

백내장 수술 후 후낭혼탁 발생 억제에 대한 트라닐라스트의 유용성

김호영¹ · 이현일² · 전연숙¹ · 김재찬¹

중앙대학교 의과대학 안과학교실¹, GM 안과²

목적: 트라닐라스트의 백내장 수술 후 발생할 수 있는 후낭혼탁 억제효과 및 그 기전을 알아보고자 한다.

대상과 방법: 수정체상피세포주(B3)에 0.005~0.1 mM의 트라닐라스트 처리 후 MTT assay를 통해 세포독성 및 유효농도를 결정하였다. B3세포주를 20% FBS가 포함된 EMEM에서 배양하면서 트라닐라스트 처리 후 형태변화를 관찰하였다. 0.01 mM 트라닐라스트를 첨가한 후 RT-PCR을 통해 사이토카인의 발현 변화를 비교 분석하였다. 토끼 10마리에 인공수정체삽입 후 0.5% 트라닐라스트 점안제를 하루 4번씩 수술 후 8주간 점안하면서 후낭혼탁 정도를 관찰하였다.

결과: 트라닐라스트는 0.05 mM 이상에서 B3세포주의 사멸을 유도하였고, 0.01 mM 농도에서 체외 배양으로 인한 EMT를 차단하였다. RT-PCR 결과 TGF- $\beta_{1/2}$, IL-18, CDK7 mRNA의 발현이 감소하였고, 수술 후 5주부터 0.5% 트라닐라스트 안약을 점안한 토끼군에서 유의한 후낭혼탁 억제가 관찰되었다.

결론: 트라닐라스트는 TGF- β , IL-18, CDK7 발현 억제를 통해 EMT를 억제하며, 따라서 후낭혼탁 예방을 위한 임상적 사용 가능성이 기대된다.

〈대한안과학회지 2008;49(12):1981-1988〉

후낭혼탁은 백내장 수술 후 수반되는 가장 흔한 합병증 중 하나로 간단한 치료를 통하여 정상 시력을 회복할 수 있지만, 외래에서 추가적으로 레이저 치료를 해야 하는 부담이 있다. 더구나 최근 백내장 수술 술기의 발전은 단순히 백내장의 제거에만 그치지 않고, 특수렌즈를 이용한 시력의 질적 향상에까지 치료 범위를 넓히고 있으며 이에 따라 환자의 높아진 기대치를 만족시키기 위해 후낭혼탁은 반드시 피해야 할 합병증으로 대두되고 있다. 백내장 수술 후 후낭혼탁은 과거에 발생 빈도가 무려 20~50%에까지 보고될 정도로 흔했던 것에 반해,¹⁻³ 최근에는 백내장 수술의 발전과 함께 인공 수정체의 재질이나 형태의 개선으로 10% 미만까지 감소하였음에도 불구하고 아직 만족할 만큼의 개선을 기대하기는 어려운 실정이다.⁴⁻¹² 따라서 좀 더 효과적이고

실질적인 예방 치료로 후낭혼탁의 발생을 방지하는 것이 필요하다.

현재까지 후발성 백내장 형성의 중요한 생화학적 모델로 생각되는 것은 epithelial-mesenchymal transition (EMT)으로, 이는 염증 반응 스트레스와 같은 일정한 자극을 통해 수정체상피세포의 형태와 성질이 변화되는 과정을 말한다. 현재까지 보고된 바로는 EMT 과정에서 transforming growth factor (TGF)- β 가 매개체의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁵ 트라닐라스트는 임상적으로는 주로 항알러지 제제로 사용되지만 leukotriene의 길항을 통한 항염증작용 이외에도 TGF- β 를 억제하여 교원질 분비를 억제하는 작용을 하며, cyclin dependent kinase (CDK)-cyclin 복합체를 억제하여 세포주기를 정지시키는 역할도 수행하는 것으로 보고되고 있다.¹⁶ 안과적으로는 원발 개방성 녹내장이나 망막의 증식성질환, 굴절교정수술 후 각막 혼탁 억제 등의 효능이 입증되고 있으며,¹⁷⁻²⁰ 이는 주로 TGF- β 의 분비 억제로 인해 섬유모세포가 이동하여 세포외기질의 분비를 억제하는 데서 비롯된다고 생각하고 있으나, 백내장수술 후 후낭혼탁과 관련된 분자생물학적 연구는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 트라닐라스트가 수정체상피세포의 EMT에 나타내는 효과를 알아보기 위하여, 수정체상피세포주(B3)에 트라닐라스트를 처리한 후 염증

〈접수일 : 2008년 6월 13일, 심사통과일 : 2008년 11월 24일〉

통신저자 : 이 현 일
서울시 서초구 반포동 748-16 삼흥빌딩 4층
GM 안과
Tel: 02-546-4682, Fax: 02-546-5398
E-mail: fineview21@empal.com

* 본 논문의 요지는 이 연구는 2005년 중앙대학교 학술연구과제 지원에 의함

관련 사이토카인과 TGF- β , 세포 주기 활성화 단백질인 CDK발현의 변화를 분석하였다. 또한 토끼의 수정체를 제거하고 인공수정체를 삽입한 후 트라닐라스트 투여 여부에 따른 후낭혼탁의 발생 정도 변화를 관찰하였다.

대상과 방법

인간 수정체상피세포주의 배양

인간 수정체상피세포주(human lens epithelial cell lines; B3)는 한국세포주은행으로부터 구입하였으며, 20% fetal bovine serum (FBS)과 1% 항생제가 포함된 Eagle's minimal essential medium (EMEM; WelGene, Korea)에서 배양하였으며 3~4일 간격으로 계대배양을 실시하였다.

트라닐라스트의 세포독성 평가

B3 세포주에 대한 트라닐라스트의 세포 독성을 평가하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, USA)을 사용하였다. B3 세포주를 96-well plate에 0.4×10^4 cells/100 μ l 배양액/well (Falcon Co., USA)의 농도로 접종한 후 16시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 부착된 세포주에 0.005-0.1 mM의 트라닐라스트(리자벤 캡셀 100 mg, 중외제약, Korea)를 처리한 후 24~72시간 동안 배양하였다. 배양중인 세포는 MTT working solution (2 mg/ml)을 2시간 동안 처리하였으며, 이후 배양액을 모두 제거하고 150 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemicals, USA)를 가하여 formazan을 용해시킴으로써 발색을 유도하였다. 발색 반응은 ELISA plate reader를 이용하여 595 nm에서 측정하였다.

트라닐라스트의 유효농도 결정

B3 세포주를 혈청이 포함된 배지를 이용하여 체외 배양할 경우 EMT가 진행되는 것으로 알려져 있다. 따라서 B3 세포주의 EMT를 억제할 수 있는 트라닐라스트의 유효농도를 결정하기 위하여 배양중인 B3 세포주에 0.005~0.1 mM의 트라닐라스트를 처리한 후 세포의 형태학적 변화를 위상차 현미경을 통해 관찰하였다.

트라닐라스트에 의한 사이토카인 발현 변화

트라닐라스트가 B3 세포주의 사이토카인 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인하였다. FBS가 첨가되지 않은 EMEM 배양에서 B3 세포주를 24시간 배양한 후, 0.01 mM의 트라닐라스트를 첨가하여 8시간 동안 추가 배양하였으며, 음성 대조군에는 트라닐라스트의 용매인 DMSO를 첨가하였다. 배양된 세포들로부터 Trizol reagent (Sigma Chemicals, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후 DNase를 처리하여 genomic DNA를 제거하였으며, 500 ng의 total RNA로부터 moloney murine leukemia virus (M-MLV) 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 5개의 house-keeping 유전자 actin, beta (ACTB), beta 2 microglobulin (B2M), glyceral dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (SDHA), ribosomal protein L13a (RPL13A)의 cDNA 양을 Seeplex GeneXP HouseKeeping gene SET PCR (쥬씨젠, Korea)을 이용하여 초기화 한 후, 이를 바탕으로 동일량의 cDNA에 대하여 Seeplex GeneXP Cytokine gene SET 3 (IL-8, IL-12A, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) 와 Seeplex Cell cycle regulator gene SET 5 (CDK9, TP53BP2, CDK6, CDK10, CDKN1A, CDKL1, CDK7) (쥬씨젠, Korea)를 이용하여, 타깃 유전자들의 발현량을 비교하였다. PCR조건 등은 제조사의 제품 매뉴얼에 따라 수행하였다.

토끼를 이용한 트라닐라스트의 후낭혼탁 억제효과

본 실험은 ARVO의 동물보호 규약에 따라 실험을 진행하였다. 20마리(실험군 10마리, 대조군 10마리)의 2.5~3.0 Kg Newzealand White Rabbit을 사용하였으며 실험군과 대조군 토끼 각각 1마리씩 안내염 및 인공수정체 위치이상으로 실험에서 제외되었다. 마취는 케타라(ketamine hydrochloride 50 mg/ml, 유한양행, Korea)와 럼폰(xylazine hydrochloride 23.32 mg/ml, 바이엘코리아, Korea)을 1:1의 비율로 혼합하여 1 ml/kg 근육 주사하였다. 수술 전 동공은 1% tropicamide (Mydriacyl[®]; Alcon-Couvreur, Puurs, Belgium)를 이용하여 확장시켰고, 수술은 한 명의 술자에 의해 동일한 방법으로 시행되었다. 2.75 mm의 절개창을 통해 점탄 물질을 주입하였고, 남은 전방 부위가 렌즈의 광학부를 모두 덮을 수 있도록 4.5~5.0 mm의 비교적 작은 전방 절개를 중심에 잘 맞추어 시행하였다. 토끼의 수정체는 Legacy[®] (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, USA)를

이용하여 초음파유화흡입술로 제거하였으며 관류액은 Balanced salt solution (BSS®; Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, USA)을 사용하였다. 수정체의 수질부는 모두 제거하였으며 추가적인 전, 후낭부의 연마는 하지 않았다. 이후에 인공수정체 (MA60-BM, Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, USA)를 Monarch® (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, USA) 주입기를 이용하여 후낭 내에 잘 위치시켰다. 전방내의 모든 이물질을 포함한 점탄 물질을 제거하였고 토끼의 각막이 사람보다 얇아서 전방이 유지되지 않을 위험이 있기 때문에 절개창은 누수 여부에 관계없이 10-0 나일론을 이용하여 1바늘 봉합하였다. 수술 후 0.5% levofloxacin 점안액(Cravit®, Santen, Osaka, Japan)을 하루 4회씩 2주간 점안하였고, 실험군은 추가로 0.5% 트라닐라스트(크릭스®, 중외제약, Korea) 점안액을 하루 4회씩 8주간 점안하였다.

임상양상은 매주 관찰하였으며, 표준화된 광량과 표준화된 각도의 역반사 조명을 이용하여 외안부 사진을 얻었고 세극등 검사를 통하여 각막의 상태와 전방부의 염증 정도 그리고 삽입된 렌즈의 양상을 관찰하였다. 후낭혼탁의 발생에 있어서 기타 여러 가지 효과를 배제하여 표면 재질에 따른 혼탁형성 정도의 변화만 관찰할 수 있도록 하기 위하여 관찰도중에 인공수정체의 광학부가 수정체낭 밖으로 나오거나 전방의 절제된 면이 광학면을 모두 덮지 못하는 경우는 실험군에서 제외하였다. 후낭혼탁의 정도는 POComan (St. Thomas Hospital and King's College) 프로그램을 이용하여 비교하였다. 역반사 조명을 이용하여 찍은 디지털 이미지를 bitmap format으로 전환한 후 인공수정체가 장자리를 프로그램에 내장된 circle-drawing tool을 이용하여 정한 후 전방의 절개면을 short chords를 이용하여 정하였다. 3개의 동일 면적의 동심원이 방사

선들에 의해 나뉘어져 생긴 격자가 인공수정체 전면을 덮어 동일 면적의 56개 분절이 되도록 하였다. 검사는 각각의 분절을 Bender 등이 정한 후낭혼탁 등급에 따라 각 분절이 50%이상 혼탁이 있는 경우 가벼운 (grade 1, 파란색), 중등도 (grade 2, 노란색), 심한 정도 (grade 3, 빨간색)로 표시하였다. Severity score는 [(grade 1 범위 X 1) + (grade 2 범위 X 2) + (grade 3 범위 X 3)]을 전체 범위로 나누어 계산하였다 (Fig. 4).²¹ 통계적 처리는 각 주수의 결과에 대해 Mann-Whitney U로 검증하였다.

결 과

트라닐라스트의 세포독성 평가 및 유효농도 결정

MTT assay를 통해 트라닐라스트의 세포독성을 분석한 결과 0.02 mM 이하의 농도로 트라닐라스트를 처리한 군에서는 세포의 증식이 영향이 없었던 반면, 0.05 mM 이상의 트라닐라스트에 노출 시 급격한 세포의 사멸을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

트라닐라스트 처리 후 위상차 현미경에 의한 관찰 결과에서는 트라닐라스트가 첨가되지 않은 대조군에서 세포질이 신장되고 발아되는 양상을 관찰할 수 있었으며 이와 같은 변화는 3일 후에 더욱 심화되는 양상을 나타내어 정상 수정체상피세포의 자갈 모양과는 큰 차이를 보였다 (Fig. 2). 0.005 mM의 트라닐라스트를 첨가한 군에서는 약간의 세포증식 억제 현상이 관찰되었으며 배양 3일 후에는 대조군과 유사하게 세포의 형태가 변화함을 확인할 수 있었던 반면, 0.01 mM의 트라닐라스트를 첨가한 군에서도 약간의 세포증식 억제 현상

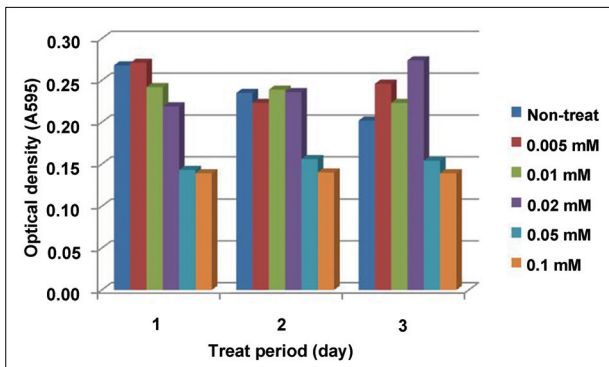


Figure 1. The cytotoxicity of tranilast in B3 cell lines. The rapid decrease of proliferation was found at above 0.05 mM of tranilast, which was constant regardless of the cultivation time.

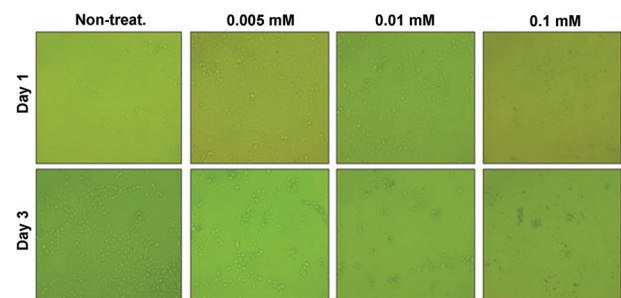


Figure 2. Phase-contrast microscopic observation of 0.005-0.1 mM tranilast-treated B3 cell lines. Although non-treated-B3 cells showed spindle-shaped fibroblastic morphology, 0.01 mM tranilast-treated cells did not showed any morphological changes. 0.005 mM tranilast-treated cells showed slightly inhibited proliferation and morphological changes similar to non-treated cells. 0.1 mM tranilast-treated cells were detached and dead even in 1 hour after treatment.

이 관찰되었으나 대조군과 같은 형태학적 변화는 없었다. 0.1 mM의 트라닐라스트를 첨가한 군에서는 1일 배양 후에도 세포의 사멸 및 탈락을 관찰할 수 있었으며 3일 배양 시에는 대부분의 세포가 사멸한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 B3 세포주에 독성을 나타내지 않으면서 세포의 형태학적 변화를 억제할 수 있는 적정 농도가 0.01 mM임을 알 수 있었으며 이후 실험에 본 농도를 사용하였다.

트라닐라스트에 의한 사이토카인 발현 변화

트라닐라스트를 첨가한 후 배양한 세포에서 사이토카인의 발현 변화를 분석한 결과 TGF- β_1 및 β_2 의 mRNA발현이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 염증관련 사이토카인인 IL-18과 세포주기 조절인자 중 하나인 CDK7의 mRNA 발현도 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

토끼를 이용한 트라닐라스트의 후낭혼탁 억제효과.

수술 후 초기의 전방염증은 미약하였고 세균감염을 의심할 증후는 관찰되지 않았다. 관찰 초기에는 대조군

과 실험군의 혼탁 정도에 차이가 없었으나, 트라닐라스트를 투여한 실험군에서는 수술 후 5주부터 대조군에 비해 유의한 후낭혼탁의 억제가 관찰되었다(Table 1).

고 찰

트라닐라스트는 leukotriene 유사체로써 트립토판이 indolamine 2,3-dioxygenase에 의해 대사되어 발생되는 것으로 알려져 있다.¹⁶ 주로 비만세포와 호염구의 화학매개체의 분비를 억제할 수 있는 항 알러지 제제로 인식되어 있지만, 세포 부착물질인 vascular adhesion molecule (VCAM)-1 혹은 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1의 발현을 감소시켜 염증 반응을 직접적으로 억제할 수 있는 효과도 있다.²² 이외에도 트라닐라스트의 항 산화제로써의 역할이나 TGF와 관련하여 조직 내 섬유모세포를 억제하여 교원질 분비를 억제하는 효과에 대해서도 보고되고 있으며,^{23,24} CDK-cyclin 복합체를 강력하게 억제하여 세포주기 중 G0/G1기와 G1/S 조절점을 억제하는 것으로 보고되고 있다.^{25,26} 이미 성형외과를 비롯한 여타 의학 분야에서는 활발히 연구된 약제이다.²⁶⁻²⁹ 안과의 경우 각막세포 및 망막색소상피의 증식과 세포사멸에 미치는 영향에 대해 이미 보고된 바 있으나,^{17-20, 31,32} 백내장의 발생과 관련되어 수정체상피세포와 후낭혼탁에 대한 직접적인 분자생물학적 연구는 현재까지 보고된 바 없다.

현재 일부 백내장 및 후발성 백내장 형성의 중요한 생화학적 모델 중 하나로 생각되는 것이 바로 EMT이다. EMT는 일정한 자극을 통해 상피세포가 고유한 특성을 잃어버리고 중간엽세포의 특성을 지니게 되어 생체 내에서 활발히 이동하고 이동된 자리에서 많은 교원질을 분비하는 과정을 의미하며,¹³ 정상적으로도 창상치유의 과정에서 흔히 관찰되는 현상이다.¹⁴ EMT의 과정에 중요한 역할을 담당하는 화학적 매개체로 알려진 TGF- β 는 모두 세가지 형태의 isoform으로 구성되어 있다.

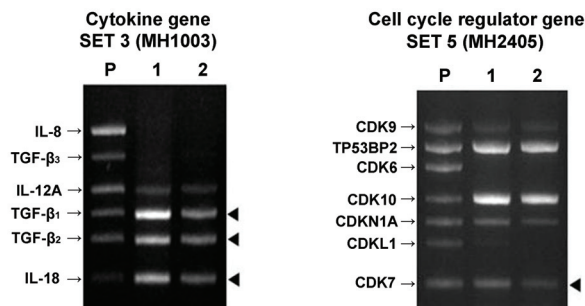


Figure 3. Messenger RNA expression of cytokines in B3 cell lines; P=positive control 1=control group with DMSO=0.01 mM tranilast-treated group. The black arrowheads denote the prominent decrease in comparison with the control.

Table 1. POComan score

	Control group (n*=9)	Tranilast group (n=9)	p-value
1 wk [†]	0.11	0.14	0.981
2 wks	0.12	0.18	0.775
3 wks	0.37	0.21	0.093
4 wks	0.41	0.31	0.688
5 wks	0.72	0.43	0.044 [‡]
6 wks	0.90	0.41	0.048 [‡]
7 wks	1.16	0.52	0.023 [‡]
8 wks	1.49	0.55	0.018 [‡]

* n=number; [†] wk=week; [‡] p<0.05, Mann-Whitney U test.

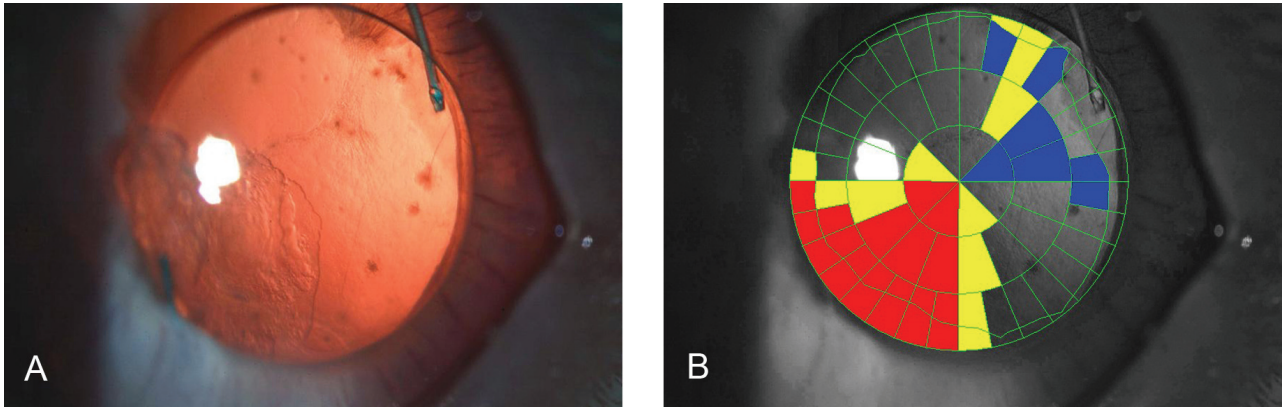


Figure 4. PCO severity grading with POComan software. Retroilluminated picture A was transformed into a black-and-white picture B. The margin of anterior capsule should be marked then the grid is allocated automatically. Using the standard photography (grade 1-3), the severity score was calculated with the formula as follows: Severity score=(3×Red (grade3)+2×Yellow (grade2)+1×Blue (grade1)) / total area.

TGF- β 는 다양한 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며, 수정체상피세포에서의 발현도 보고된 바 있다.¹⁵ 뿐만 아니라 안구 내에서도 고농도의 발현이 관찰되는데 특히 전방 내에서 주로 관찰되는 것은 그 중에서도 제2형에 속한다. 전방 내에서 정상적으로 TGF- β 는 전방내의 면역특수성을 이루는 한 부분으로, 각종 염증이 유발되는 경우 전방 내로 침투한 림프구를 사멸시키는 역할도 하지만, 반대로 정상적인 면역 항상성이 유지되지 않는 상황에서는 EMT를 유도하기도 한다. 수정체상피세포도 역시 염증이냐 온도변화 등과 같은 특수한 상황에 의해 TGF- β 의 분비가 증가하게 되면, 역시 이러한 EMT과정을 통해 혼탁을 형성할 수 있을 것으로 보고되고 있다. 트립토판 대사산물에서 유래한 트라닐라스트는 TGF- β 의 분비를 효과적으로 억제하여 EMT의 발생을 조절할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 과도한 교원질 분비가 원인이 되는 각종 질환뿐만 아니라 EMT과정을 통해 발생하는 후발성 백내장 역시 치료효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

또한 트라닐라스트는 세포주기 조절에 관여하는 CDK의 발현을 조절하여 G0/G1기에서 세포 주기를 정지시키고, G1/S 조절점에서 세포주기를 억제함으로써 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. CDK는 단독으로 활성을 가질 수 없으며, cyclin과 결합 후 CDK activating kinase (CAK)에 의해 활성화 되어 cyclin-CDK복합체를 형성하여 세포 내 주요 단백질의 인산화 과정을 조절하고 세포 주기를 활성화 시키는 단백질이다.^{16,25,26} CDK의 이러한 역할은 세포의 증식을 조절하는데 있어 매우 중요하게 작용하므로, 트라닐라스트 처리 후 CDK7의 감소는 후낭혼탁을 발생시키는 여러 가지 세포의 증식을 억제하는데 직접적으

로 관여함을 추측해 볼 수 있다. 본 연구에서 트라닐라스트 처리에 의해 mRNA발현이 감소하는 것으로 확인된 CDK7은 DNA복구와 전사 과정의 초기 유도과정에 관여할 뿐만 아니라, 세포주기를 활성화 시키는 과정에서 다른 CDK들을 인산화시키는 CAK로 작용하여 세포 주기를 조절하는 두 가지 중요한 작용을 한다.^{33,34}

IFN- γ 의 유발 인자로 알려진 IL-18에 대한 안구에서의 역할은 아직 명확히 알려지지는 않았다.³⁵ IL-18은 각막의 상피세포에서 발현되며 pro-inflammatory agent에 의해 생성이 증가하고, 이는 면역과 염증반응을 유도하는 IFN- γ 를 발현시키는 중요한 역할을 수행한다고 한다고 보고되었다.³⁶ 또한 홍채와 섬모체의 상피세포와 망막에서도 발현이 관찰되나 아직까지 그 역할은 밝혀지지 않고 있다.³⁷ 최근 Nagai et al³⁸은 유전 변이된 백내장모델인 Upjohn Pharmaceuticals Limited (UPL) 쥐의 수정체상피세포에서 IL-18이 IFN- γ 의 생성을 증가시키며 이는 수정체 혼탁과 깊은 관련이 있음을 보고하였다. 이처럼 후낭혼탁 발생에서 IL-18의 역할이 명확히 밝혀지지는 않았지만, 그 연관성이 대두되는 만큼 본 연구에서의 트라닐라스트에 의한 IL-18의 감소가 후낭혼탁과 연관되어 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서 수정체상피세포의 체외 배양시 결정된 트라닐라스트의 유효농도인 0.01 mM은 기존의 다른 세포를 통한 연구에 비해 비교적 저농도였으며,¹⁷⁻¹⁹ 이는 세포의 종류 차이 때문에 발생하는 차이로 생각된다. RT-PCR 분석 결과 0.01 mM의 트라닐라스트를 처리 후 8시간 동안 배양된 B3 세포주에서는 TGF- β_1 및 β_2 mRNA의 유의적 감소가 확인되었으며, 세포주기 조절에 관여하는 CDK-7의 분비도 감소함을 관찰할

수 있었다. 이는 트라닐라스트의 처리가 수정체상피세포의 EMT 억제는 물론 증식도 조절할 수 있음 제시하는 것이라 할 수 있다.

토끼 실험 결과에서는 백내장 수술 후 발생한 후낭혼탁이 트라닐라스트를 점안한 군에서 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 과거 Tobar et al³⁹의 연구에서와 유사한 결과지만, 당시의 연구에 비해 혼탁의 정도를 좀 더 객관적인 방법에서 정량화하여 비교하였다는 점에서 차이를 보인다. 본 실험에서 사용된 POCO man은 후낭혼탁의 정도를 측정하는 여러 가지 방법 중 비교적 손쉬우면서도 객관적인 방법이다. 백내장 수술 후 후낭혼탁 억제에 대한 트라닐라스트의 효과는 Tobar et al³⁹이 사람에게서 0.5 % 트라닐라스트 점안약을 백내장 수술 후 3달간 점안하여 1달, 3달째 대조군에 비하여 유의한 혼탁억제를 관찰하였으며, Miyazawa et al⁴⁰은 0.5%, 1.0%, 2.0%의 다른 농도의 트라닐라스트를 백내장 수술 후 점안하여 1주, 5주에 후낭혼탁 억제를 관찰하였고 각 농도간의 차이는 없었다고 보고하였다. Wang et al⁴¹은 점안제로서의 트라닐라스트 효과가 떨어질 수 있음을 감안하여 트라닐라스트 마이크로스피어(0.5, 1.0, 2.0 mg)를 토끼에게 수정체유화흡입술 및 인공수정체삽입 후 낭내에 직접 주입하여 3개월간 유의한 후낭혼탁 억제를 관찰하였다.

본 실험에서 트라닐라스트의 사용은 TGF- β 의 발현을 조절하여 염증 초기단계에 효과가 있을 가능성이 있으므로 본 연구에서도수술 직후에 바로 투약을 실시하였으며, 다른 비스테로이드성 혹은 스테로이드 제제가 교원질 분비에 영향을 줄 수 있으므로 트라닐라스트와 항생제만을 사용하였다. 본 실험 중 토끼실험에서 사용된 점안 약제의 농도가 5 mg/ml로 점안 약제가 각막을 통과하여 목표 조직에 도달하는 비율이 5% 미만으로 알려져 있어 0.25 mg/ml (0.083 mM 트라닐라스트 분자량 327.3)이하의 농도가 전방에 존재할 것으로 예측할 수 있다.⁴² 이는 본 실험의 생체외 실험에서 사용된 0.01 mM농도와 유사한 농도이지만, 직접 전방내 약물 농도를 측정하지 못한 제한점이 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 안구 내의 기타 다른 세포들과 마찬가지로 수정체상피세포 역시 트라닐라스트에 의해 TGF- β 의 발현이 억제됨을 알 수 있었고, 세포주기 활성화 단백질 중 하나인 CDK7 및 IFN- γ 발인자인 IL-18의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 토끼 실험을 통해 트라닐라스트의 점안이 백내장 수술 후 발생하는 후낭혼탁을 유의하게 감소시킴 또한 정량적으로 평가할 수 있었을 뿐만 아니라 이와 같은 효과가 비교적 저 농도에서도 관찰됨으로써 점안 투여 시에도 충분

한 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

추후 수정체 후낭혼탁과 관련된 다양한 매개체의 발현에 트라닐라스트가 직접적으로 관여하는지 여부를 알아보기 위해서 트라닐라스트 점안시 매개체들의 직접적인 변화량을 정량적으로 측정하는 등의 연구 및 임상에서 백내장 수술 후 일반적으로 사용되고 있는 스테로이드 점안 약제와 TGF- β 억제 효과에 대한 비교 및 병용 효과에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 생각되며, 후낭혼탁 예방을 위한 점안액 첨가제로의 트라닐라스트의 활용 가능성이 기대된다.

참고문헌

- 1) Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992;37:73-116.
- 2) Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, Glynn RJ. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998;105:1213-21.
- 3) Sundelin K, Sjöstrand J. Posterior capsule opacification 5 years after extracapsular cataract extraction. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:246-50.
- 4) Linnola RJ, Werner L, Pandey SK, et al. Adhesion of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen type IV to intraocular lens materials in pseudophakic human autopsy eyes. Part 2: explanted intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:1807-18.
- 5) Maloof A, Neilson G, Milverton EJ. Selective and specific targeting of lens epithelial cells during cataract surgery using sealed- capsule irrigation. *J Cataract Refract Surg* 2003;29:1566-8.
- 6) Peng Q, Visessook N, Apple DJ, et al. Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 3: Intraocular lens optic barrier effect as a second line of defense. *J Cataract Refract Surg* 2000;26:198-213.
- 7) Ravalico G, Tognetto D, Palomba M, et al. Capsulorhexis size and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1996;22:98-103.
- 8) Apple DJ. Influence of intraocular lens material and design on postoperative intracapsular cellular reactivity. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000;98:257-83.
- 9) Trocme SD, Li H. Effect of heparin-surface-modified intraocular lenses on postoperative inflammation after phacoemulsification: a randomized trial in a United States patient population. *Heparin-Surface-Modified Lens Study Group. Ophthalmology* 2000;107:1031-7.
- 10) Gatineau D, Lebrun T, Le Toumelin P, Chaine G. Aqueous flare induced by heparin-surface-modified poly(methyl methacrylate) and acrylic lenses implanted through the same-size incision in patients with diabetes. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:855-60.
- 11) Nishi O, Nishi K. Effect of the optic size of a single-piece acrylic intraocular lens on posterior capsule opacification. *J*

- Cataract Refract Surg 2003;29:348-53.
- 12) Nishi O, Nishi K, Mano C, et al. The inhibition of lens epithelial cell migration by a discontinuous capsular bend created by a band-shaped circular loop or a capsule-bending ring. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998;29:119-25.
- 13) Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 2005;179:56-65.
- 14) Kim IY, Kim MM, Kim SJ. Transforming growth factor-beta : biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol* 2005;38: 1-8.
- 15) Wang M, Zhang JJ, Jackson TL, et al. Safety and efficacy of intracapsular tranilast microspheres in experimental posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:2122-8.
- 16) Platten M, Ho PP, Youssef S, et al. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 2005;310:850-5.
- 17) Lee JS, Shin YG, Jung JH, Oum BS. The effects of tranilast(R) on the cellular proliferation, collagen synthesis, and secretion of TGF-beta1 in bovine retinal pigment epithelial cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:1205-11.
- 18) Lee JS, Jung SC. The Effects of Tranilast gamma on the Cellular Proliferation and alpha-Smooth Muscle Actin Expression in the Cultured Keratocytes of Rabbit. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:668-74.
- 19) Lee JE, Han HJ, Lee JS, Oum BS. Effect of Tranilast on the Proliferation of Human Corneal Keratocytes in Vitro. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:510-20.
- 20) Song JS, Jung HR, Kim HM. Effects of topical tranilast on corneal haze after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:1065-73.
- 21) Bender L, Spalton DJ, Uyanonvara B, et al. POComan: new system for quantifying posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:2058-63.
- 22) Spiecker M, Lorenz I, Marx N, Darius H. Tranilast inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2002;62:856-63.
- 23) Suzawa H, Kikuchi S, Arai N, Koda A. The mechanism involved in the inhibitory action of tranilast on collagen biosynthesis of keloid fibroblasts. *Jpn J Pharmacol* 1992;60: 91-6.
- 24) Isaji M, Aruga N, Naito J, Miyata H. Inhibition by tranilast of collagen accumulation in hypersensitive granulomatous inflammation in vivo and of morphological changes and functions of fibroblasts in vitro. *Life Sci* 1994;55:287-92.
- 25) Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Yoshimura N. Inhibition by tranilast of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)-induced increase in vascular permeability in rats. *Life Sci* 1998;63:71-4.
- 26) Charng MJ, Wu CH. Transcriptional activation of p21 by Tranilast is mediated via transforming growth factor beta signal pathway. *Br J Pharmacol* 2006;147:117-24.
- 27) Kanada T, Shikita M, Tsuneoka K, et al. Effect of macrophage colony-stimulating factor on the function of resident peritoneal macrophages. *J Pharmacobiodyn* 1987;10:215-9.
- 28) Shin D, Minn KW. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:633-40.
- 29) Inglis JJ, Criado G, Andrews M, et al. The anti-allergic drug, N-(3',4'-dimethoxycinnamonyl) anthranilic acid, exhibits potent anti-inflammatory and analgesic properties in arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1428-32.
- 30) Cooper K, Young J, Wadsworth S, et al. Reduction of post-surgical adhesion formation with tranilast. *J Surg Res* 2007;141:153-61.
- 31) Ito S, Sakamoto T, Tahara Y, et al. The effect of tranilast on experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:691-6.
- 32) Chihara E, Dong J, Ochiai H, Hamada S. Effects of tranilast on filtering blebs: a pilot study. *J Glaucoma. J Glaucoma* 2002;11:127-33.
- 33) Wallenfang MR, Seydoux G. cdk-7 is required for mRNA transcription and cellcycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5527-32.
- 34) Bochar DA, Pan ZQ, Knights R, et al. Inhibition of transcription by the trimeric cyclin-dependent kinase 7 complex. *J Biol Chem* 1999;274:13162-6.
- 35) Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91.
- 36) Burbach GJ, Naik SM, Harten JB, et al. Interleukin-18 expression and modulation in human corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 2001;23:64-8.
- 37) Jiang HR, Wei X, Niedbala W, et al. IL-18 not required for IRBP peptide-induced EAU: studies in gene-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:177-82.
- 38) Nagai N, Ito Y, Okamura H. Involvement of interleukin 18 in cataract development in hereditary cataract UPL rats. *J Biochem* 2007;42:597-603.
- 39) Tobari I, Iwaki Y, Miyake K. Effect of tranilast eyedrops in preventing posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:1394-9.
- 40) Miyazawa Y, Iwaki Y, Yataka M, Tobari I. Effect of different concentrations of tranilast on posterior capsule opacification. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2001;105:442-6.
- 41) Wang M, Zhang JJ, Jackson TL, et al. Safety and efficacy of intracapsular tranilast microspheres in experimental posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:2122-8.
- 42) Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41: 961-4.

=ABSTRACT=

The Effectiveness of Tranilast in the Prevention of Posterior Capsular Opacity

Ho Young Kim, M.D.¹, Hyeon Il Lee, M.D., Ph.D.²,
Yeoun Sook Chun, M.D., Ph.D.¹, Jae Chan Kim, M.D., Ph.D.¹

Department of Ophthalmology, Chung-Ang University College of Medicine¹, Seoul, Korea
GM Eye Clinic², Seoul, Korea

Purpose: To evaluate the inhibitory effect of tranilast on the formation of posterior capsular opacity (PCO) after a cataract operation ex vivo and in a rabbit model.

Methods: A human lens epithelial cell line (B3) was treated with 0.005-0.1 mM tranilast. Cytotoxicity assessment and effective dosage determination of tranilast were performed using MTT assays. B3 cell lines were cultured in Eagle's minimal essential medium (EMEM) containing 20% FBS with different concentrations of tranilast, and morphological differences were observed. To investigate the effect of tranilast on cytokine production in B3 cell lines, cells were treated with 0.01 mM tranilast and expression profiles of cytokines were analyzed by RT-PCR. After performing phacoemulsification and intraocular lens implantation in 10 white rabbits, 0.5% tranilast eye drops were given 4 times per day, and the severity of PCO was evaluated bi-weekly using POComan for 8 weeks after the operation.

Results: Cell death was observed in the 0.05 mM tranilast-treated B3 cell lines, and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) was also observed in the 0.01 mM tranilast-treated B3 cell lines. TGF- β 1/2, IL-18, and CDK7 mRNA expression decreased in the 0.01 mM tranilast-treated B3 cell lines. Significant suppression of PCO formation was observed in rabbits treated with 0.5% tranilast eye drops 5 weeks post operative ($p < 0.05$).

Conclusions: The results from this study show that tranilast suppresses EMT through inhibition of TGF- β , IL-18, and CDK7 expression. The results suggest that tranilast can be used to prevent PCO formation after cataract surgery.

J Korean Ophthalmol Soc 2008;49(12):1981-1988

Key Words: Cytokine, Epithelial-mesenchymal transition, Lens epithelial cell lines, Posterior capsular opacity, Tranilast

Address reprint requests to Hyeon Il Lee, M.D., Ph.D.

GM Eye Clinic

#748-16 4F Samheung Bldg, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea

Tel: 82-2-546-4682, Fax: 82-2-546-5398, E-mail: fineview21@empal.com