에는 기저세포에서 약한 염색 정도를 보이는 반면(Fig. 3A), 각막상피제거술 후 24시간경에는 각막의 전반적으로 강한 염색 정도를 보여주었다(Fig. 3B). 그리고 7일이 경과한 후에는 각막 전층에서 미약하지만 전반적으로 염색이 되면서 표층보다는 기저세포층에서 뚜렷한 염색을 보였다(Fig. 3C).

눈물샘의 신경성장인자에 대한 면역화학염색에서 각막상피제거술 시술 전에도 미약한 염색 정도를 보였으나(Fig. 4A), 시술 후 1일째 눈물샘에서 시술 전 눈물샘에서보다 샘파리세포의 세포질과 샘공간(lumen)에서 더 강한 염색 정도를 보였다(Fig. 4B).

고 찰

안구 표면과 눈물샘은 기능적으로, 유기적으로 연결되어 각막의 항상성을 유지한다. 눈물을 구성하는 각각의 성분을 분비함으로써 여러 가지 안구표면의 자극으로부터 눈을 보호하게 된다. 최근 건성안의 이해와 치료에 있어 안구표면, 안검 그리고 눈물샘을 신경되돌림 회로(neural feedback

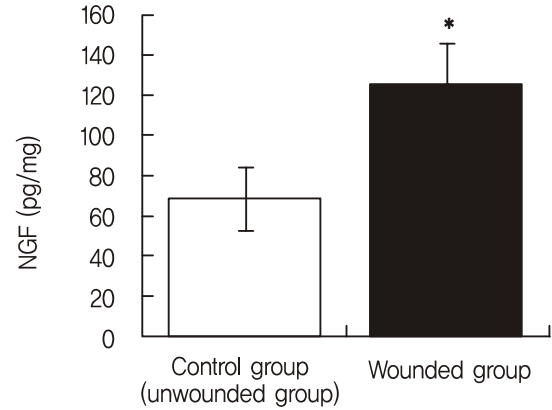


Figure 2. The nerve growth factor/total protein (NGF/tP, pg/mg) concentrations of the rat lacrimal gland tissue. At 24 hours after epithelial debridement, the rat lacrimal gland NGF concentrations increased when compared with the control group. * $p = 0.001$, $n = 5$ per group, ANOVA repeated measure.

loop)와 연결되는 하나의 통합된 형태기능학적 단위로 이해하고 있으며,¹³⁻¹⁵ 각결막, 땀샘, 마이봄샘 등의 안구 표면과 눈물샘 등이 서로 하나의 기능적 단일체(lacrimal functional unit)를 형성하면서 서로 상호 연결된 신경분포를 한다고 알려져 있다.¹³

각막신경의 손상은 각막지각도를 감소시키고, 각막의 신경이 손상되어 각막의 지각감퇴가 발생할 경우 상피 세포의 투과성이 증가되면서 대사가 감소될 수 있고, 각막상피의 생존력의 감소, 각막 상피의 미란 및 상피의 창상치유능력이 감소하게 되고, 신경영양성각막궤양을 유발할 수 있다.^{16,17} 현재 많이 시행되고 있는 레이저각막절삭가공성형술(Laser in situ keratomileusis, LASIK)과 같은 굴절이상 교정수술에서도 각막신경이 손상되는데, 수술 후 각막 신경의 빠른 회복이 정상적인 각막의 생리기능의 회복 및 눈물 분비와 각막 치유에 중요하다는 사실이 밝혀지고 있다. 가토에서 라식 후 신경성장인자의 점안으로 각막 신경 재생에 효과적으로 작용하여 각막지각도 회복을 가속화시켰다는 보고가 있었다.¹⁸ 또한 저자들은 흰쥐에서 신경성장인자의 유도물질로 알려진 nicergoline의 경구 투여가 각막 상피세포 치유의 속도를 증가시켰으며, 이 효과는 각막과 눈물샘의 신경성장인자의 증가와 관련이 있다는 보고를 하였다.¹²

본 연구에서는 흰쥐의 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 발현양상을 밝혀냈고, 각막상피상처가 각막과 눈물샘의 신경성장인자의 발현을 증가시키는 것을 신경성장인자의 단백질량이 증가하고, 면역화학염색에서 발현 정도가 증가하는 것을 통해서 확인할 수 있었다. 흰쥐의 각막과 눈물샘에서 신경성장인자와 그 수용체가 발현된다는 사실을 보고된 바가 있었으나,^{9,10} 본 연구에서는 쥐에서 각막상피치유



Figure 3. Immunohistologic detection of NGF in rat corneal tissue of the unwounded, control group (A) and wounded group at 1 day (B) and 7 days (C) after epithelial debridement. NGF staining is stronger in the cornea at 24 hours after epithelial debridement than in unwounded cornea (Streptavidin-biotin, magnification $\times 200$).

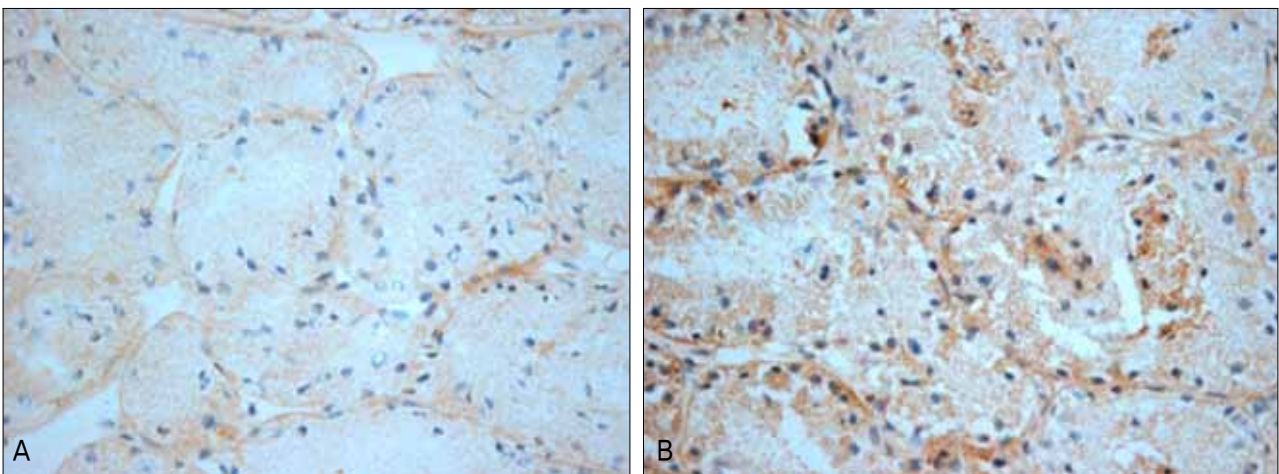


Figure 4. Immunohistologic detection of NGF in rat lacrimal tissue of the unwounded, control group (A) and wounded group at 24 hours (B) after epithelial debridement. At 24 hours after epithelial debridement, the lacrimal NGF expression increased in the acinar cell and lumen when compared with that of control group (Streptavidin-biotin, magnification $\times 40$).

과정에서 각막의 상피세포와 눈물샘의 샘파리세포에서 면역화학염색을 통해서 신경성장인자의 발현이 증가되는 양상을 확인하였다. 신경성장인자 수용체 중 하나인 TrkA는 각막 상피의 줄기세포가 분포하여 각막 상피세포가 활발히 분열하는 정상 각막과 윤부 상피의 기저층에 주로 발현된다는 보고가 있었다.^{11,19} 본 연구에서 각막에서 표층보다는 기저상피세포층에서 뚜렷한 면역 반응이 있었던 것은 이를 지지하는 결과로 생각된다. 각막 상피 치유과정에는 손상된 각막 상피의 재생을 위해 많은 양의 cytokine이 나오는데, 신경성장인자의 농도도 높아져 각막 신경의 재생도 따라 일어나게 되는 것으로 생각된다. 이러한 일련의 보고는 신경성장인자가 각막 상피 세포의 분열과 각막 신경의 재생에 동시에 관여함을 의미한다.

개의 각막상피치유과정에서도 각막과 눈물샘에서 신경성장인자의 발현이 증가하여 각막 상피 세포의 재생에서 중요한 역할을 한다고 밝혀졌는데, 개의 눈물샘에서 각막상피제거술 이후에 2일째에는 신경성장인자 발현이 증가하지

않다가 1주일째 그 발현이 증가했다는 보고가 있었다.⁷ 그러나, 본 연구에서는 각막상피제거술 이후 1일째 통계적으로 의미있게 신경성장인자의 농도가 증가한 것을 확인할 수 있었는데 이는 종 특이적 발현의 차이로 생각해 볼 수 있을 것이다.

각막에 상처가 발생했을 때 눈물샘에서 신경성장인자의 발현이 증가된다는 사실은 안구 표면과 눈물샘이 유기적으로 연결되어 있으며 상호 작용을 하고 있음을 의미한다. 각막과 눈물샘에서 발현된 신경성장인자가 눈물샘의 활성도를 자가분비 혹은 이웃분비 방식으로 조절하여 눈물샘의 외분비 기능의 변화를 일으키고 눈물의 신경성장인자가 증가하게 되고, 이를 통해 각막의 상처 치유에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구 결과는 각막과 눈물샘에서의 신경성장인자의 발현 양상의 변화를 밝힘으로써 각막의 항상성 유지에 있어서 신경성장인자의 자가 분비 및 이웃 분비 방식으로 기능할 가능성을 제시하였다. 신경성장인자는 각막

상피치유과정에서 치유 속도를 높이고, 각막 항상성을 유지할 수 있는 인자로서 앞으로 여러 각막 질환의 치료제로서의 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. 향후 각막과 눈물샘에서 여러 신경성장인자 수용체의 각각의 분포를 확인하고, 발현양상을 파악하여 각막과 눈물샘의 기능적 연결에 대한 정확한 기전을 밝히기 위한 연구가 있어야 할 것이다.

참고문헌

- 1) Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-62.
- 2) Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 1992;32:461-70.
- 3) Lambiase A, Rama P, Bonini S, et al. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1998;338:1174-80.
- 4) You L, Kruse FE, Völcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:692-702.
- 5) Lambiase A, Bonini S, Aloe L, et al. Anti-inflammatory and healing properties of nerve growth factor in immune corneal ulcers with stromal melting. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1446-9.
- 6) Tan MH, Bryars J, Moore J. Use of nerve growth factor to treat congenital neurotrophic corneal ulceration. *Cornea* 2006;25:352-5.
- 7) Woo HM, Bentley E, Campbell SF, et al. Nerve growth factor and corneal wound healing in dogs. *Exp Eye Res* 2005;80:633-42.
- 8) Nguyen DH, Beuerman RW, Thompson HW, DiLoreto DA. Growth factor and neurotrophic factor mRNA in human lacrimal gland. *Cornea* 1997;16:192-9.
- 9) Lambiase A, Manni L, Bonini S, et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1063-9.
- 10) Ghinelli E, Johansson J, Ríos JD, et al. Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3352-7.
- 11) Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:987-94.
- 12) Kim SY, Choi JS, Joo CK. Effects of nicergoline on corneal epithelial wound healing in rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:621-5.
- 13) Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584-9.
- 14) Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137:337-42.
- 15) Dana MR, Hamrah P. Role of immunity and inflammation in corneal and ocular surface disease associated with dry eye. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:729-38.
- 16) Lyne A. Corneal sensitivity after surgery. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1982;102:302-5.
- 17) Moilanen JA, Vesaluoma MH, Müller LJ, Tervo TM. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1064-9.
- 18) Joo MJ, Yuhon KR, Hyon JY, et al. The effect of nerve growth factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 2004;122:1338-41.
- 19) Qi H, Li DQ, Shine HD, et al. Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells. *Exp Eye Res* 2008;86:34-40.

=ABSTRACT=

Expression of Nerve Growth Factor during Corneal Epithelial Wound Healing in Rats

Hye Young Shin, MD, Ji Wook Yang, MD, Young Chun Lee, MD, PhD, Su Young Kim, MD, PhD

Department of Ophthalmology and Visual Science, The Catholic University of Korea School of Medicine, Uijeongbu, Korea

Purpose: To evaluate the expression of nerve growth factor (NGF) in the rat cornea and lacrimal gland before and after corneal epithelial wounding.

Methods: Twenty-nine Sprague-Dawley male rats were used in the present study. Corneal trephination was performed using a 4.0-mm diameter trephine before scratch and at 24, 48, 72 hours after debridement. The lacrimal gland was excised before scratch and at 24 hours after epithelial debridement. NGF levels of the excised cornea and lacrimal gland were measured in rat corneas by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemistry staining was performed on rat corneas and lacrimal glands.

Results: The NGF/total protein ratio (NGF/tP) increased after wounding in the cornea and lacrimal gland. NGF levels in the cornea significantly increased in the wounded group until the 2nd day after wounding ($p < 0.05$). After NGF concentration peaked on the 1st day, there was a progressive decline after wounding. Additionally, the NGF concentration in the lacrimal gland of the wounded group was significantly higher than that of the control group at 24 hours after epithelial debridement ($p = 0.001$). Immunohistochemistry staining showed that NGF staining was stronger in rat corneas and lacrimal glands after epithelial debridement than before.

Conclusions: Expression of NGF increased in rat corneas and lacrimal glands after corneal epithelial wounding, which suggests that NGF may play an important role in corneal wound healing.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(5):597-602

Key Words: Cornea, Lacrimal gland, Nerve growth factor, Rat

Address reprint requests to **Su Young Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea

#65-1 Geumo-dong, Uijeongbu 480-717, Korea

Tel: 82-31-820-3110, Fax: 82-31-847-3418, E-mail: cassiopeia-su@hanmail.net