

## 파클리탁셀과 시스플라틴에 의한 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화억제 효과

김이후<sup>1</sup> · 김대현<sup>2</sup> · 오중협<sup>1</sup>

인하대학교 의과대학 안과학교실<sup>1</sup>, 대성연세안과 의원<sup>2</sup>

**목적** : 수정체 상피세포를 후낭내 직접 배양시키는 capsular bag model에서 DNA 합성억제인 paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>)과 cisplatin (Cisplan<sup>®</sup>)이 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화억제에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

**대상과 방법** : DMEM에 우태혈청과 항생항균제를 첨가한 배양액만으로 배양한 대조군과 각각 1, 10, 100 nM 농도의 paclitaxel로 3분간 노출한 실험군 I, 각각 1, 10, 100  $\mu$ M 농도의 cisplatin 으로 3분간 노출한 실험군 II로 나누어 돼지수정체상피세포를 capsular bag model에 1주일간 배양한 후 형태학적변화와 전환분화 된 섬유아세포 수를 위상차현미경으로 비교하였다. 세포의 증식정도를 BrdU, PCNA를 이용하여 알아보고, 섬유아세포로의 전환분화를 확인하기 위해 콜라겐 Type IV을 Western blot으로 분석을 하였다. 또한 TUNEL method로 세포고사의 정도를 알아보았다.

**결과** : 100 nM 농도의 paclitaxel과 100  $\mu$ M 농도의 cisplatin에서 후낭내에 섬유아세포로 전환분화된 세포들의 수가 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. BrdU 및 PCNA 양성 표지세포와 Western blot 분석에서의 콜라겐 Type IV 발현이 투여한 paclitaxel과 cisplatin의 농도가 증가할수록 대조군에 비해 감소하였다. TUNEL 염색에서 보이는 세포고사체는 Paclitaxel과 Cisplatin의 농도증가에 따른 차이가 없었다.

**결론** : Capsular bag model에서 Paclitaxel과 Cisplatin은 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화를 억제함을 알 수 있었다.

〈한안지 49(2):319-332, 2008〉

레이저 후낭 절개의 문제점을 극복하기 위해 백내장 수술 후 전낭에 남은 소량의 수정체 상피세포의 증식을 mitomycin (MMC), 5-fluorouracil (5-FU), cyclosporin-A, Daunomycin, colchicines, imatinib, gefitinib 등의 항암제로 억제하려는 연구가 있었다.<sup>1-5</sup>

Legler et al<sup>1</sup>은 수토끼의 수정체낭에 colchicine을 투여하여 농도의 통계학적 차이는 없지만 후낭혼탁을 억제한다고 보고하였다. 국내에서는 Oh et al<sup>6</sup>은 콩과 식물에서 발견되며 항암제로 사용되는 genistein을

투여하여 돼지 수정체상피세포를 배양하고 증식의 정도를 알아보기 위해 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 및 fibronectin의 mRNA의 발현을 알아본 결과 수정체상피세포의 증식을 억제한다고 보고하였으며, Kim et al<sup>5</sup>은 MTT assay, BrdU 염색 그리고 western blot 등의 방법을 이용하여 만성골수성백혈병 치료제인 imatinib이 수정체상피세포의 증식과 성장인자 PDGF, bFGF, TGF- $\beta$ 2의 수정체상피세포에 대한 작용도 억제한다고 보고하였다.

하지만 기존의 연구는 수정체상피세포의 감소만을 측정하는 한계를 가지고 있다. 실제로 후낭혼탁으로 잔류된 수정체상피세포가 세포외기질의 분비 및 섬유아세포와 유사한 세포로 전환분화 되고 이들이 후낭으로 증식(proliferation) 및 이동(migration)되어 발생하기 때문에 수정체상피세포에서 섬유아세포로의 전환분화<sup>7,8</sup>를 억제하는 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 정상 수정체상피세포의 증식뿐만 아니라 후발성백내장 발생의 원인이 되는 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화를 Cisplatin과

〈접수일 : 2007년 4월 28일, 심사통과일 : 2007년 10월 31일〉

통신저자 : 오 중 협

인천시 중구 신흥동 3가 7-206

인하대학교병원 안과

Tel: 032-890-2400, 2418, Fax: 032-890-2403

E-mail: jhoh9707@hanmail.net

\* 본 논문의 요지는 2004년 대한안과학회 제92회 추계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

Paclitaxel이 억제할 수 있는지 정량적 방법으로 알아보고자 했다.

이러한 연구를 위하여, 수정체 낭이 유지되는 in vitro 상태의 capsular bag model에 BrdU, PCNA 면역형광염색을 하여 수정체상피세포의 증식이 억제되었는지를 확인하고 항암제인 Paclitaxel과 Cisplatin이 수정체 상피세포의 형태학적인 변화를 위상차 현미경으로 관찰하고 100배 하에서 한시아(field)당 세포 수를 측정하였으며, 이것이 western blot을 이용한 콜라겐 Type IV의 정량 분석을 통해 수정체상피세포가 섬유아세포로의 전환분화가 억제되었는지를 확인하고자 한다.

## 대상과 방법

### 1. Capsular bag 배양 model 제작 및 배양

도살 후 1시간 이내에 적출한 돼지안구를 10% 포타딘 액에 약 30분간 담궈 소독한 후 식염수로 소독하였다. 안구의 적도부를 Bard-Parker 11번 blade로 절개하고, 수술가위로 안구의 후극부를 제거한 후, 유리체를 제거하고 모양소체를 수정체낭 근처에서 절단하여 수정체를 적출하였다. 수술현미경하에서 전낭절개도(26 gauge hooked needle)로 직경 6 mm의 원형 수정체전낭절개술을 시행하고 평형생리식염수로 수력분리술을 시행하여 수정체 핵과 피질을 제거하고 깨끗이 세척한 후 수정체낭의 형태를 유지하기 위하여 직경 11 mm의 PMMA 재질의 수정체낭확장고리(tension ring: Lucid, Korea)를 삽입하여 capsular bag model을 만들었다. 배양액은 56°C 에서 30분간 열처리한 20% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, Grand Island, NY)과 1% 항생항균제(antibiotic-antimycotics, penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY)용액을 이용하였다. 조직 배양용기는 6 well plate를 이용하였고, 각각의 well에 수정체낭을 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 배양기(incubator, Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR)에서 1주일 동안 배양하였다.

### 2. Paclitaxel (Taxol®)과 Cisplatin (Cisplan®)

Paclitaxel (Taxol®, BMS, Korea)과 Cisplatin (Cisplan®, 동아제약, Korea)은 dimethylsulfoxide

(DMSO)에 표준농도  $1 \times 10^{-3}$  M로 녹여 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

### 3. 대조군과 실험군

대조군은 capsular bag model을 DMEM에 20% FBS와 1% 항생항균제를 첨가한 배양액만으로 6 well에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태로 배양한 군으로 정하였다. 실험군 I은 1, 10 및 100 nM 농도의 Paclitaxel으로 각 3분간 처리한 후 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline으로 1회 세척한 다음 배양액 3 ml를 넣어 일주일간 배양하였다. 실험군 II는 1, 10 및 100 µM 농도의 Cisplatin으로 각 3분간 처리한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline 으로 1회 세척한 다음 배양액 3 ml를 넣어 일주일 동안 배양하였다.

### 4. 수정체상피세포 증식정도의 관찰

위상차현미경(Phase contrast light microscope, Zeiss, Oberkochen, Portugal)을 이용하여 수정체 상피세포가 capsular bag model에서 방추형의 섬유아세포로 전환분화 되는 모습과 정도를 24시간 간격으로 관찰하였고, 배양 7일째 자라난 세포들의 field당 세포수를 계측하여 각 군 간의 차이를 비교하였다. 계산된 field당 세포 수는 Student-T test를 통하여 통계학적 유의성을 확인하였다. 조직절편을 만들 부분을 결정한 후에 광학 현미경 관찰을 위해 10% 중성 포르말린에 고정된 수정체낭과 수정체상피세포를 파라핀으로 포매하여 조직을 4 µm두께로 절편을 만들었다.

### 5. 면역조직화학적 연구방법을 이용한 수정체상피세포의 증식력 측정

#### 5. 1 BrdU 면역조직화학적 연구를 통한 세포증식정도 관찰

배양 7일째 각 실험군에서 세포증식의 정도를 파악하기 위해 BrdU 면역화학조직염색을 시행하였다. 상용화된 BrdU kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하였으며, 이를 실행하기 위하여 대조군과 각 실험군에 관찰하기 72시간 전, 48시간 전 및 4시간 전에 배양하던 배지에 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 3회 세척하였다. 그 다음 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer,

pH 7.4)로 30분간 고정한 후 washing buffer로 3회 세척하고 anti-BrdU 항체용액 1 ml를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 45분간 배양 후 fluorescein-labeled rabbit anti-mouse antibody를 첨가하였다. 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 30분간 배양 후 washing buffer로 세척하였다. 실온에서 약 15분간 건조시키고 medium mounting후 FITC (Fluorescein isothiocyanates) filter (450~500 nm)를 사용하여 형광현미경(Leica, DMLB, Germany)으로 관찰하였다.

## 5.2 PCNA 면역조직화학연구를 통한 세포증식정도 관찰

파라핀 포매 조직을 4 µm 두께로 잘라 poly-L-lysine coated glass slide에 부착시켜 하룻밤 동안 대기에서 건조시킨 후 PCNA kit (Zymed, San Francisco, USA)를 이용하여 통상적인 Avidin/Biotin immunoperoxidase 방법<sup>33</sup>으로 염색하였다. 조직절편은 xylene에서 탈 파라핀한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 순서대로 1분씩 방치시키어 탈 수시키고 증류수에 씻어낸 후 항원의 발현도를 높이기 위하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 1:50으로 희석한 PCNA 항체(Zymed, San Francisco, USA)로 절편을 도포해 실온에서 2 시간 동안 방치시킨 후 PBS로 세척하고 avidin/biotin immunoperoxidase로 도포하여 실온에서 30분간 방치시켰다가 PBS로 세척한 후 발색제(chromogen)로서 3-3'-diaminobenzidine (DAB)를 acetate buffer, 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 혼합하여 조직편에 가한 다음 증류수로 세척하였다. 관찰을 위하여 Mayer's hematoxylin에 3분간 대조염색 후 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 염색 결과의 판정은 숙련된 병리과 의사 1인에 의하여 염색된 각 조직을 광학 현미경 200배 시야에서 관찰하여 핵내에 적갈색의 미만성 혹은 과립상 염색이 있을 때 양성, 반응이 전혀 없는 경우를 음성으로 판정하였다.

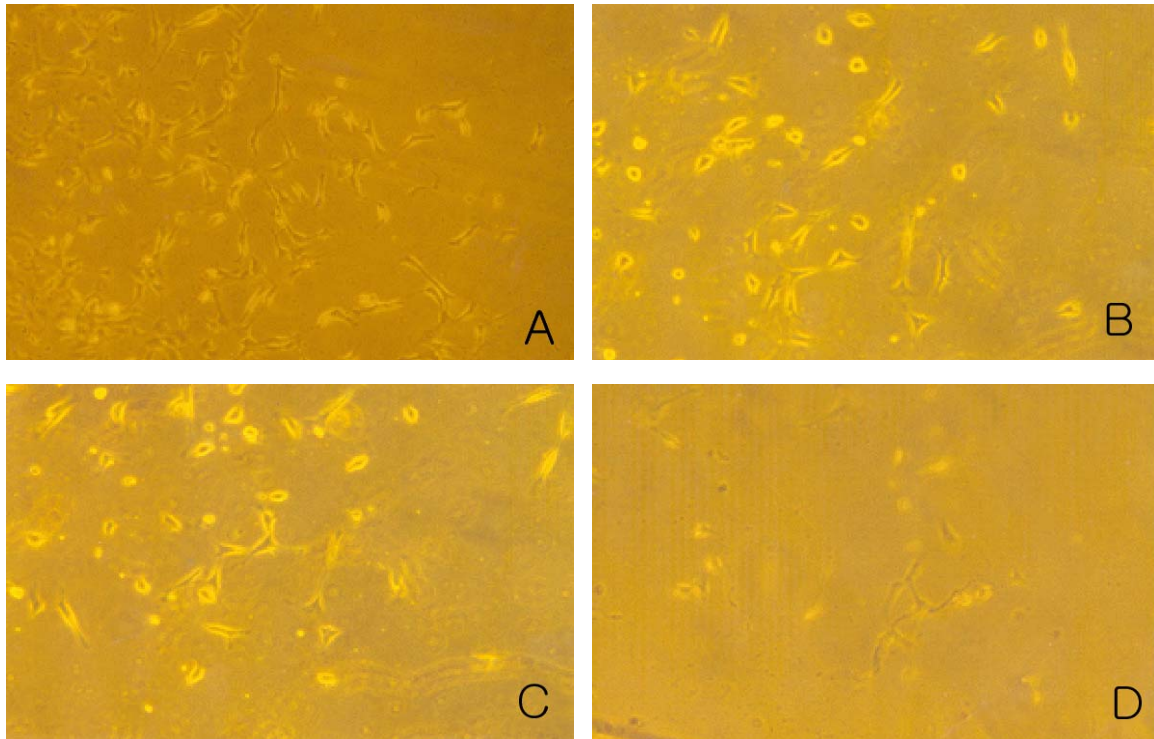
## 6. Western blot 분석을 통한 콜라겐 Type IV 생성에 대한 영향 관찰

배양 7일째 각 실험군의 capsular bag model에서 수정체낭 확장고리를 제거하고 1 ml의 lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.0 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 첨가 한 후 glass homogenizer에 넣고 마쇄하여 100,000 g에서 1 시간 동안 원심분리 후 상층액을 취하여 총 단백질을 추출하였다. 분리된 단백질을 protein assay kit

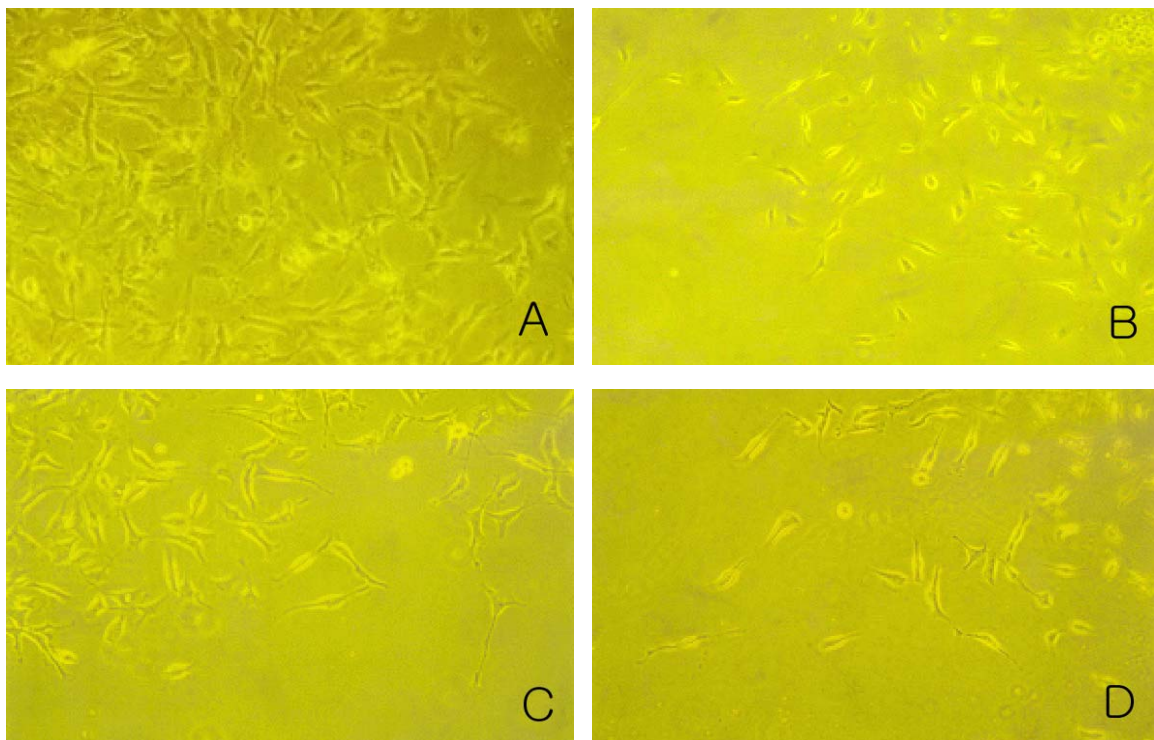
(Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용해 정량하고 20 µg의 단백질을 reducing buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophol blue)로 변형 후 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 transfer buffer (39 mM glycine, 48 mM Tris-HCL, pH 8.3, 0.037% SDS, 20% methanol)를 사용하여 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Richmond, CA)으로 100 mA에서 2 시간동안 이동시켰다. 콜라겐 Type IV에 대한 일차 항체로 mouse monoclonal anti-collagen type IV antibody (Sigma, USA)와 monoclonal anti-β actin (Sigma, St. Louis, MO)을 사용했으며 blocking buffer 1:1000으로 희석해서 사용했으며 24시간동안 반응시킨 후 Tris buffered saline/0.1% Tween 20 (TBST)로 10분간 2회, 0.5% blocking buffer로 10분간 2회 수세하였다. 반응한 일차항체를 검출하기 위하여 horseradish peroxidase가 결합된 이차항체를 0.5% blocking 용액에 1:2000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 TBST로 15분간 4 회 수세하고 luminol을 이용하여 용액으로 X-ray film을 15초간 감광시키고 현상액과 고정액으로 각각 1분간 처리하여 현상하였다.

## 7. TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase reaction) method를 이용한 세포고사(apoptosis) 관찰

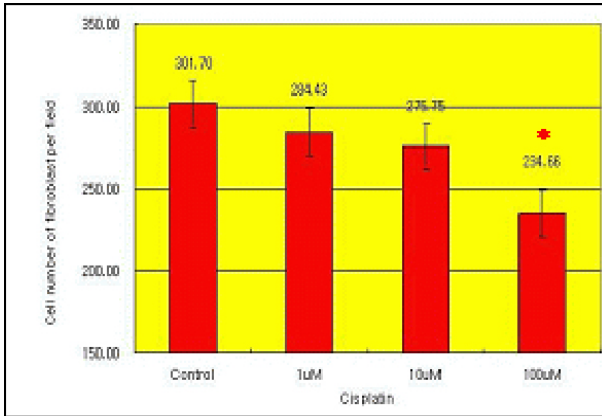
파라핀에 포매된 조직을 4 µm 간격으로 박절하여 만든 조직절편을 xylene에 5분 간격으로 2회 세척하고, 에탄올에 5분 간격으로 2회 세척 하였다. 이후 95%, 90%, 80%, 70%의 에탄올 순으로 각각 3분씩 세척하고 다시 PBS에 5분간 세척하였다. 20 µg/ml의 proteinase K를 슬라이드 위에 떨어뜨리고 실온에서 15분간 배양시킨 후 증류수로 2분간 4회 세척하였다. 페록시데이즈의 중화를 위하여 PBS로 희석하여 만든 2.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 실온에서 5분간 담가 놓은 후 PBS로 5 분간 2회 세척하였다. 그리고 두 방울의 중화버퍼를 조직 위에 떨어뜨린 후 플라스틱 커버을 덮고 실온에서 10~15초 배양하였다. 플라스틱 커버을 벗기고, 54 µl의 working strength TdT를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 플라스틱 커버을 덮은 뒤 37°C humidified chamber에 1시간 동안 배양하였다. 37°C에 맞춘 working strength stop/wash buffer가 담긴 coplin jar에 슬라이드를 넣고 15초간 흔든 뒤 플라스틱 커버을 제거하고 실온에서 10분간 배양하였다.



**Figure 1.** Morphological profiles of the transdifferentiated cells of the Paclitaxel-treated group (experimental group). Magnification: 200x. The group treated with 1 nM (B), 10 nM (C) and 100 nM Paclitaxel (D) showed slightly decreased cell number than control group (A).



**Figure 2.** Morphological profiles of the transdifferentiated cells in the Cisplatin-treated group (experimental group II). Magnification: 200x. The group treated with 1 μM (B), 10 μM (C) and 100 μM Cisplatin (D) showed slightly decreased cell number than control group (A).



**Figure 3.** The cell number of fibroblast per microscopic field during culture in experimental group I. The cell number was decreased by treatment of Paclitaxel in dose-dependent manner. \* Significant decrease of the cell number in 100 nM Paclitaxel-treated group. ( $p<0.05$ )

두 방울의 anti-digoxigenin-peroxidase를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 새로운 플라스틱 커버을 덮고 실온의 humidified chamber내에서 30분간 배양 시켰다. DAB (Diaminobenzidine hydrogen peroxidase) 용액을 조직이 충분히 덮히도록 떨어뜨리고 5분간 실온에서 반응시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였으며 400배 시야에서 양성으로 염색된 세포들의 수를 광학현미경으로 계측하였다.

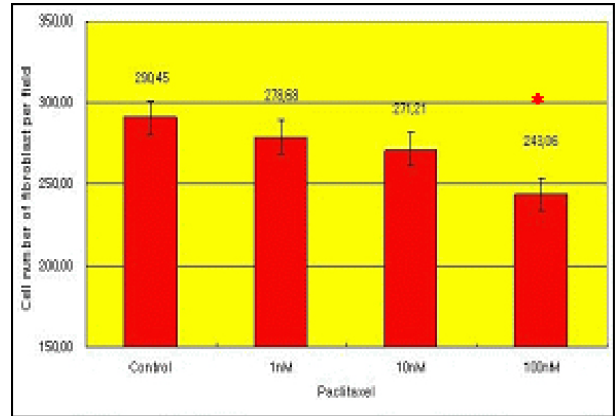
## 8. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 시행하였으며, 통계학적 분석은 실험을 통해 얻어진 모든 자료는 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 자료의 통계학적 의의를 확인하기 위해서는 Statistical Package For the Social Science (SPSS) program이 사용되었고 Student t-test를 이용하여 통계학적 유의성을 검증하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.

## 결 과

### 1. 수정체상피세포 증식정도의 관찰

대조군에서는 배양 24~48시간 후 시간이 지나면서 일부 후낭위에 세포들은 긴 방추형 모습을 나타내면서 시간이 지남에 따라 방추형의 모습을 만들었던 세포질 돌기가 점차 길어지면서 주위에 있는 세포의 세포질 돌



**Figure 4.** The cell number of fibroblast per microscopic field during culture in experimental group II. The cell number was decreased by treatment of Cisplatin in dose-dependent manner. \* Significant decrease of the cell number in 100 μM Cisplatin-treated group. ( $p<0.05$ )

기와 접하기 시작하였다. 이들 세포들은 전낭과 전낭절 개선 바깥부위의 후낭에서 관찰이 되다가 배양 3~5일째부터는 전낭절개선을 넘어선 범위의 후낭에서도 관찰되었다. 배양 7일째에는 후낭 중심으로의 증식이 더욱 많아졌으며, 일부 수정체낭에서는 후낭주름이 관찰되었고, 주름 주변에는 많은 양의 세포외기질이 쌓여 있는 모습이 보였다(Fig. 1, 3). Paclitaxel 1, 10 및 100 nM만 처리한 군(실험군 I)에서도 방추형의 세포가 관찰되었으나 처리한 Paclitaxel 농도에 비례하여 적은 수의 방추형 세포가 관찰되었다(Fig. 1). Cisplatin 1, 10 및 100 μM을 첨가한 군(실험군 II)에서도 대조군에 비하여 방추형세포가 원형전낭절개부위를 지나서 후낭 중심으로 덮어 들어가는 방추형의 세포 수가 Cisplatin의 농도에 비례하여 감소하였다(Fig. 2) 배양 7일째 각 군의 field를 8구획으로 나누어 세포수를 5번 측정하여 평균값을 구하였다. 그 결과 대조군에서는  $290.45 \pm 5.2$ 개, 실험군 I에서는 처리한 Paclitaxel의 농도에 따라  $278.68 \pm 7.2$ 개(1 nM),  $271.21 \pm 8.4$ 개(10 nM) 및  $243.06 \pm 7.6$ 개(100 nM)로 농도에 비례하여 감소하였으며, 특히 100nM Paclitaxel에 처리한 군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였다( $p<0.05$ )(Fig. 3). 실험군 II에서는 투여한 Cisplatin의 농도에 따라  $284.43 \pm 10.2$ 개(1 μM),  $275.75 \pm 8.5$ 개(10 μM) 및  $234.65 \pm 7.7$ 개(100 μM)이며 이는 Cisplatin 투여농도에 비례하여 감소되었으며 100 μM에서 통계적 유의성을 나타내었다( $p<0.05$ )(Fig. 4).



## 2. 면역조직화학적 연구방법을 이용한 수정체상피세포의 증식력 측정

### 2.1 BrdU 면역조직화화학연구를 통한 세포증식정도 관찰

BrdU 표지세포의 수가 많음으로 세포증식이 증가했음을 알 수 있으며, 증식을 하고 있는 세포의 핵만이 원형의 형광으로 나타나게 된다. 형광 현미경하에서 관찰한 결과 BrdU 표지세포의 수는 대조군에서는  $27.6.4 \pm 4.9$ 개, 실험군 I에서는 처리한 Paclitaxel의 농도에 따라  $19.4 \pm 4.2$ 개(1 nM),  $16.4 \pm 4.0$ 개(10 nM) 및  $8.6 \pm 2.8$ 개(100 nM)로 농도에 비례하여 감소하고 100 nM 농도에서는 특히 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었고( $p=0.023$ )(Fig. 5), 실험군 II에서는 투여한 Cisplatin의 농도에 따라  $22.2 \pm 4.1$ 개(1  $\mu$ M),  $14 \pm 4.7$ 개(10  $\mu$ M) 및  $11.2 \pm 2.9$ 개(100  $\mu$ M)로 농도에 비례하여 감소하며 특히 100  $\mu$ M 농도에서는 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었다( $p=0.043$ )(Fig. 6).

### 2.2 PCNA 면역조직화화학연구를 통한 세포증식정도 관찰

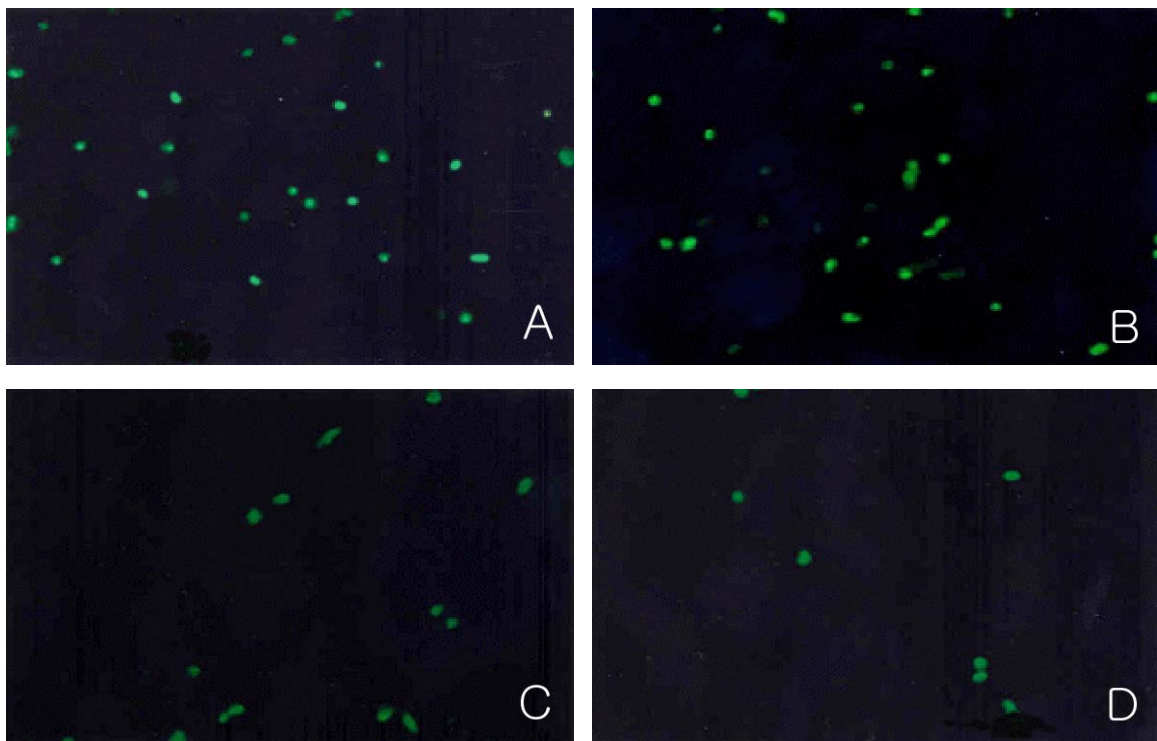
PCNA 면역조직화화학검사상 양성반응은 염색이 끝난 슬라이드를 200배 시야의 광학현미경으로 관찰하여 세포핵이 과립상의 적갈색으로 나타난 것으로 하였다.

형광현미경하에서 관찰한 결과 대조군에서는  $66 \pm$

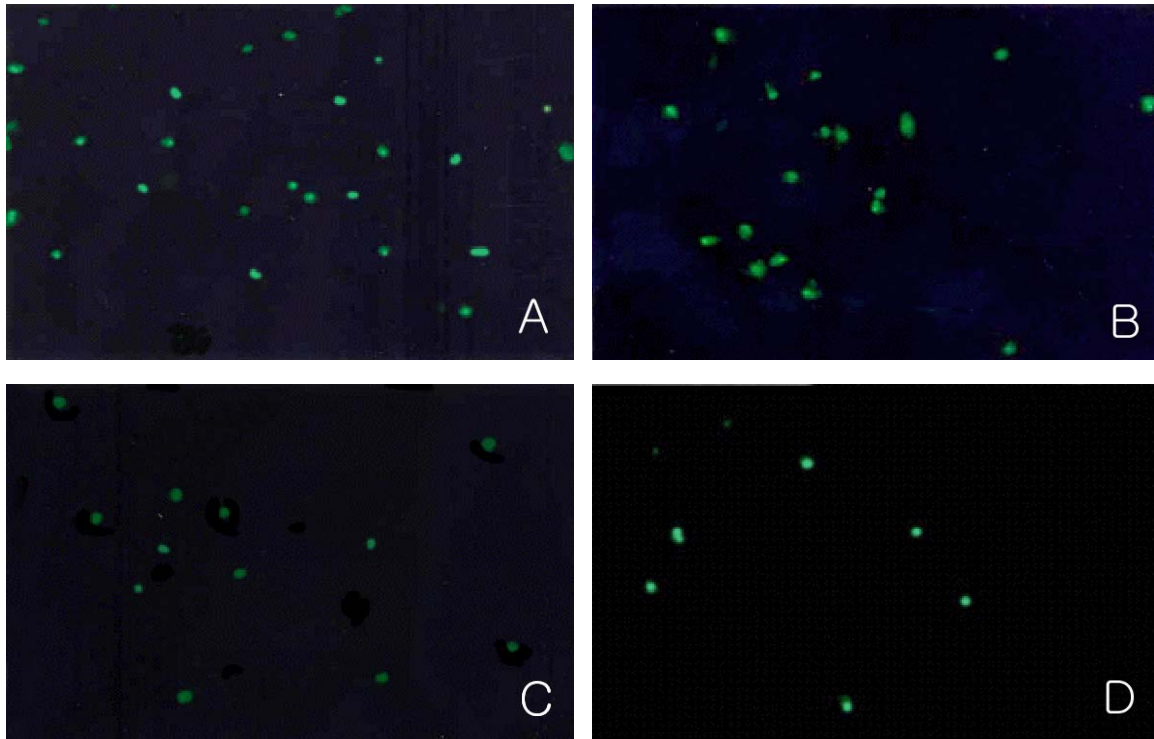
2.22%, Paclitaxel의 농도가 1, 10 및 100 nM로 증가함에 따라 PCNA 양성세포수가  $29 \pm 1.57\%$  ( $p=0.009$ ),  $25 \pm 1.56\%$  ( $p=0.01$ ),  $19 \pm 1.60\%$  ( $p=0.012$ )로 각각 감소하였고 Cisplatin에서도 농도를 1, 10 및 100  $\mu$ M 증가함에 따라 PCNA 양성세포수가  $27 \pm 2.10\%$  ( $p=0.02$ ),  $25 \pm 1.77\%$  ( $p=0.012$ ),  $16 \pm 1.90\%$  ( $p=0.009$ )로 각각 감소하였다(Fig. 7~10).

## 3. TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase reaction) method를 이용한 세포고사 관찰

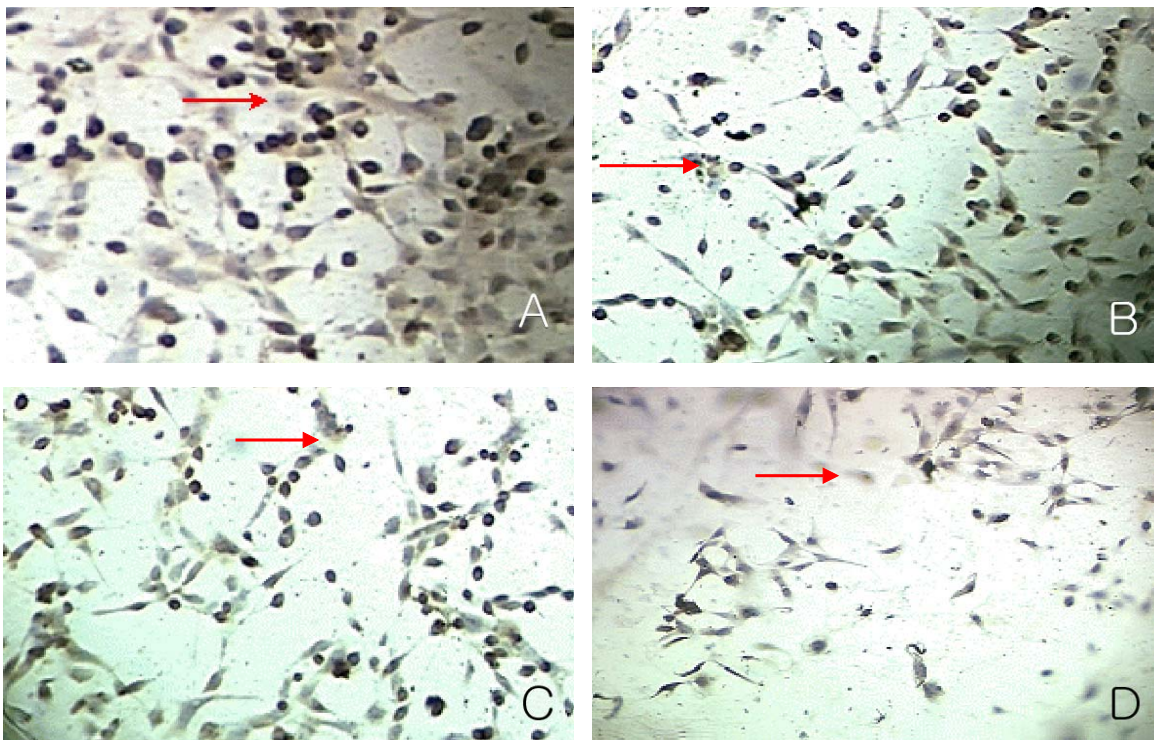
TUNEL method를 이용하여 세포고사 정도를 알아보았다. 세포고사를 일으키는 세포질이 원형의 형광으로 나타나게 된다. 형광현미경하에서 관찰한 결과 세포고사수는 대조군( $2.7 \pm 0.7$ 개)과 비교시, 처리한 Paclitaxel의 농도 1 nM에서  $2.5 \pm 0.2$ 개( $p=0.437$ ), 10 nM에서  $2.4 \pm 0.4$ 개( $p=0.311$ ), 100 nM에서  $2.5 \pm 0.3$ 개( $p=0.405$ )에 따라 큰 차이가 없었으며(Fig. 11), 실험군 II에서도 투여한 Cisplatin 농도 1  $\mu$ M에서  $2.7 \pm 1.0$ 개( $p=0.519$ ), 10  $\mu$ M에서  $2.8 \pm 0.1$ 개( $p=0.550$ ), 100  $\mu$ M에서  $2.6 \pm 0.7$ 개( $p=0.410$ )에 따라 큰 차이가 없었다(Fig. 12).



**Figure 5.** Immunocytochemical detection of the incorporated BrdU in the nuclei of proliferating cells at day 7 in experimental group I. Magnification: 200 $\times$ . The number of cells incorporated with BrdU in their nuclei decreased according to increasing concentrations of 1 nM (B), 10 nM (C) and 100 nM Paclitaxel (D) than control group (A).

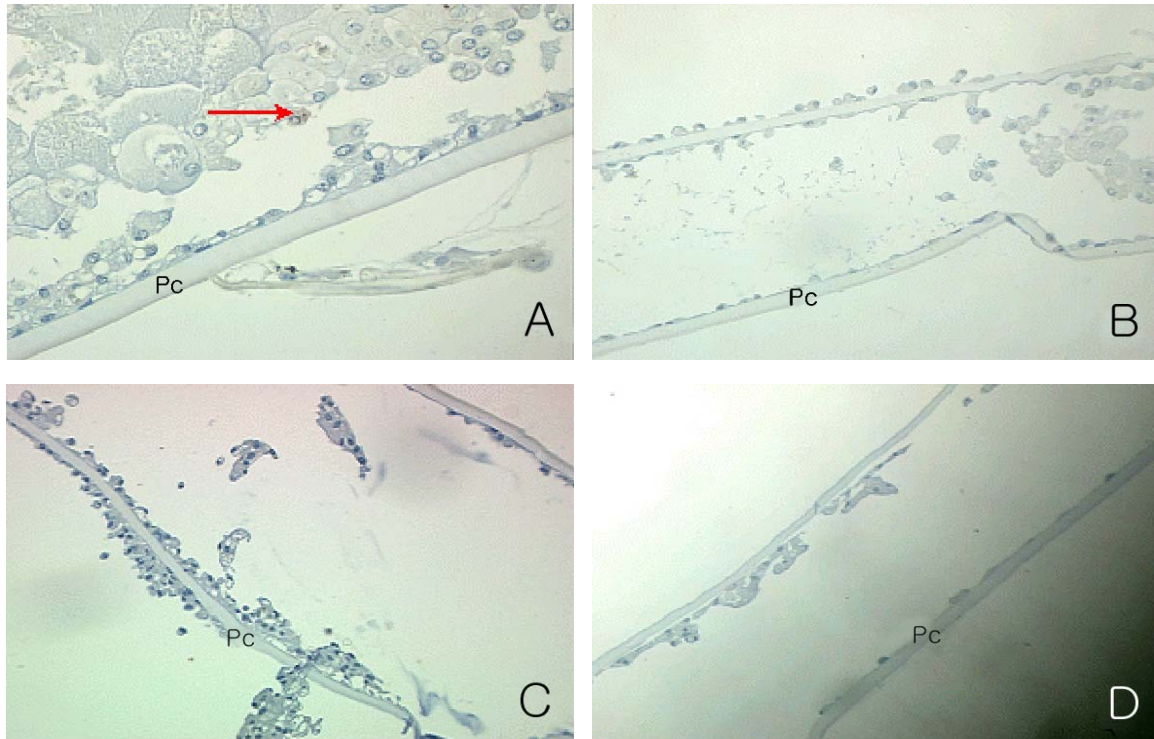


**Figure 6.** Immunocytochemical detection of the incorporated BrdU in the nuclei of proliferating cells at day 7 in experimental group II. Magnification: 200×. The number of cells incorporated with BrdU in their nuclei decreased according to increasing concentrations of 1  $\mu$ M (B), 10  $\mu$ M (C) and 100  $\mu$ M Cisplatin (D) than control group (A).

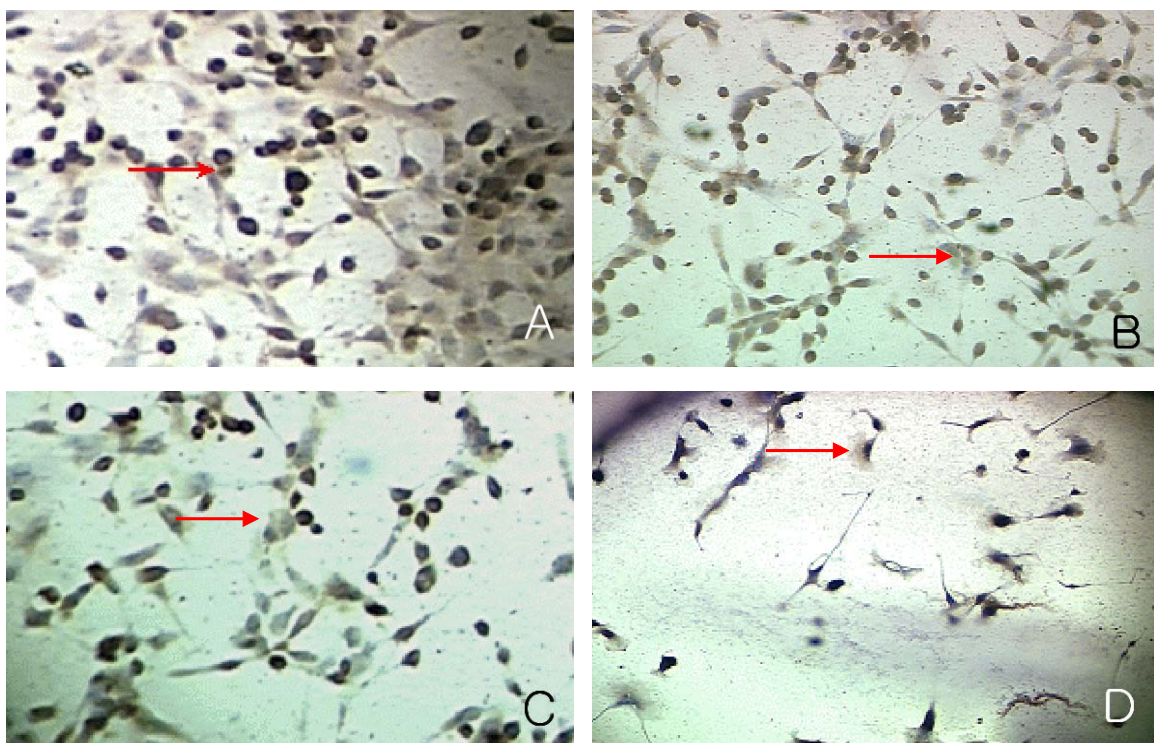


**Figure 7.** Immunocytochemical detection of the PCNA in the nuclei of proliferating cells at day 7 in experimental group I. Magnification: 200×. The number of PCNA positive cells decreased according to increasing concentrations of 1 nM (B), 10 nM (C) and 100 nM Paclitaxel (D) than control group (A).



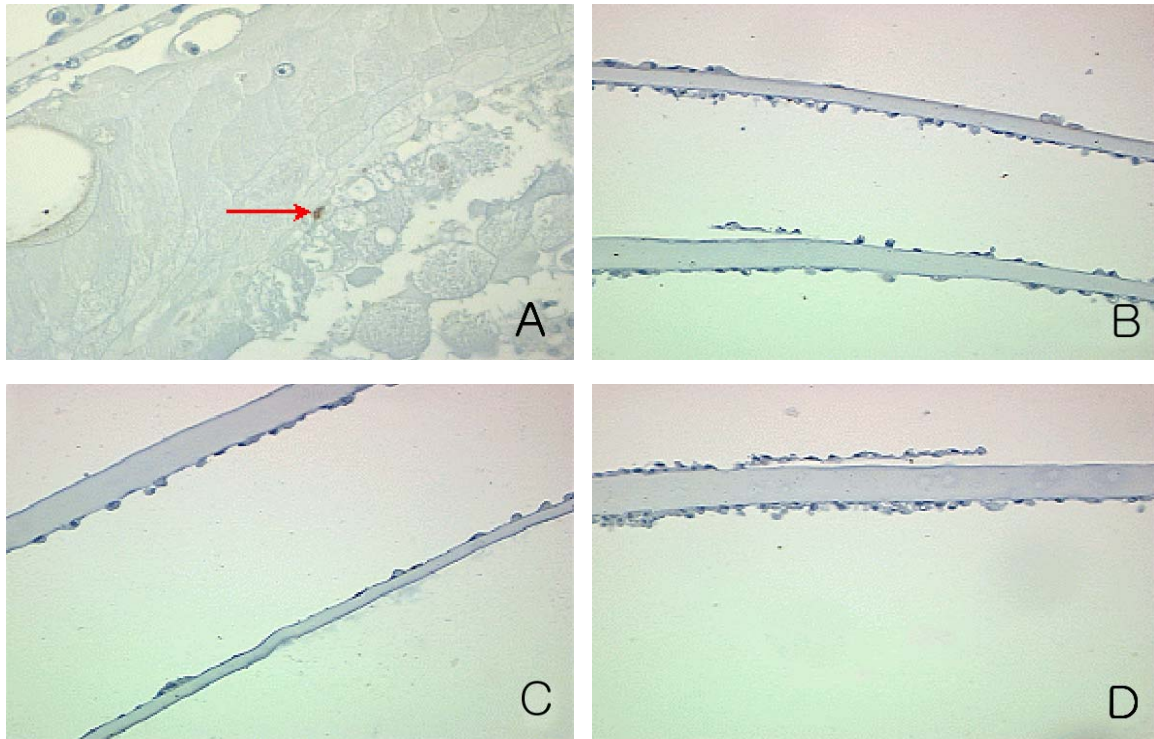


**Figure 8.** Immunocytochemical detection of the PCNA positive proliferating cells on the cross section of cultured capsular bag at day 7 in experimental group I. PCNA positive cell (red arrow, a reddish brown diffuse or granular nucleus staining) was noted in control (A) ( $\times 200$ ). PCNA positive cell was not noted in 1 nM (B), 10 nM (C) and 100 nM Paclitaxel (D) ( $\times 100$ ).

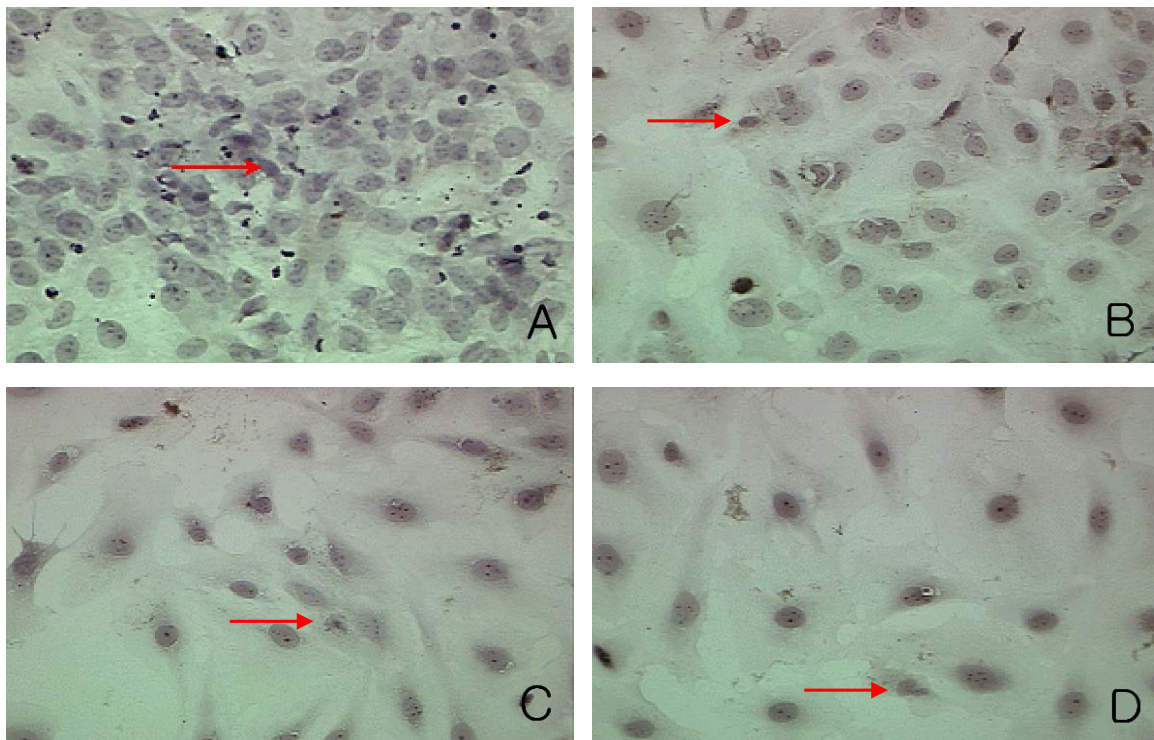


**Figure 9.** Immunocytochemical detection of the PCNA in the nuclei of proliferating cells at day 7 in experimental group II. Magnification:  $200\times$  The number of PCNA positive cells (a reddish brown diffuse or granular nucleus staining) decreased according to increasing concentrations of 1  $\mu\text{M}$  (B), 10  $\mu\text{M}$  (C) and 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (D) than control group (A).

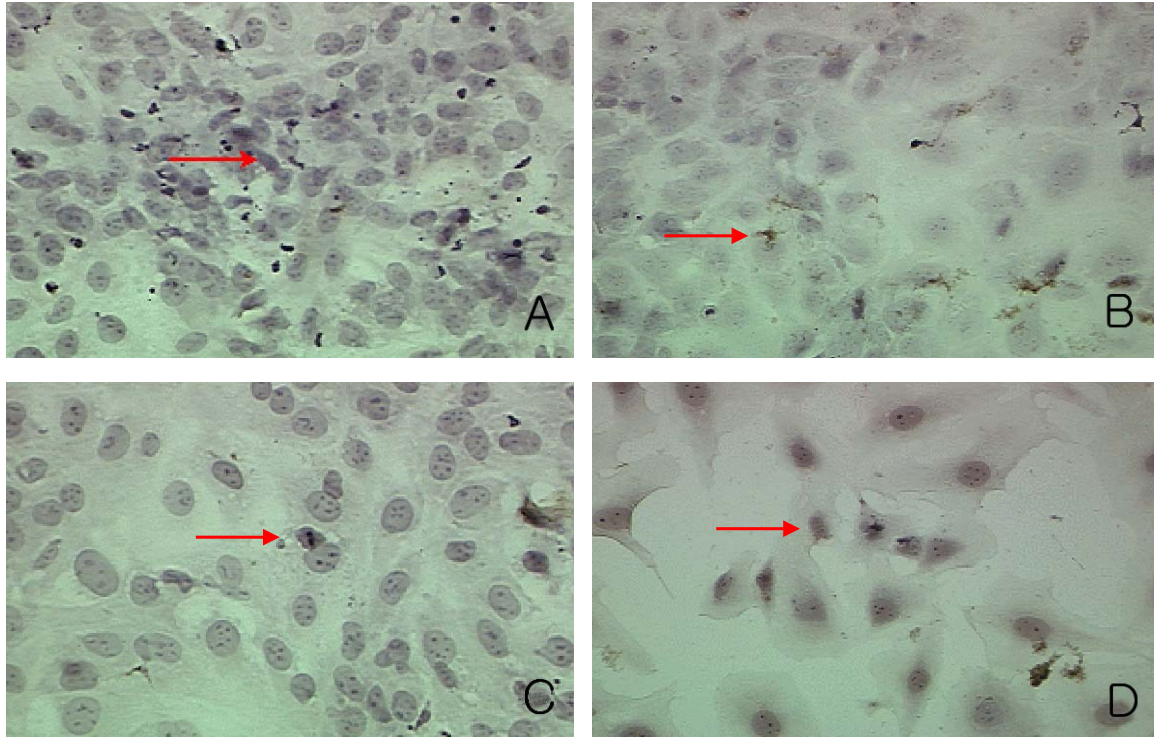




**Figure 10.** Immunocytochemical detection of the PCNA positive proliferating cells on the cross section of cultured capsular bag at day 7 in experimental group II. PCNA positive cell (red arrow) was noted in control (A) ( $\times 200$ ). PCNA positive cell was not noted in 1  $\mu\text{M}$  (B), 10  $\mu\text{M}$  (C) and 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin (D) ( $\times 100$ ).



**Figure 11.** TUNEL staining analysis in experimental group I. Magnification: 400x Apoptotic body (red arrow) was seen in control group (A). The number of apoptotic bodies showed no significant change according to increasing concentrations of Paclitaxel (1 nM (B), 10 nM (C), 100 nM (D)).



**Figure 12.** TUNEL staining analysis in experimental group II. Magnification: 400× Apoptotic body (red arrow) was seen in control group (A). The number of apoptotic bodies showed no significant change according to increasing concentrations of Cisplatin (1  $\mu$ M (B), 10  $\mu$ M (C), 100  $\mu$ M (D)).

#### 4. Western blot 분석을 통한 콜라겐 Type IV 생성에 대한 영향 관찰

배양 1주일째 Western blot 분석을 통해 콜라겐 발현의 정도를 비교한 결과 대조군에 비하여 투여한 Paclitaxel과 Cisplatin의 농도가 증가함에 따라 콜라겐 Type IV 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figs. 13, 14).

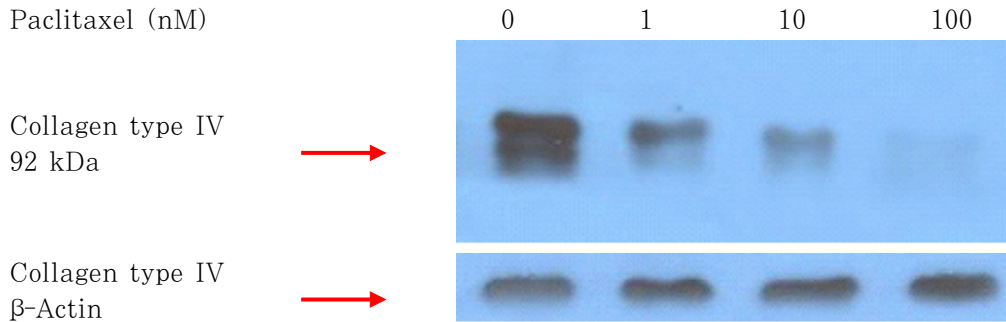
## 고 찰

수술 방법의 발달에도 불구하고 후발백내장은 지금까지도 백내장수술 후 가장 중요한 합병증이다. 후발백내장은 수술 후 시력 저하를 일으키는 중요한 원인이며 아직까지는 완벽한 예방이 불가능하다. 후낭혼탁은 백내장 수술 후 적도부에 남아있는 수정체상피세포의 증식과 이동에 의해 일어나게 되는데,<sup>7,8</sup> 아직까지 확실한 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 혼탁해진 후낭에는 fibronectin, type I, III, IV 콜라겐,  $\alpha$ -smooth muscle actin, TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ , - $\beta$ , interleukin-6 및 PDGF (platelet-derived growth factor) 등의 물질들이 많이 축적되어 있는데, Apple et al<sup>7</sup>은 염증매개인자, 사이토카인 및 성장인

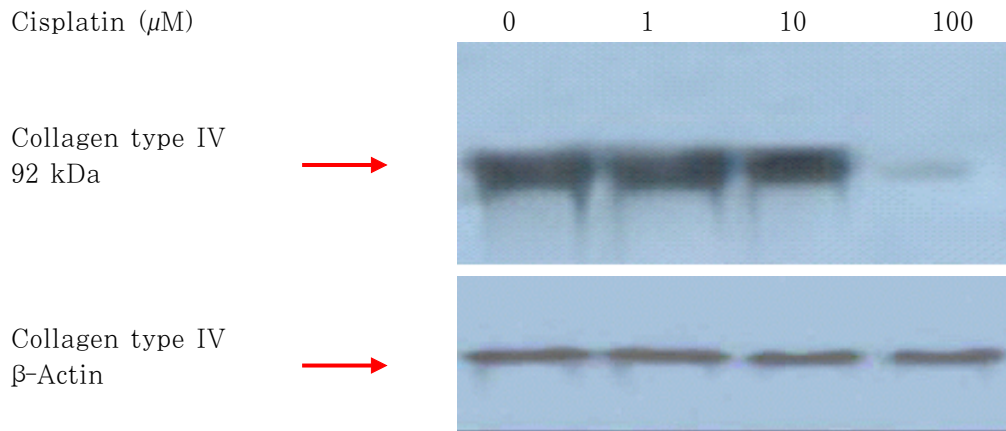
자의 분비와 활성화가 후낭혼탁 발생에 가장 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 Cobo et al<sup>8</sup>도 무리한 수술적 조작이나 염증 등으로 혈액방수장벽의 파괴가 일어나면 사이토카인의 분비가 활발해져 후낭의 혼탁이 더 잘 일어난다고 하였고, 사람 안구내의 bFGF (basic fibroblast growth factor)가 잔존하는 수정체상피세포의 증식에 중요한 역할을 하는데 나이가 증가함에 따라 이에 대한 반응이 감소하여 소아에서 후발백내장의 발생율이 높다고 하였다. 후낭혼탁의 예방을 위한 약물치료는 수정체상피세포의 부착, 이동, 증식 및 전환분화의 단계에서 억제 효과를 나타내는 것으로, DNA 등에 작용하여 세포독성을 나타내는 항대사성 약제는 수정체상피세포의 증식억제나 세포고사(apoptosis)를 일으켜 효과는 크지만, 각막내피세포 및 안구내 다른 조직에 대한 독성이 우려되어 임상적 적용의 어려움이 있다.<sup>9-11</sup>

본 연구에서는 plant alkaloid인 Paclitaxel과 alkylating agent인 Cisplatin을 이용하여 수정체상피세포의 증식억제 효과를 관찰하였다. Paclitaxel은 *Taxus brevifolia*의 주피(bark)에서 추출한 분자량 853.9KD의 diterpenoid taxane 유도체<sup>12</sup>로써 다른 천연 alkaloid와 달리 고유한 taxane ring을 가진다. 이 taxane ring과 ester side chain이 세포





**Figure 13.** Analysis of type IV collagen expression by Western blot in group I treated with Paclitaxel.



**Figure 14.** Analysis of type IV collagen expression by Western blot in group II treated with Cisplatin.

독작용을 가지고, 지용성이며 물에는 잘 녹지 않는다고 알려져 있다. 이 약물은 유방암, 난소암, 폐암, 두경부암, 위암 등 여러 종양에서 종양억제작용을 가지는데<sup>13,14</sup> 그 작용기전은 microtubule을 구성하는 두 가지 단백질(alpha-tubulin, beta-tubulin) 중 beta-tubulin과 결합하여 마이크로튜블의 형성을 촉진시킴으로써 세포주기 G2/M 기에서 마이크로튜블의 β-tubulin과 결합하여 세포분열에 필요한 microtubule의 network의 재구성을 막아 세포분열을 억제한다고 알려져 있다.<sup>15,16</sup> 스테드(TAXOL<sup>®</sup>)에 사용된 paclitaxel은 fibroblast와 Vascular smooth muscle cells 등을 억제하여 조직의 재생을 막는다.<sup>17,18</sup> 스텐드에는 Paclitaxel이 폴리머 형태로 코팅되어 있어 삽입 후 조직이 재생되어서 심혈관 협착이 재발하는 것을 막는데 널리 사용중에 있다. 유전자 독성을 가진 항암제로 널리 쓰이는<sup>19</sup> Cisplatin (cis-diammine dichloro-platinum)은 백금(Platinum)을 함유한 중금속 무기화합물로서<sup>20,21</sup> DNA strand 상에서 인접한 guanine 및 cytosine과 결합하여 기존에 연구된 항암제와 다른 기전인 DNA strand 상에서 interstrand cross-linking을 형성하여 DNA 합성을 억제한다.<sup>22-24</sup> 또한 면역억제<sup>25-27</sup> 및 돌연변이 유발성질<sup>28</sup>을 가지는 것으로

보고되었다.

본 연구에서는 기존에 in vitro에서 연구되었던 효과적인 농도의 범위 내에서(Paclitaxel : 1~100 nM, Cisplatin : 1~100 μM) 실제 수술 중 적용 가능한 시간인 3분간으로 한정하여 처리한 후 수정체상피세포의 증식억제 여부를 관찰하였다. 세포의 증식력을 검사하는 방법은 TLI (H3-thymidine labeling index), 유세포분석기를 이용한 S-기 fraction 측정, MI (mitotic count), PCNA 면역염색, Ki-67면역염색, BrdU 라벨색인등 여러 가지 검사방법이 있다. 이러한 방법들은 각각 그 측정방법 및 장비 그리고 소요시간 등의 장단점으로 인해 현재 각 기관마다 다양하게 적용하고 있다. PCNA는 세포주기 중 S기 후기부터 G2기에 걸쳐 합성되는 단백질로서 세포의 증식력을 나타내는 표지자로 간주되고 있으며,<sup>29</sup> PCNA에 대한 단클론 항체가 개발되어 면역조직화학적 염색이 가능해지고 검사가 간단하고 비용이 적게 든다. 또한 이 방법은 파라핀 포매에서도 검사가 가능하기 때문에 후향적 검사가 가능하다는 장점이 있어<sup>30</sup> 여러 암에서 종양의 PCNA 발현양상에 따른 환자의 예후와의 상관성에 대하여 많은 연구결과들이 보고되고 있다. PCNA가 BrdU 와 같은 세포증식을 나타내는 다른 표지자와



높은 연관성을 가지고 있다는 것이 임상 및 실험연구에서 증명되었다.<sup>31,32</sup> 이에 본 연구에서는 BrdU incorporation, PCNA 면역염색법을 이용하여 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화 정도를 관찰하였는데, Paclitaxel과 Cisplatin의 농도가 증가함에 따라 형광 표지가 된 수정체상피세포의 수가 현저히 감소하였고, PCNA 양성세포 수 또한 감소되어 세포의 증식 및 전환분화가 효과적으로 억제되었음을 알 수 있었다. TUNEL assay를 이용하여 세포의 고사정도를 관찰한 바, Paclitaxel과 Cisplatin의 농도에 따라 세포고사체의 수가 차이가 없게 나타남으로써 수정체상피세포의 감소가 약물의 세포에 대한 독성으로 인한 것임을 배제할 수 있었다.

결론적으로 Paclitaxel과 Cisplatin 두 가지 약물은 in vivo와 유사한 형태인 capsular bag model에서 나타나는 수정체상피세포의 섬유아세포로의 전환분화를 억제한다는 것을 알 수 있었고, 이와 같은 결과를 볼 때 Paclitaxel과 Cisplatin을 수술 중에 사용하거나 인공수정체에 폴리머 형태로 코팅하여 백내장 수술 후 나타나는 후발백내장의 예방을 위해 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 임상적용을 위해서는 각막내피세포 및 홍채 등에 대한 독성검사와 vivo study가 추가로 필요할 것이다.

## 참고문헌

- Legler UF, Apple DJ, Assia EI, et al. Inhibition of posterior capsule opacification: The effect of colchicine in a sustained drug delivery system. *J Cataract Refract Surg* 1993;19:462-70.
- Pandey SK, Cochener B, Apple DJ, et al. Intracapsular ring 5-fluorouracil delivery system for the prevention of posterior capsule opacification in rabbit. *J Cataract Refract Surg* 2002;25:139-48.
- Jordan JF, Kocioc N, Grisanti S. Specific feature of apoptosis in human lens epithelial cells induced by Mitomycin C in vitro. *Greafes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:613-8.
- Park TS, Tea JS, Park SM, Oh JH. Inhibitory effects of imatinib mesylate on transdifferentiation of lens epithelial cells into fibroblast. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:257-70.
- Kim SJ, Byun GD, Tae JS, et al. The Effect of Imatinib (Glivec) on The Proliferation of Lens Epithelial Cells and The Activities of Growth Factors. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:2637-51.
- Oh JH, Byun KD, Yun YS. Inhibitory effect of genistein on the proliferation of lens epithelial cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2001;42:865-77.
- Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, et al. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* 1992;37:73-116.
- Cobo LM, Ohsawa E, Chandler D, et al. Pathogenesis of capsular opacification after extracapsular cataract extraction: An animal model. *Ophthalmology* 1984;91:857-63.
- Bertelmann E, Kojetinsky C. Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:35-40.
- Kim HG, Kang TJ, Lee SK, Bae JH. A study on mitomycin C induced damage to the iris and ciliary body of cats. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;36:486-91.
- Do SJ, Kang SJ, Lee JH, et al. The Effect of the Remnants after Cataract Extraction on the Lens Epithelial Cell Culture. *J Korean Ophthalmol Soc* 2002;43:872-82.
- Caplow M, Shanks J, Ruhlen R. How taxol modulates microtubule disassembly. *J Biol Chem* 1994;269:23399-402.
- Mekhail TM, Markman M. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:755-66.
- Kuhn JG. Pharmacology and pharmacokinetics of Paclitaxel. *Ann Pharmacother* 1994;28:15-7.
- Miranda S, Malan Borel I, Margni R. Altered modulation of the in vitro antibody synthesis by placental factors from the CBA/J x DBA/2 abortion-prone mating combination. *Am J Reprod Immunol* 1998;39:341-9.
- Joel GH, Lee EL, Alfred GG. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th ed. U S A McGraw-Hill, 2001;1260-1.
- Scheller B, Hehrlein C, Bocks W, et al. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 2006;355:2113-24.
- Lansky AJ, Costa RA, Mintz GS, et al. Non-polymer-based paclitaxel-coated coronary stents for the treatment of patients with de novo coronary lesions: angiographic follow-up of the DELIVER clinical trial. *Circulation* 2004;109:1948-54.
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-93.
- Novakova O, Vrana O, Kiseleva VI, Brabec V. DNA interaction of antitumor platinum (IV) complexes. *Eur J Biochem* 1995;228:616-24.
- Rozenzweig M, Von Hoff DD, Muggia FM. Investigational chemotherapeutic agents in head and neck cancer. *Semin Oncol* 1977;4:425-9.
- Fichtinger-Schepman AMJ, van Oosterom AT, Lohman PHM, Berends F. Cis-diammine-dichloroplatinum (II) - induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diammine-dichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1987;47:3000-4.
- Bernal-Mendez E, Boudvillan M, Gonzalez-Vilchez F, Leng M. Chemical versatility of transplatin monofunctional adducts within multiple site-specifically platinated DNA. *Biochemistry* 1997;36:7281-7.
- DeVita VT Jr, Hubbard SM. NCI's breast cancer clinical alert: rationale and results. *Resid Staff Physician* 1989;15:35:49-55.
- Berenbaum MC. Immunosuppression by platinum diamines. *Br J Cancer* 1971;25:208-11.

- 26) Khan A, Hill JM. Suppression of graft-versus-host reaction by cis-platinum. II. Diaminodichloride. Transplantation 1972;13:55-7.
- 27) Brambilla G, Cavanna M, Maura A. Effect of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) on the allograft reaction in mice. Cancer Chemother Rep 1974;58:633-6.
- 28) Beck DJ, Brubaker RR. Mutagenic properties of cis-platinum(II) diammino-dichloride in Escherichia coli. Mutat Res 1975;27:181-9.
- 29) Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 1986;166:209.
- 30) Tahan SR, Neuberg DS, Dieffenbach A, Yacoub L. Prediction of early relapse and shortened survival in patient with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. Cancer 1993;71:3552.
- 31) Tinnemans MMFJ, Lenders MHJH, Ten Velde GP. Evaluation of proliferation parameters in in vivo bromodeoxyuridine labelled lung cancers. Virchows Arch 1995;427:295-301.
- 32) Keng PC, Siemann DW. Measurement of proliferation activities in human tumor models: A comparison of flow cytometric methods. Radiat Oncol Invest 1998;6:120-7.

**=ABSTRACT=**

## **Inhibitory Effects of Paclitaxel and Cisplatin on Transdifferentiation of Lens Epithelial Cells into Fibroblast**

**Lee Hoo Kim, M.D.<sup>1</sup>, Dae Hyun Kim, M.D.<sup>2</sup>, Jung Hyub Oh, M.D.<sup>1</sup>**

*Department of Ophthalmology, Inha University, College of Medicine<sup>1</sup>, Incheon, Korea  
Eye Yonsei Clinic, Pucheon<sup>2</sup>, Gyeonggi, Korea*

**Purpose:** This study investigated the inhibitory effects of Paclitaxel by altering tubulin assembly and cisplatin exposure by binding DNA of the lens epithelial cells (LECs) during epithelial cell cultures in the capsular bag model.

**Methods:** In the capsular bag model, the LECs were cultured with exposure to Paclitaxel (1, 10, 100 nM) and Cisplatin (1, 10, 100  $\mu$ M) for 3 min. The effect of Paclitaxel and Cisplatin was analyzed by observing the cell number of fibroblasts per field, Western blots for type IV collagen, TUNEL assay and the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporated proliferating cells.

**Results:** An increase in concentration of Paclitaxel and Cisplatin resulted in a decrease in the number of fibroblasts and spindle-shaped cells. The number of proliferating cells showing PCNA positivity and BrdU incorporation in the nuclei was decreased in a dose dependent manner by treatments of Paclitaxel and Cisplatin. Expression of type IV collagen also decreased after treatment with these two agents. Results of the TUNEL assay showed no change in the apoptosis of cells with regard to an increase in concentration of Paclitaxel and Cisplatin.

**Conclusions:** This study showed inhibitory effects of Paclitaxel and Cisplatin on the proliferation and transdifferentiation of LECs into fibroblasts using the capsular bag model.

J Korean Ophthalmol Soc 49(2):319-332, 2008

**Key Words:** Capsular bag model, Cisplatin, Fibroblast, Paclitaxel, Transdifferentiation

---

Address reprint requests to **Jung Hyub Oh, M.D.**

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Inha University

#7-206 3-ga, Shinheung-dong, Jung-gu, Incheon 400-103, Korea

Tel: 82-032-890-2400, 2418, Fax: 82-32-890-2403, E-mail: jhoh9707@hanmail.net