

사이클로스포린 0.05%가 인체 각막상피세포에 미치는 영향

이지은¹ · 신옥범² · 이종수¹

부산대학교 의과대학 안과학교실¹, 신안과의원²

목적 : 인체 각막상피세포를 대상으로 사이클로스포린 0.05%가 미치는 영향을 비교하고자 하였다.

대상과 방법 : 인체 각막상피세포를 배양하여 사이클로스포린 농도를 0.05%로 하여 3, 5, 10분간 접촉시킨 후, MTT 분석법으로 세포 생존율 및 젯산탈수소효소 분석법으로 세포사를 측정하였다. 세포자멸사 유무 및 정도를 확인하기 위해 형광현미경을 이용하고 유세포분석을 시행하였으며, 세포의 형태학적 변화는 위상차 및 전자현미경을 사용하였다.

결과 : 노출시간이 길수록 상피세포의 증식억제력은 증가되고, 세포사는 증가하는 소견을 보였으며, 10분 노출시 유의한 변화를 보였으나, 중간치사량에는 도달하지 못하였다. 유세포분석에서는 뚜렷한 세포자멸사 현상을 보였으며, 형광현미경에서도 양성 형광반응을 보였다. 형태학적 소견에서도 세포가 배지에서 분리되거나 밀도 감소를 보였고, 전자현미경에서는 세포질내 사립체나 과립세포질망의 확대, 소공형성과 함께 핵막주변부로 핵질농축도 관찰되었다.

결론 : 면역조절제인 사이클로스포린의 경우 10분 이상의 긴 접촉시간을 피한다면 0.05% 점안 농도에서는 각막상피세포의 독성효과를 일으키지 않고 안전하게 사용할 수 있으며 세포의 증식억제력은 세포자멸사 현상과 연관이 있을 것으로 생각된다.

〈한안지 48(10):1399-1409, 2007〉

사이클로스포린 CsA (cyclosporin A)은 장기 이식후 고위험 환자에서 거부반응 및 치료를 위해서 사용되어져 온 강력한 면역억제제이다.¹⁻⁴ 이런 사이클로스포린은 전신으로 투여할 경우 명백한 치료효과를 나타내지만, 신독성이나 간독성과 같은 심각한 합병증이 생길 수 있고, 치료농도를 유지하기 위해서는 안 조직의 투과성을 고려해야 하기 때문에 안과에서의 사용 영역은 매우 제한적이었다.^{5,6} 그러나 점차 안과영역에서 면역억제제에 의한 치료영역의 확대로 후포도막염과 같은 안 염증질환 뿐 아니라 안건조증이나 알레르기 질환과 같은 안표면 염증질환에서도 스테로이드 약제와 함께 항염증 약제로써 사용되기 시작하였다.⁷⁻¹²

안표면 질환에서는 낮은 농도의 사이클로스포린을 점안하는 것이 효과적이고 안전하기에 안건조증을 포함한 건성각결막염의 치료에 사이클로스포린 0.05% 점안제의 사용이 점차 늘고 있다.^{10,11} 그러나, 면역억제제

인 사이클로스포린 점안액의 임상적 사용범위가 확대되어져 가고 있으나 아직까지 안표면의 존재하는 세포 특히 각막상피세포에 미치는 영향에 관하여 알려진 연구는 매우 드물다.

이에 저자는 배양된 인체 각막상피세포를 대상으로 현재 임상적으로 널리 쓰이고 있는 0.05% 농도의 사이클로스포린에 의한 세포 독성 및 증식력을 알아보고 각막상피세포에서 분비되는 세포외기질 형성에 미치는 영향 및 세포자멸사 현상을 통해 약제의 작용기전을 확인하며 세포에 미치는 형태학적인 변화를 관찰하고자 하였다.

대상과 방법

1. 세포배양과 처치

각막이식에 필요한 공여각막을 사용하고 남은 주변부의 각막조직을 이용하여 각막상피와 각막실질을 Ca^{2+} , Mg^{2+} 가 함유되지 않은 1 unit/ml Dispase II (Boehringer Mannheim, Germany)에 담구어 37°C 배양기에 1시간 처리하여 각막상피세포를 분리한 다음 5분간 1000 분당회전수(revolutions per minute, rpm)에서 원심분리하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning, NY, USA)로 옮겨 95% air-5% CO_2 가

〈접수일 : 2007년 1월 4일, 심사통과일 : 2007년 6월 13일〉

통신저자 : 이 종 수

부산시 서구 아미동 1-10

부산대학교병원 안과

Tel: 051-240-7323, Fax: 051-242-7341

E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

공급되는 37℃ 배양기에서 일차배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Rockville, NY, USA), 20 ng/ml epidermal growth factor (Gibco BRL, Rockville, NY, USA), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 및 100 ug/ml streptomycin (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)을 첨가한 세포배양액을 2~3일 간격으로 교체하여 세포가 합류(confluent growth)되었을 때 배양배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)로 1회 세척하고 0.25% trypsin-0.002% EDTA를 처리하여 세포를 분리하였다. 세포가 배양접시에서 완전히 이탈되면, 새로운 조직배양접시에 분리된 세포가 포함된 배양액을 약 1 cc 넣고 신선한 배양액을 약 2 cc 첨가시켜 세포를 재배양시켰다. Coulter counter로 세포수를 측정하여 배양액에 각막상피세포 5×10^3 cell/ml이 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 μ L씩 심은 후 37℃, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 이때 세포수가 너무 뺄뺄할 경우 각 약물에 의한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 각막상피세포가 80~90% 정도 성장할 때까지 4~5일 정도 배양시켰다.

2. MTT 분석법을 사용한 세포 증식력 측정

사이클로스포린(CsA, Sigma, St. Louis, USA)을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 0.05% (5 ug/ml)로 하고, 3분, 5분, 10분간 각막상피세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 DPBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물 처리후 18~24시간 정도 배양한 다음 세포의 대사능력을 측정하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로 0.05% 농도의 사이클로스포린을 만드는데 필요한 농도의 알코올 농도를 혼합한 DMEM을 사용하여 상기의 동일한 방법으로 세포를 배양시켜 세포의 증식억제력을 비교하였다.

세포의 대사능력을 측정하기 위해 calorimetric assay를 이용하여 세포내에 존재하는 formazan 화합물의 흡광도를 측정하여 세포 증식억제력을 비교하였다. 세포의 대사능력을 측정하기 위해 MTT solution (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, USA)를 이용한 분석법을 사용하였는데,¹² 노란색의 tetrazolium salt가 세포내의 미토콘드리아에서 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바

뀌는 원리를 이용하여 세포내 형성된 formazan 화합물의 정도를 흡광도를 사용하여 생존하는 세포율을 측정하는 방법이다.

흡광도 측정을 위해 5 mg의 MTT 용액을 PBS 1 ml에 희석하여 0.2 μ L syringe filter로 걸린 후 DMEM 배지에 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배지를 140 μ L 정도 제거한 후 MTT 용액을 100 μ L 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37℃에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층을 110 μ L 제거한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide: Sigma, St. Louis, USA)를 100 μ L 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이러한 과정들을 3회 반복하여 각 농도와 노출 시간 별로 측정된 흡광도의 평균을 구하여 각 세포의 생존율을 구하였는데, 세포 생존율은 각 칸의 흡광도 수치를 대조군칸의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 세포의 생존율(%)=각 칸의 흡광도/대조군칸의 흡광도 \times 100으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩을 시도하여 각 군과의 통계학적 유의성(Student's t test, P<0.05)을 비교 관찰하였다.

3. 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 세포사 측정

사이클로스포린을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 0.05%로 하고, 3분, 5분, 10분간 각막상피세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물 처리후 24시간 정도 배양한 다음 세포사를 측정하였다. 세포질에서 유리된 LDH 양을 37℃온도의 암순응 상태에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였고, 대조군으로 0.05% 농도의 사이클로스포린을 만드는데 필요한 농도의 알코올 농도를 혼합한 평형염액(Balanced salt solution)을 처리하여 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다.

4. 세포외기질인 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP) 및 Laminin의 측정

24 well plate에 well당 1×10^4 cells/ml을 심은 후 충분히 자랄 때까지 4일정도 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS를 이용하여 세척하였다. 0.05%의 사이클로스포린을 3분, 5분, 10분간 접촉시킨 후 상층액을 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 신선한 DMEM 배지를 첨가하여 24시간 배양한 뒤 배지를 채취하여

-80℃에 보관하였다. 세포층은 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.2)가 함유된 PBS 0.5 ml로 추출하여 세포추출물을 -80℃에 보관하였다. 각 배양배지와 세포추출물의 PIP, Laminin의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 시행하였다.

5. 유세포 분석기를 이용한 세포자멸사 비교

세포자멸사 정도를 확인하기 위해 배양액에 각막상피세포가 5×10^5 cell/ml이 되도록 부유 시킨 후 세포를 증식시킨 후 약제의 농도를 0.05%로 3분, 5분, 10분간 접촉시킨 후 반응을 관찰하였다. 트립신을 이용하여 세포를 분리시킨 후 4℃에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리시켜 세포를 대상으로 binding buffer 200 μ L 넣고 씻은 후 다시 5분간 4℃에서 12,000 rpm으로 원심분리시킨다. 이런 과정을 한번 더 시행한 후 세포자멸사에 빠진 세포를 정량화하기 위하여 propidium iodide (PI) 5 μ L와 FITC-labeled annexin V 10 μ L를 각각 첨가시킨다. 15분간 암실에서 방치한 후 완충액으로 씻고 이 중 색상 유세포분석(two-color flow cytometry)을 시행하였다. 이 때 조기의 apoptosis에 빠진 세포들은 annexin V에만 반응을 나타내고, 세포괴사 상태의 세포는 annexin V와 PI에 모두 양성을 나타내며, 이들 각각의 세포분율을 구하고, 통계학적 처리는 대조군과 비교하여 95% 신뢰도(Student's t test, $P < 0.05$)로 비교하였다. 유세포 분석은 Cytomics FC 500[®]X (Beckman Coulter, USA)를 이용하였다.

6. 형광현미경을 이용한 세포자멸사 확인

세포자멸사를 확인하기 위해 Lab-Tek[®] Chamber SlideTM system (No 177380, Sigma, USA)을 이용하여 각막상피세포에 0.05% 농도의 사이클로스포린 약제를 노출시킨 후 3분, 5분, 10분 뒤에 관찰하였다. binding buffer로 씻은 후 200 μ L 용량의 binding buffer에 propidium iodide (PI) 5 μ L와 FITC-labeled annexin V 10 μ L의 농도를 첨가하여 슬라이드에 떨어 트려 접촉시킨다. 슬라이드가 마르지 않게 암소에 15분간 반응 시킨 후 binding buffer로 재차 씻고 2% 포름알데히드로 5분간 고정시키고, 덮개용 유리를 사용하여 덮은 후 형광현미경으로 200배의 배율로 관찰하였다.

7. 세포의 형태학적 관찰

세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 배양액에 각막상피세포가 5×10^4 cell/ml이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μ L씩 seeding한 후 37℃, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 4~5일 정도 배양하였다. 배지에서 성장한 세포를 0.05%의 농도로 3분, 5분, 10분 동안 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척하고 위상차 현미경(Inverted phase-contrast light microscope)으로 세포의 형태를 관찰하였다.

각막상피세포의 미세구조학적 변화를 관찰하기 위하여, 위와 동일한 방법으로 처리한 후 배지를 제거하고 각 군의 각막상피세포들은 0.1 M sodium cacodylate buffer로 씻어내고, 약 2시간 동안 Karnosky fixative (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1M sodium cacodylate buffer)에 고정시켰다. 0.1 M sodium cacodylate buffer로 3차례에 걸쳐 세척한 후 세포를 osmium tetroxide에 고정시키고 계열 에탄올용액으로 탈수한 후 Epon으로 포매하였다. 60~80 nm의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색시켜 투과전자현미경(JEOL, 1200 EX, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

결 과

1. 세포 증식력 및 세포사 측정

사이클로스포린의 세포증식 억제력을 측정하기 위해 대조군으로 DMEM 배지를 이용하여 각막상피세포의 세포대사능력을 측정한 결과, 0.05%에서 접촉시간이 길어질수록 각막상피세포의 대사력은 억제되는 경향을 보였으며, 10분 노출시 대조군보다 유의한 세포증식 억제를 나타내었으나($p=0.04$), 노출시간 모두에서 중간 치사량(LD₅₀, lethal dose)에는 도달하지 못하였다(Fig. 1).

LDH 활성은 시간의존적인 변화를 보여 주었는데 노출시간 10분까지 증가하는 경향을 보였으며, 노출시간 3분과 5분에서는 대조군과 유의한 차이는 보이지 않았다($p>0.05$). 노출시간 10분시에는 대조군의 경우 수치 100보다 훨씬 높은 200이상의 수치를 보여 유의한 차이를 보였다($p=0.03$)(Fig. 2).

2. 세포외 기질 PIP와 Laminin의 측정

PIP 생성량은 대조군의 경우 200 ng/ml 이상을 나타내었으나, 3분 노출시는 200 ng/ml, 5분 노출시는 170 ng/ml, 10분 노출시는 160 ng/ml의 생성량을

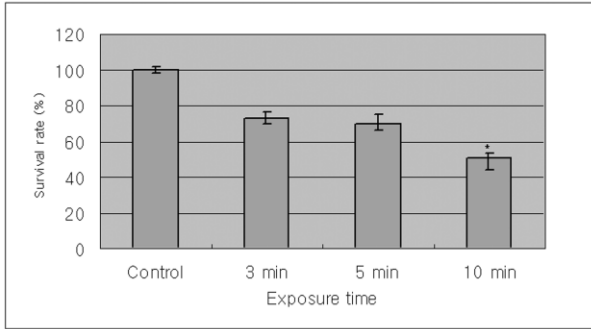


Figure 1. Metabolic activities of cultured human corneal epithelial cells measured with MTT assays showed the time dependant response by the exposure time of cyclosporine. There is significant decrease in the proliferation of corneal epithelial cells comparing with control when exposed to cyclosporine A 0.05% for 10 minutes ($p=0.04$).

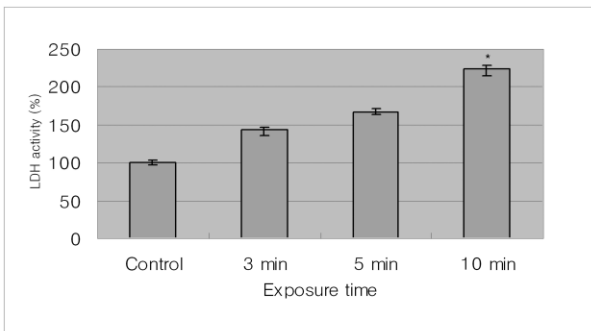


Figure 2. With time, the LDH activity of cultured human corneal epithelial cells in cyclosporine A 0.05% showed time dependant response for cytotoxicity. There is significant increase in the cytotoxicity of corneal epithelial cells comparing with control when exposed to cyclosporine A 0.05% for 10 minutes ($p=0.03$).

보이면서 점차 감소하는 경향을 보였지만 의미있는 차이는 없었다($p=1.02$)(Fig. 3A). Laminin의 생성은 대조군의 경우 76 ng/ml로 측정되었고, 약제에 3분간 노출시는 70 ng/ml, 그리고 5분 이상 노출시는 60 ng/ml으로 의미있게 생성량이 억제되지는 않았다($p=1.31$)(Fig. 3B).

3. 유세포 분석기에 의한 세포자멸사 분석

세포자멸사 현상에서 대조군에서는 주로 PI 및 Annexin V 염색에 음성반응을 보인 반면(Fig. 4A), 사이클로스포린 0.05% 처리 시에는 노출시간이 3분인 초기부터 Annexin V 염색에 양성반응, PI 염색의 반응에 음성반응을 보여 세포자멸사 현상을 뚜렷하게 관

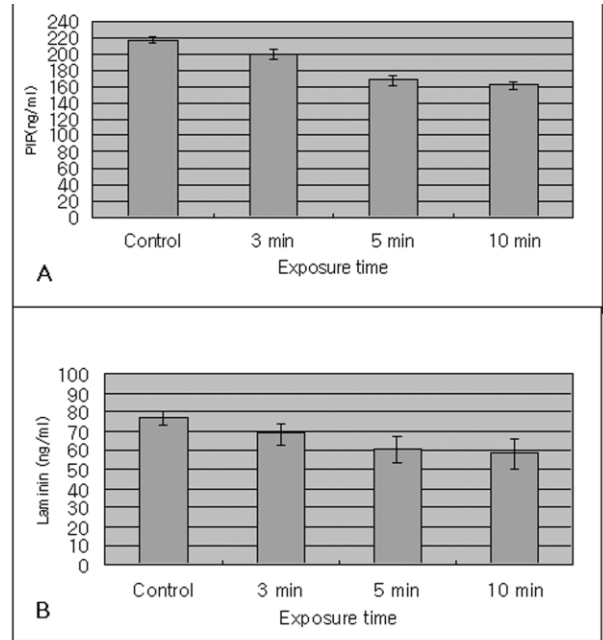


Figure 3. In the immunoassay with extracellular matrix, the synthesis of type I collagen synthesis (PIP) (A) and the production of laminin (B) by cyclosporine A 0.05% showed a time dependent response in human corneal epithelium.

찰할 수 있었다. 약제에 3분 노출 시에는 32.71%, 5분 노출 시에는 33.81%, 10분 노출 시에는 38.92%의 세포자멸사 현상을 보여 대조군에 비해 유의하게 증가된 소견을 보였다($P=0.01$). 0.05% 사이클로스포린의 노출 시간이 3분, 5분, 10분 동안 약제에 의한 각막상피세포의 세포괴사 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 4B, C, D).

4. 형광현미경에 의한 세포자멸사의 관찰

대조군에서 보이는 방추형의 무형광인 각막상피세포에 비해, 0.05% 농도의 사이클로스포린에 노출된 각막상피세포가 시간이 증가할수록 원형질막 및 핵막의 손상으로 세포질내로 유출된 DNA 입자와 결합하여 형광을 발하는 세포자멸사의 현상이 증명되었다(Fig. 5).

5. 세포의 형태학적 관찰

위상차 현미경에 의한 세포의 형태를 살펴보면, 대조군의 경우 각막상피세포가 배지에 뾰뾰하게 분포하고 있는 반면(Fig. 6A), 사이클로스포린에 노출된 시간이 증가할수록 세포가 배지에서 이탈되면서 점차 세포의 밀도가 감소하는 소견을 보였다(Fig. 6B, C, D).

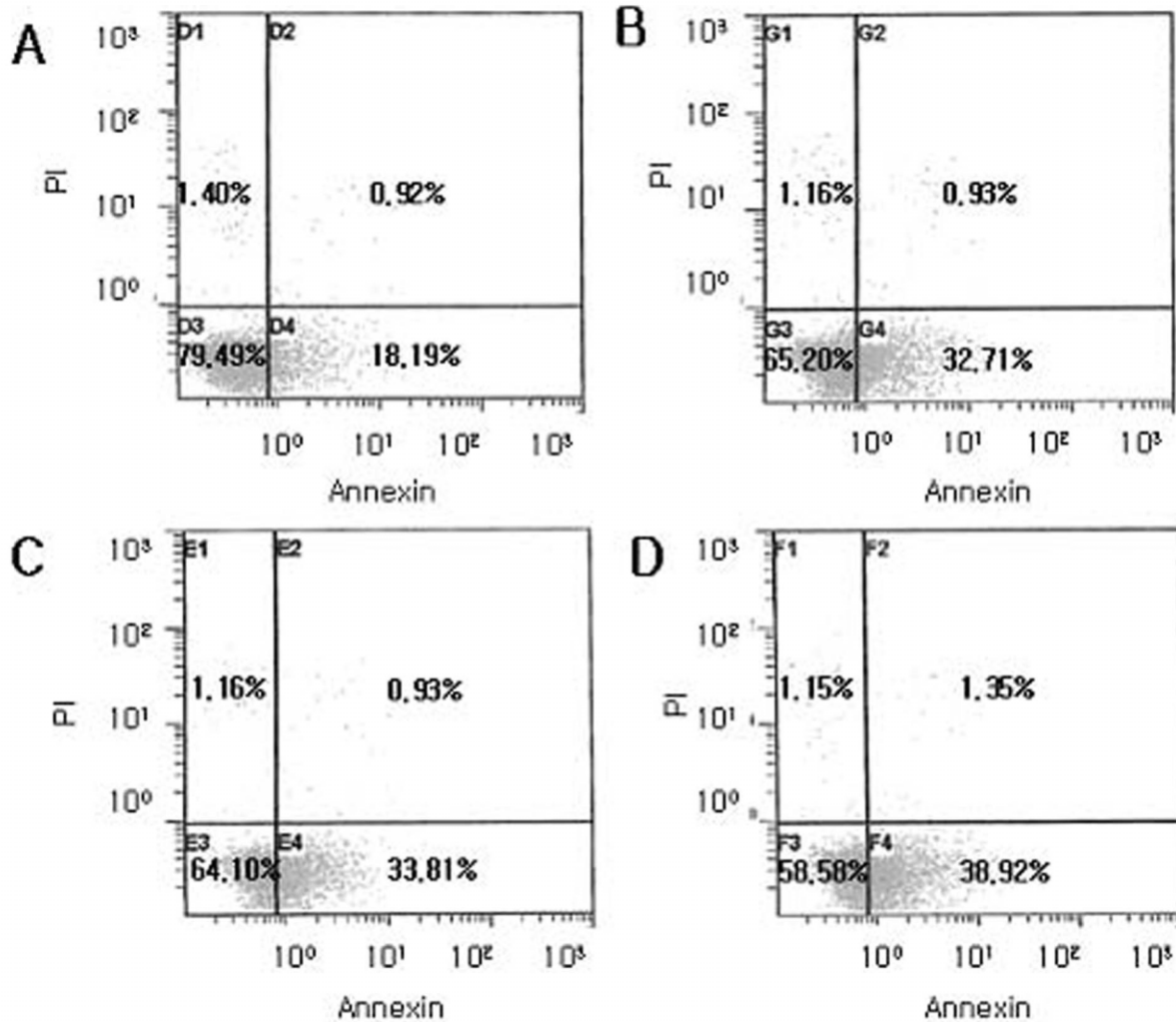


Figure 4. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V FITC after exposure to cyclosporine. Human corneal epithelial cells were normal as control (A) or were treated with cyclosporine A 0.05% for 3 minutes (B), 5 minutes (C), and 10 minutes (D). Most normal epithelial cells were primarily Annexin V and PI negative (A). After treatment with cyclosporine A 0.05%, a significant number of cells are positive Annexin V and negative PI (B, C and D) indicating that the cells were in the stage of apoptosis.

정상적인 각막상피세포의 전자현미경 소견은 손상이 없는 원형질막에 미세융모가 있으면서 균일한 세포질과 핵질의 분포가 있고, 세포질내 사립체(mitochondria)나 과립세포질망(rough endoplasmic reticulum, RER)의 미세한 확대 소견을 보인다(Fig. 7A). 그러나, 사이클로스포린 0.05%에 노출된 경우는 원형질막의 미세융모가 감소하면서 세포질내 소공 형성 및 사립체나 과립세포질망의 확대가 관찰되었다(Fig. 7B, C). 약제에 의한 10분간의 노출에서는 핵막주변부의 핵질농축도 관찰되어 세포자멸사의 초기 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 7D)

고 찰

안건조증 환자에서 안표면 및 눈물샘의 만성 염증이 관찰되는데, 면역조직화학 연구에서 이러한 조직내 CD4 보조 T 세포가 축적되어 있는 것이 발견되어,^{13,14} 안건조증과 면역계와의 연관성이 밝혀졌다. 안과영역에서 사이클로스포린의 주작용은 안표면 조직에서 면역매개 염증반응의 주된 사이토킨인 인터루킨-2의 생성을 억제시켜 보조 T 세포의 비활성화를 초래시켜 눈물샘의 림프구 침착을 줄여 눈물 생성을 호전시킨다고 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷

현재는 안건조증을 비롯한 알레르기성 결막염, 안검

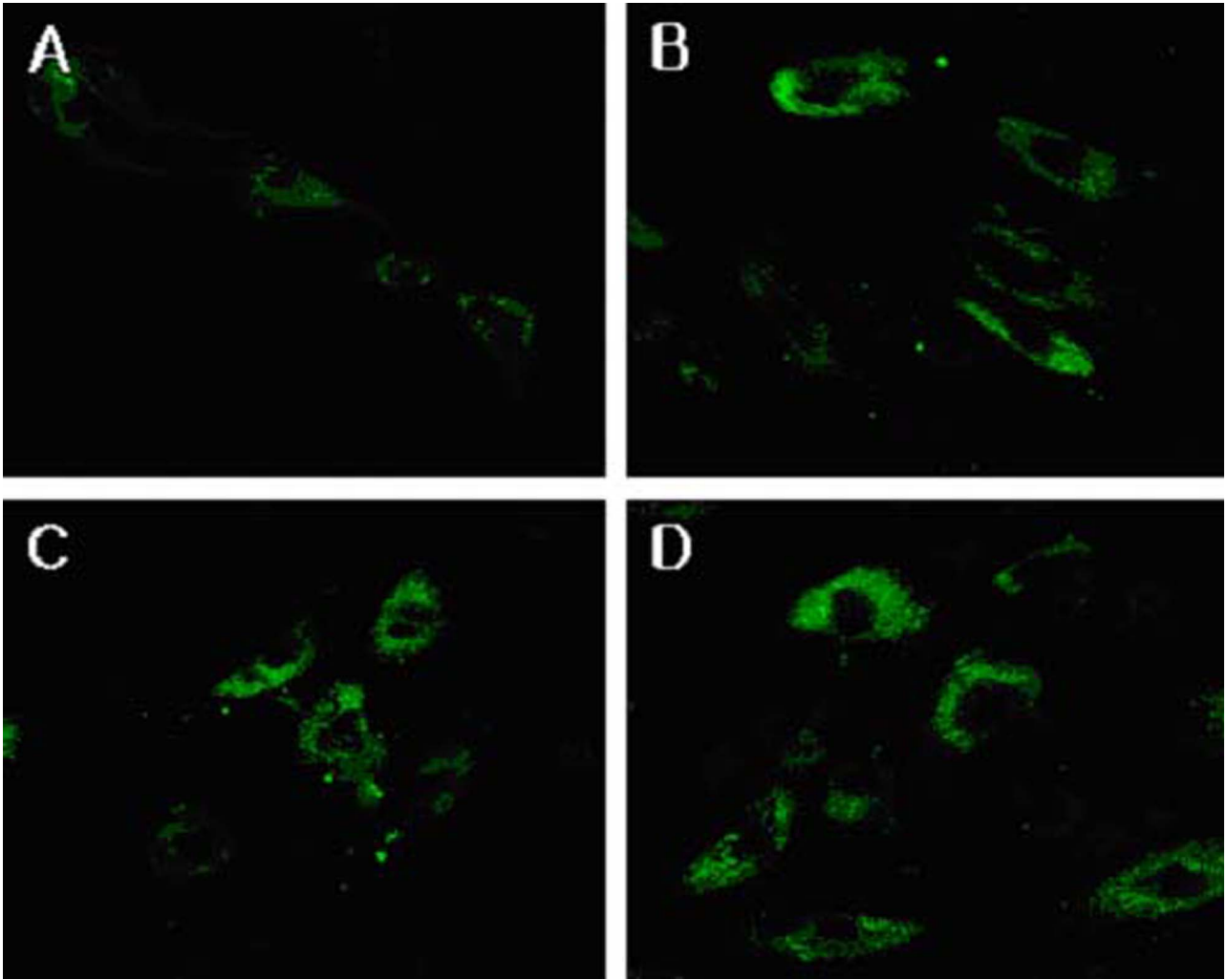


Figure 5. Fluorescent micrograph of human corneal epithelial cells after exposure to cyclosporine A 0.05% ($\times 400$): (A) control, (B) for 3 minutes, (C) for 5 minutes, (D) for 10 minutes. After treating with cyclosporine A 0.05%, apoptotic cells were visible, which represent fluorescence after binding DNA flowing into cytoplasm due to disruption of nuclear membrane. There were visible apoptotic bodies (white arrow) in extra cytoplasmic portion (B & C).

의 마이토미안 기능부전, 각막이식 후, 각막염 등 다양한 안과영역에서 사이클로스포린 점안제를 이용한 치료가 시도되고 있지만, 직접 약제에 노출되는 각막상피세포에 미치는 약제의 영향에 관해서는 알려진 바가 거의 없다. 이에 저자는 사이클로스포린에 의한 세포 독성 및 증식 정도의 반응을 살펴보고, 세포외기질인 collagen, laminin의 생성억제효과 및 세포자멸사 현상을 알아보하고자 하였다.

사이클로스포린 점안 제제의 안정성을 알아보기 위해 배양된 인간 각막상피세포에 대한 세포 독성 및 증식 억제 반응을 살펴보았다. Singh et al¹⁸은 배양된 인간 각막내피세포를 이용해 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 사이클로스포린 1000 ug/L (0.0001%)의 농도로 7일간 접촉할 경우 세포질내에서는 어떤 퇴

행성 변화도 발견되지 않았고 대조군과 유사하게 정상적인 형태를 유지했다고 하였다. Benezra et al¹⁹에 의하면 사이클로스포린 100~250 ug/ml (0.01~0.025%) 농도를 배양된 각막기질세포에 노출하였을 때 약제에 의한 세포의 독성은 미비하였으며, 단지 각막상피세포에서 DNA 합성이 감소되는 현상이 관찰되었다고 보고하였다. 또한, 사이클로스포린 농도에 따른 배양된 인간 각막내피세포 및 망막색소상피의 독성효과를 세포 증식력 및 생존률로 나타내었는데, 7일간의 약제 접촉기간 후 사이클로스포린 5 ug/ml (0.0005%)에서는 세포증식의 억제를 보이지 않다가 50 ug/ml (0.005%) 농도에서는 80%이상의 세포증식이 억제되어 대조군에 비해 유의한 생존률의 감소를 보였다.²⁰ 본 연구의 경우는 안과용 제제로 출시된 레스타시스의 농

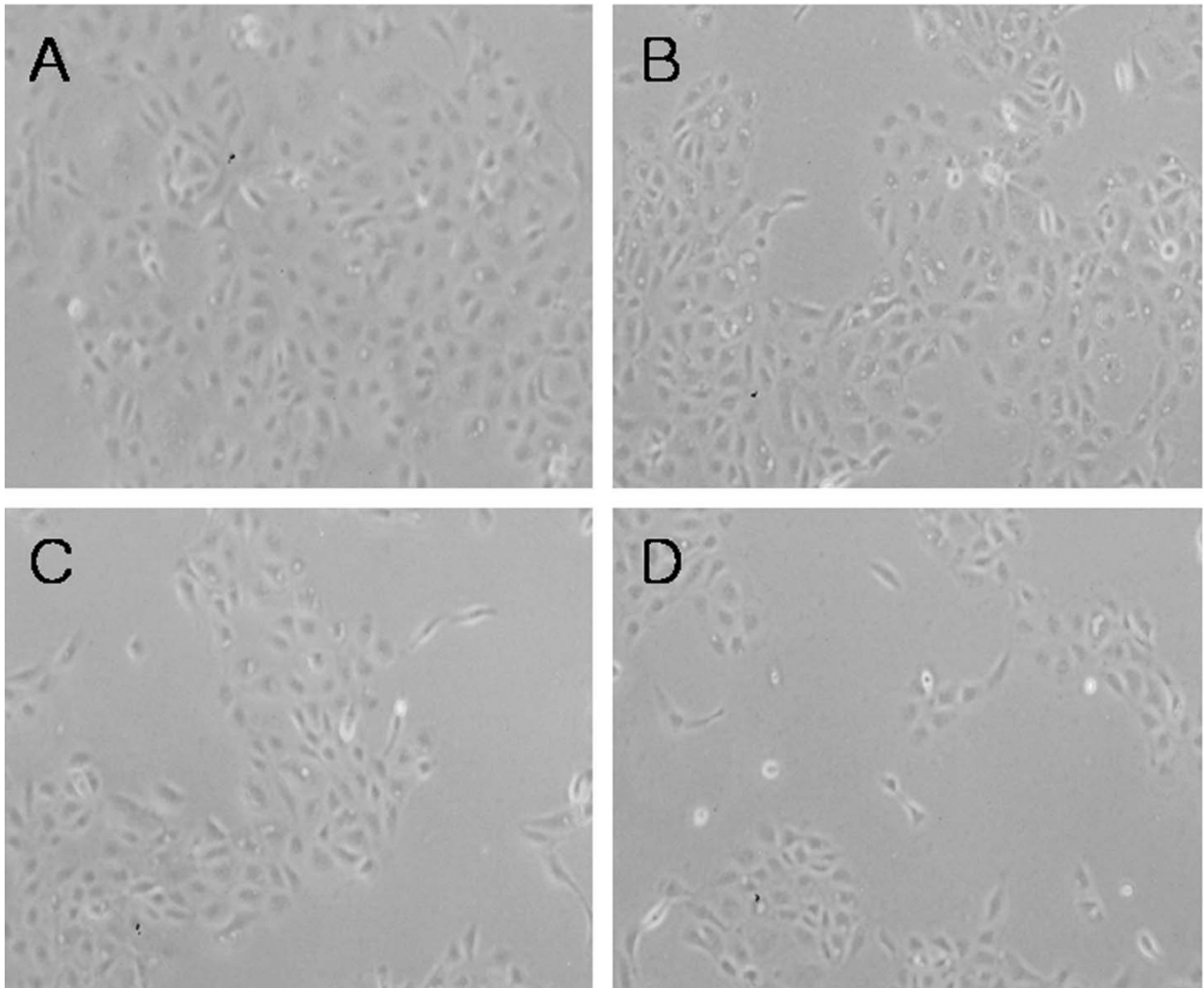


Figure 6. Inverted phase contrast micrographs of human corneal epithelial cells after exposure to cyclosporine A 0.05% ($\times 200$): (A) control, (B) for 3 minutes, (C) for 5 minutes, (D) for 10 minutes. Many epithelial cells are visible in control culture media. There are less epithelial cells which are more detached from the culture media, in the case of exposure to cyclosporine A 0.05% compared with control.

도에 맞추어 사이클로스포린 0.05%의 농도를 유지하면서 각각 3, 5, 10분의 노출시간에 따른 세포의 변화를 인체의 각막상피세포를 대상으로 살펴보았다. 약제의 노출시간 증가에 따른 세포증식 억제 및 세포독성 증가는 관찰되기는 하였으나, 10분 노출시 LDH 수치 이외에서는 심각한 세포의 손상은 보이지는 않았다. 이전의 보고들¹⁸⁻²⁰에 비해, 본 연구에서는 0.05% 농도의 사이클로스포린을 기준으로 하였고, 주로 각막내피세포가 아닌 세포의 재생 능력이 왕성한 각막상피세포를 대상으로 하였기에 노출시간을 연장하더라도 각막상피세포에 미치는 약제의 독성 효과는 미미할 것으로 생각된다. 가토와 개를 대상으로 한 연구에 따르면, 0.4%의 농도의 사이클로스포린을 하루 6회씩 6개월~1년 동안

점안시켰을 경우 결막이나 각막조직에는 심각한 안 독성의 발생이 되지 않았고,²¹ 인체의 경우 중등도 이상의 안건조증 환자에서 0.05%, 0.1% 농도의 사이클로스포린을 하루 2회씩, 6개월 이상 임상에 사용했을 경우에도 심각한 부작용은 관찰되지 않았다.¹¹

세포외기질은 조직을 지지하면서 모세혈관과 세포사이의 조직액의 이동에 중계역할을 할 뿐 아니라 조직의 분화과정에도 중요한 역할을 한다. 교원질을 구성하는 PIP는 주로 섬유모세포에서 만들어지는데 세포내에서 전교원질분자(procollagen)가 만들어진 후 분비세포 형태로 분비되어 세포밖으로 나오면 전교원질가수분해 효소(procollagen peptidase)에 의해 모교원질(tropocollagen)이 되고 이들이 모여 교원질섬유

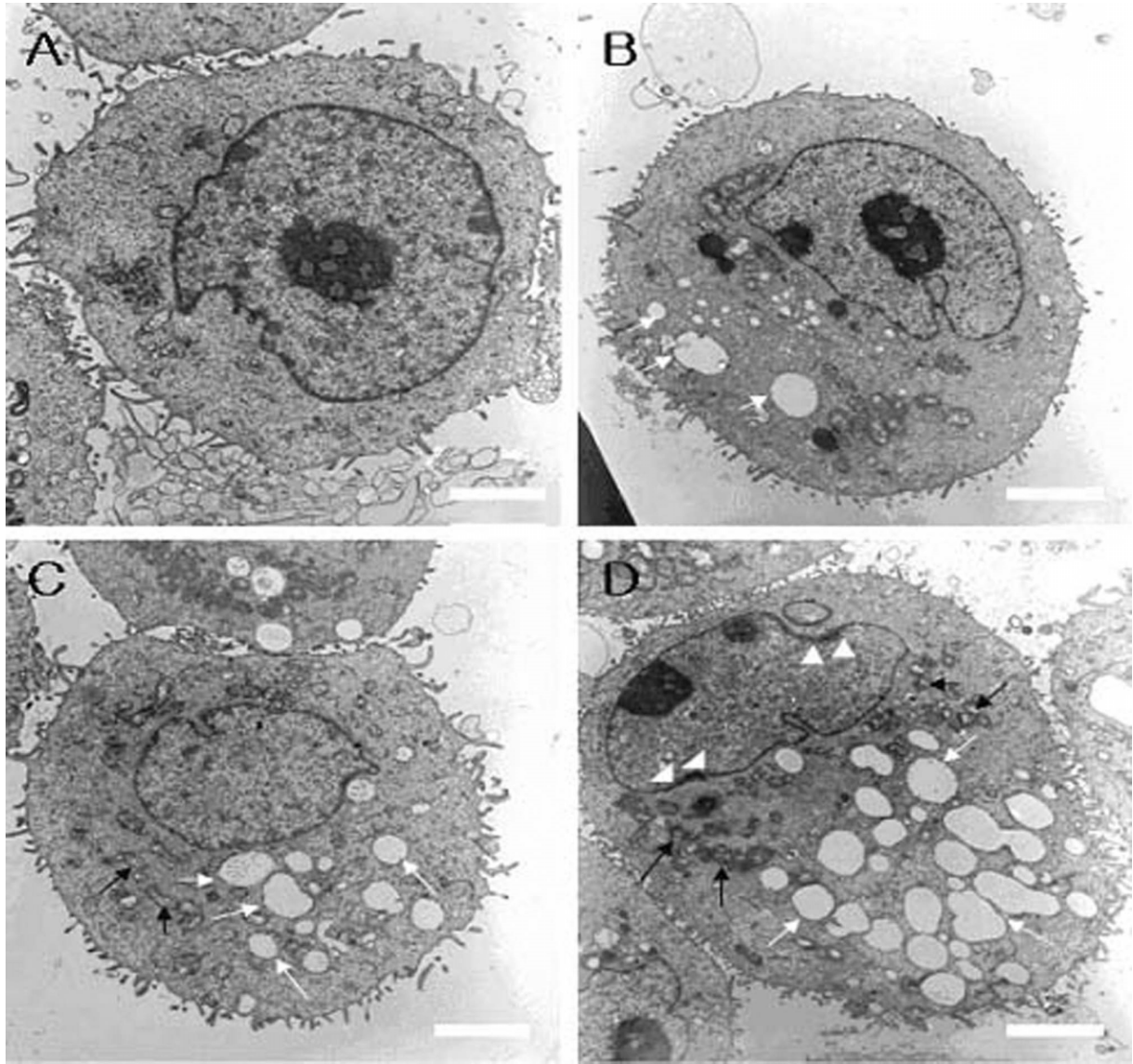


Figure 7. Transmission electron micrographs of human corneal epithelial cells after exposure to cyclosporine A 0.05% (bar length 2 μ m, A, B, C, & D : $\times 3,000\sim 4,000$); (A) control, (B) for 3 minutes, (C) for 5 minutes, (D) for 10 minutes. A normal corneal epithelial cell showed microvilli, homogenous cytoplasm and intact cell and nuclear membrane. The longer the exposure time of cyclosporine A 0.05%, the more decreased number of microvilli, well developed vacuole formation (white arrows), damaged mitochondria and rough endoplasmic reticulum (black arrows), and margination of chromatin in the nucleus (white arrowheads) the corneal epithelial cells revealed.

(collagen)을 형성한다. 이 물질이 반흔조직에서 주로 장력을 유지하는 역할을 하기 때문에 결막이나 각막의 창상 조직 회복에 매우 중요한 역할을 한다.²² 본 연구에 따르면, PIP 생성량은 대조군의 경우 200 ng/ml 이상을 보였으나, 약제의 노출시간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였지만 유의한 차이는 없었다.

Laminin은 세포막의 기저막을 형성하는 당단백질 성분으로 알려져 있지만 결막의 상피층 창상회복에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다.²³ 면역반응이 매

개된 결막염에서 주로 활성화 되어 조직 재형성 및 반흔 형성을 일으키는 결막 섬유모세포에서는 이러한 세포외기질 생성이 사이클로스포린에 의해 유의하게 감소됨이 보고된 바 있다.²⁴ 본 연구에 의하면, Laminin의 생성은 대조군의 경우 76 ng/ml로 측정되었고, 사이클로스포린에 5분 이상 노출시는 60 ng/ml로 생성량의 억제에 큰 변동이 없었다. 이는 사이클로스포린의 경우 각막상피세포에서 생성되는 세포외기질인 PIP나 laminin의 생성에 대해 억제 효과가 크지 못하기에 각

막의 창상 및 술 후 치유 과정에서 큰 영향을 미치지 못할 것으로 생각된다.

사이클로스포린이 세포외기질에 끼치는 영향에 관한 보고들이 서로 다른 결과를 보고하는 것은 실험대상의 세포 종류가 다르고 각종 성장인자나 사이클로스포린이 결합할 수 있는 지질단백을 함유하고 있는 혈장의 농도에 따라 반응이 달리 나타나기 때문이다.²⁴⁻²⁶ 또한, 엑시머레이저를 이용한 각막굴절교정수술의 경우 생길 수 있는 각막혼탁 및 근시로의 퇴행과 관련하여 각막조직을 안정화시키기 위한 목적으로는 사이클로스포린 0.05%를 사용하는 것은 임상적으로는 크게 도움을 주지 못할 것으로 생각된다. 저자의 각막상피세포를 대상으로 본 연구의 결과에서 세포외기질의 생성 및 억제에 관한 연구는 농도의 재조절이나 성장인자의 처리 등을 통해서 재차 연구할 필요성이 요구된다.

약제에 의한 세포의 독성은 크게 세포괴사와 세포자멸사로 나누어지는데, 세포자멸사는 주로 염증반응과 연관되어 초기에 발생하며, 유기체내 항상성의 유지, 감염, 창상 치유의 과정에 주로 관여한다.^{27,28} 약제에 의한 세포자멸사 유도를 확인하고자 본 연구에서는 사이클로스포린에 의해 나타나는 세포자멸사의 반응 정도를 Annexin V와 PI를 이용한 유세포분석의 결과로 분석하였다. 각막상피세포는 사이클로스포린에 3분 노출시부터 대조군에 비해 현저하게 세포자멸사 현상이 나타났는데, 약제에 3분 노출 시에는 32.71%, 5분 노출 시에는 33.81%, 10분 노출 시에는 38.92%로 유의하게 반응이 나타났지만, 세포 괴사소견은 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 또한 각막의 상피세포에서 발생하는 세포사멸의 현상을 형광현미경으로 확인하였는데, 초기에는 세포막에 Annexin V가 결합하여 형광을 보이지만, 후기에는 세포핵에 PI가 결합하여 형광을 나타내기에 핵막이나 세포질막을 뚫고 세포외로 나와서 존재하는 핵의 일부분(apoptotic body)를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

이런 현상은 인체의 결막에 있는 섬유모세포를 대상으로 사이클로스포린의 약제효과를 살펴본 연구에서, 사이클로스포린의 용량 및 노출시간과 관련하여 결막 섬유모세포의 세포자멸사를 유도한 결과와도 일치하는 소견이다. 일반적으로 사이클로스포린은 실험하는 세포의 종류, 세포의 주기 상태 등에 따라서 세포자멸사를 유도하기도 하고 억제하기도 한다고 알려져 있다.^{24,29-31} 따라서 본 연구에 의하면 0.05% 농도에서는 사이클로스포린이 세포독성을 나타내는 세포괴사는 일어나지 않으면서 세포자멸사만을 일으키는 적절한 농도임을 시사해 주지만, 보다 안전하고 유효한 약제의 농도 및 노출시간에 관해서는 더 많은 연구가 필요할 것으

로 생각된다.

이상의 결과에서 0.05% 농도의 사이클로스포린은 10분 노출시 유의한 LDH증가를 보이기는 했으나, 인체의 각막조직에서 배양된 각막상피세포에 미치는 약제의 독성효과는 아주 미비하며, 약제의 농도 및 노출시간을 잘 조절한다면 안표면의 각막조직에는 크게 영향을 받지 않을 것으로 생각된다. 각막상피세포를 대상으로 창상 및 술 후에 수반되는 세포외 기질 합성에는 의미있는 억제효과를 보이지 않지만, 세포의 증식을 억제하는 역할에서는 약제의 사용에 따른 세포사멸작용이 연관되어 있음을 확인할 수 있었다. 향후 사이클로스포린 약제의 안정성에 관한 추후 연구를 위해 생체 내와 생체 외에서의 노출농도 및 노출시간에 따른 조건의 비교가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Hill JC. High risk corneal grafting. *Br J Ophthalmol* 2002;86:945.
- 2) Poon AC, Forbes JE, Dart JKG, et al. Systemic cyclosporin A in high risk penetrating keratoplasties: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1464-9.
- 3) Hill JC. Immunosuppression in corneal transplantation. *Eye* 1995;9:247-53.
- 4) Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty: short versus long term therapy. *Ophthalmology* 1994;101:128-33.
- 5) Minguez E, Tiestos MT, Cristobal JA, et al. Intraocular absorption of cyclosporin A eyedrops. *J Fr Ophthalmol* 1992;15:263-7.
- 6) BenEzra D, Maftzir G. Ocular penetration of cyclosporin A: the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1362-6.
- 7) Lightman S. New therapeutic options in uveitis. *Eye* 1997;11:222-6.
- 8) Chen J, Xie H, Wang Z, et al. Moore's ulcer in China: a study of clinical characteristics and treatment. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1244-9.
- 9) Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye treatment: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-96.
- 10) Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:967-74.
- 11) Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:631-9.
- 12) Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman S. The

- immunomodulatory effect of topical cyclosporin A in atopic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:392-9.
- 13) Stern ME, Geo J, Siemasko KT, et al. Role of the lacrimal gland functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-16.
- 14) Pepose JS, Akata RF, Pflugfelder SC, et al. Mononuclear cell phenotypes and immunoglobulin gene rearrangements in lacrimal gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *Ophthalmology* 1990;97:1599-605.
- 15) Borel JF, Baumann G, Chapman I, et al. In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv Pharmacol* 1996;35:115-246.
- 16) Laibovitz RA, Solch S, Andriano K, et al. Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 1993;12:315-23.
- 17) Power WJ, Mullaney P, Farrel M, et al. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjogren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.
- 18) Singh G, Lindstrom RL, Doughman DJ. Cyclosporin A on human corneal endothelium. *Cornea* 1984;3:272-7.
- 19) BenEzra D, Antebi I, Maftzir G. Differential effect of cyclosporin A on lymphocyte and keratocyte proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:42.
- 20) Garweg JG, Wegmann-Burns M, Goldblum D. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:382-9.
- 21) Angelov O, Wiese A, Yuan Y, et al. Preclinical safety studies of cyclosporine ophthalmic emulsion. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:991-5.
- 22) Tonoe O, Yamanaka O, Okada Y, et al. Collagen biosynthesis and cellular proliferation after filtering surgery in rabbits. *Folia Ophthalmol Jpn* 1995;46:242-5.
- 23) Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycoaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *J Invest Dermatol* 1989;92:605-10.
- 24) Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporine A on human conjunctival fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1512-7.
- 25) Williamson MS, Miller EK, Plemons J, et al. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva. *J Periodontol* 1994;65:895-903.
- 26) James JA, Irwin CR, Linden GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. *J Periodontol Res* 1998;33:40-8.
- 27) Adler R. Mechanism of photoreceptor death in retinal degeneration. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of the 21st century. *Arch Ophthalmol* 1996;114:79-83.
- 28) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
- 29) Horigome A, Hirano T, Oka T, et al. Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1997;37:87-94.
- 30) Walter DH, Haendler J, Galle J, et al. Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 1998;98:1153-7.
- 31) Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP. Apoptosis and necrosis. *Kidney Int* 1998;54:1955-66.

=ABSTRACT=

Effect of Cyclosporine A 0.05% on Human Corneal Epithelial Cells

Ji Eun Lee, M.D.¹, Wook Bum Shin, M.D.², Jong Soo Lee, M.D.¹

*Department of Ophthalmology, Pusan National University College of Medicine, Pusan National University¹, Pusan, Korea
Shin's Eye Clinic², Pusan, Korea*

Purpose: To evaluate the toxic effect of topical cyclosporine on cultured human corneal epithelium and to investigate the apoptotic response and cellular morphologic changes associated with cyclosporine in vitro.

Methods: Human corneal epithelial cells were exposed to a concentration of cyclosporine A (0.05%) for a period of 3, 5, and 10 minutes. MTT-based calorimetric assay was performed to assess the metabolic activity of cellular proliferation and lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay for cytotoxicity. Apoptotic response was evaluated with flow cytometric analysis and fluorescence staining with Annexin V and propidium iodide. Cellular morphology was evaluated by inverted phase-contrast light microscopy and electron microscopy.

Results: The inhibitory effect of human corneal epithelial cell proliferation and cytotoxicity showed a time-dependent response and had a significant effect when exposed for 10 minutes ($P=0.04$). The maximum response did not reach the lethal dose (LD_{50}). Apoptosis was seen in flow cytometry and apoptotic cells were demonstrated in fluorescent micrograph after being treated with cyclosporine A (0.05%). Human corneal epithelial cells were more detached from the bottom of the dish and damaged cells show degenerative changes like microvilli disappearance, vacuoles formation, and chromatin of the nuclear remnant condensed along the nuclear periphery.

Conclusions: Cyclosporine A (0.05%) could be used without any significant toxic effect on human corneal epithelial cells except for exposure times longer than 10 minutes. Induction of apoptosis modulation may be one of the cyclosporine's mechanism for inhibiting cellular proliferation.

J Korean Ophthalmol Soc 48(10):1399-1409, 2007

Key Words: Apoptosis, Corneal epithelium, Cyclosporine, Toxicity

Address reprint requests to **Jong Soo Lee, M.D.**

Department of Ophthalmology Pusan National University Hospital

#1-10 Ami-dong, Seo-gu, Pusan 602-739, Korea

Tel: 82-51-240-7323, Fax: 82-51-242-7341, E-mail: jongsool@pusan.ac.kr