

항히스타민/비만세포 안정화 복합제제의 결막세포에 대한 효능 비교

김수진¹ · 윤태진² · 이지은¹ · 이종수¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 울산신세계 안과의원²

목적: 항히스타민/비만세포 안정화 복합제제들이 봄철각결막염 환자의 결막 세포에 미치는 영향을 비교하고자 하였다.
대상과 방법: 배양된 봄철각결막염 환자의 결막 세포에 SCD-P101(Fexofenadine), Patanol[®], Zaditen[®], Azelan[®]을 접촉시킨 후 세포의 대사력, 프로콜라겐, 라미닌 및 사이토카인을 비교하고, 약제독성을 알아보고자 젖산탈수소효소(LDH)의 역가를 측정하고, 결막세포의 형태학적 변화를 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다.
결과: MTT 분석법상 SCD-P101은 대사력이 유지되었으나, 다른 3약제는 활성도가 감소하였다. 모든 약제에서 콜라겐, 라미닌, IL-6 및 IL-8은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였고, TNF-β변화는 거의 없었다. Zaditen[®]과 Azelan[®]에 비해 SCD-P101, Patanol[®]에서 LDH 역가가 낮게 측정되는 경향을 보였고, 세포의 형태학적 손상이나 부종도 경미하게 관찰되었다.
결론: 항알레르기점안약 중 세포대사 활성도는 SCD-P101가 가장 좋은 경향을 보였고, 결막세포에 미치는 손상의 정도는 Zaditen[®], Azelan[®]에 비해 SCD-P101, Patanol[®]이 적은 경향을 보였다.
(대한안과학회지 2010;51(3):406-417)

알레르기결막염은 꽃가루나 애완동물의 털, 분비물, 집먼지진드기 등의 항원이 눈물에 용해된 후 결막에 있는 비만세포 표면에 부착되어 있는 IgE와 반응함으로써 발생하는 과민반응으로 눈에 발생하는 알레르기질환 중 가장 흔한 형태이다.¹⁻³ 이러한 알레르기결막염을 치료하는데 있어 가장 중요한 것은 원인 항원을 제거하는 것이나 실제 원인 항원으로부터 완전히 회피하는 것은 불가능한 일이기 때문에, 임상적으로 알레르기결막염을 치료하기 위해 여러 항알레르기점안약이 흔히 사용되고 있다. 알레르기결막염에 사용되는 약제들로는 혈관수축제, 경구용 및 점안용 항히스타민제, 비만세포 안정제, 항히스타민/비만세포안정제 복합제제, 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDS)와 스테로이드제제, 면역억제제 등이 있다.^{4,6}

최근에 널리 사용되는 알레르기점안약으로는 Azelastine hydrochloride 0.05% (Azelan[®], Taejoon, Korea), Ketotifen

fumarate 0.025% (Zaditen[®], Novartis, USA), Olopatadine 0.1%(Patanol[®], Alcon, USA) 등이 있고, 세 가지 약제는 공통적으로 항히스타민과 비만세포 안정화 작용을 가지고 있다. Fexofenadine 또한 항히스타민과 비만세포 안정화 역할을 가지고 있는 복합제제로 알려져 있지만 국내에서는 아직 상업적으로 생산이 되고 있지 않아, 기존의 항히스타민/비만세포 안정화 복합제제들과의 임상적 연구는 아직 없다. 이에 저자들은 새로운 약제인 SCD-P101 (Fexofenadine, 삼천당, Korea)과 기존에 사용하고 있던 항알레르기점안약인 Patanol[®], Zaditen[®], Azelan[®]과의 결막세포에 미치는 영향 및 독성효과를 비교하고자, MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 측정, procollagen type I 생성 및 염증성 사이토카인의 생성 여부, lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay를 각각 시도하고, 결막세포의 형태학적 변화를 광학 현미경 및 전자현미경으로 관찰하였다.

대상과 방법

세포배양과 처치

봄철각결막염 환자의 동의하에 결막조직을 채취하여 transfer media에 담아 실험실로 옮긴 후 25 cm² flask에 배양시켰다. 2×2 mm의 크기로 결막조직을 절제한 후 배양접시에 외이식법으로 배양하였는데, 배양액으로는 10%

■ 접수 일: 2009년 5월 27일 ■ 심사통과일: 2009년 9월 15일

■ 책임저자 이종수

부산광역시 서구 아미동 1-10
부산대학교병원 안과
Tel: 051-240-7323, Fax: 051-242-7341
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2009년 대한안과학회 제102회 추계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

송아지 혈청(Gibco, USA)을 첨가한 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Gibco, USA)을 사용하였고, 감염예방을 위해 50 µg/ml gentamicin, 2 µg/ml fungizone을 첨가하였다. 37°C 온도에서 5% CO₂-95% air의 보육기 (NAPCO model 5100, USA)에서 결막세포를 3일간 배양하였다. 세포가 충분히 자랐을 때(confluence), 배지를 완전히 제거하고 0.25% trypsin-0.02% EDTA를 처리하여 세포를 배양접시로부터 분리시킨 후, 배양액을 약 5cc 정도 넣고 피펫으로 바닥면에 부착된 세포를 분리시켰다. 결막세포가 배양접시에서 완전히 이탈되면, 새로운 조직배양접시에 분리된 세포가 포함된 배양액을 약 1cc 넣고 신선한 배양액을 약 2cc 첨가시켜 세포를 재 배양시켰다. Coulter counter로 세포수를 측정하여 배양액에 결막세포 5×10³ cell/ml 이 되도록 부유 시킨 다음, 96 well plate에 200 µL 씩 심은 후 37°C 5% CO₂-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 이때 세포수가 너무 짊짊할 경우 각 약물에 의한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 결막세포가 80~90% 정도 성장할 때까지 4~5일 정도 배양시켰다.

MTT 분석법을 사용한 세포의 대사 활성도 측정

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, 노란색의 tetrazolium salt가 세포내 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것으로, 생존하고 있는 세포 즉 대사작용이 왕성한 세포를 흡광도를 이용해서 측정하는 방법이다.⁵

Subconfluence에 도달한 cell을 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)로 1회 세척한 후 항알레르기약제를 4시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 결막세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물처리 후 24시간 정도 세포 배양기에 넣어 배양한 다음 MTT assay를 실시하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로는 Balanced salt solution (BSS)를 사용하였고, Dulbecco's modified Eagles's medium 배지(DMEM: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 세포를 배양하여 세포대사능력을 측정하였다.

세포의 흡광도를 측정하기 위해 5 mg의 MTT solution을 PBS 1 ml에 녹인 후 0.2 µL syringe filter로 거른 다음

DMEM 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배양액을 140 µL 정도 제거한 후 MTT solution을 100 µL 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층액을 110 µL 제거한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide: Sigma, Cat. D-5869, St. Louis, USA)를 100 µL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이러한 과정들을 3회 반복하여 각 농도와 노출 시간별로 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×100으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩 시도하여 각 군과의 통계학적 유의성을 비교하였다(Student's *t*-test, *p*<0.05).

교원질의 전구물질인 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP) 생성 비교

봄철각결막염 환자의 경우 결막조직에서 생성되는 교원질의 양이 많기에, 항알레르기약제를 사용한 후 교원질의 전구물질 생성 정도를 비교하기 위해 procollagen type I C-peptide EIA kit (Takara bio inc, Tokyo, Japan)을 이용하여 프로콜라겐1형의 농도를 측정하였다. 24 well plate에 well당 1×10⁴ cells/ml을 심은 후 충분히 자랄 때까지 4일정도 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS를 이용하여 세척하였다. 네 가지 항알레르기약제를 10%, 20%농도로 1시간, 4시간 접촉시킨 후 상층액을 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 신선한 DMEM 배지를 첨가하여 24시간 배양한 뒤 배지를 채취하여 -80°C에 보관하였다. 세포층은 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.2)가 함유된 PBS 0.5 ml로 추출하여 세포 추출물을 -80°C에 보관하였다. 각 배양배지와 세포추출물의 PIP의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

Laminin의 생성 비교

Laminin은 세포의 기저막을 구성하는 당단백질로서, 세포 부착 및 성장에 관여하며 알레르기환자에서 증가되어 있다. 항알레르기약제를 사용한 후 Laminin의 생성 정도를 비교하기 위해 Laminin EIA kit (Takara bio inc., Tokyo, Japan)를 이용하였다. 4가지 약제를 10%, 20%의 비율로 1시간, 4시간 노출시킨 sample을 각각 100 µL 씩 well에 옮

기 고 혼합한 후 알루미늄 호일로 싸고 25°C에서 1시간동안 반응시켰다. Sample이 담긴 well을 washing buffer 400 ul로 3번 씻어낸 후 antibody-POD 결합용액 100 μL를 각 well에 첨가한 후 혼합하고 알루미늄 호일로 싸고 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 반응 용액을 버리고 well을 4번 씻은 후 substrate solution 100 ul을 첨가한 후 15분간 상온에 두고 stop solution 100 μL을 첨가한 후, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 약제의 독성 비교, 분석

네 가지 항알레르기약제를 96 well 배지의 전체양 200 μL에서 각각 10, 20, 30% 농도가 되도록 점안약을 배지액에 넣은 후 각각 4시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출 된 후 세포질에서 유리된 LDH양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였고, 대조군으로는 평형염액(Balanced salt solution)을 처리하여 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다. 모든 실험군과 대조군은 각각 10개의 배양된 결막세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 유의 수준은 95% 수준이었고, ANOVA 검사법을 사용하였다.

Inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNF-β 1) 생성 억제력 비교

알레르기결막염의 경우 결막세포에서 IL-6, IL-8, TNF-β1등의 염증성 사이토카인의 생성이 정상인 보다 증가하기에, 4가지 항알레르기약제를 10%, 20% 비율로 1시간, 4시간 노출한 후 생성의 억제력을 서로 비교하고자 하였다. Cell culture supernates를 각각의 well에 200 μL씩 담고 봉한 후 2시간 동안 상온에서 반응시킨 다음 상층액을 제거하고 4번에 걸쳐 wash buffer 400 μL로 씻어내었다. TNF-β conjugate 200 μL를 well에 담고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 다시 400 μL의 wash buffer로 4번 씻어내고, substrate solution 200 μL를 well에 담고 상온에서 20분간 빛을 차단한 상태로 둔 다음, stop solution 50 μL을 첨가하여 색깔의 변화가 나타나면 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IL-6, IL-8도 같은 방법으로 ELISA kit (RnDSYSTEMS, inc., USA)를 이용하여 측정하였다.

항알레르기약물 간의 구성성분 비교

네 가지 항알레르기점안약제의 분석은 약제의 성분인 전해질 조성, pH, 삼투압 및 보존제를 각각 조사하여 약물간의 차이를 확인하고자 하였다. 점안약을 sample tube에 담은 후 전해질의 조성은 LX-20 (Beckman coulter, USA), 삼투압은 Micro sample Osmometer (Fiske Associates, USA)를 이용하여 측정하였으며, pH는 Metrohn 780 (Metrohn, Swiss)을 사용하였다.

약제에 따른 세포의 창상 회복 정도 검사

항알레르기약제에 노출시 세포의 창상 회복 정도를 관찰하기 위해서 배양액에 결막세포를 각각 5×10³ cell/well이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μL씩 분 seeding한 후 37°C, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 4~5일 정도 배양하였다. Subconfluence에 도달한 배지에 pipet tip으로 scartch를 낸 후, 상층의 배지를 제거하고, 네 가지 약제를 10% 비율로 접촉시킨 후 위상차현미경 (Inverted phase-contrast light microscope)으로 즉시, 4시간, 7시간, 24시간 후 세포가 scartch된 부분으로 자라 들어오는 정도를 관찰하였다.

약제에 따른 세포의 형태학적 변화 관찰

항알레르기약제에 노출시 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 배양액에 결막세포를 각각 5×10³ cell/ml이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μL씩 분 seeding한 후 37°C, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 4~5일 정도 배양하였다. Subconfluence에 도달한 세포를 4가지 약제로 농도에 따라 약제를 각각 접촉시킨 후 위상차현미경으로 세포 형태를 관찰하였다.

또한 결막세포의 미세구조를 관찰하기 위하여, 위와 동일한 방법으로 처리한 후 24시간 배양 후 배양액을 제거하고 각 군의 각막실질세포들은 0.1 M sodium cacodylate buffer로 씻어내고, 약 2시간동안 Karnosky fixative (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1M sodium cacodylate buffer)에 고정시킨 후 0.1 M sodium cacodylate buffer로 3차례에 걸쳐 세척한 후 세포를 osmium tetroxide로 고정시키고 계열 ethanol용액으로 탈수한 후 Epon으로 포매하였다. 60~80 nm의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색시켜 투과전자현미경 (JEOL, 1200 EX, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

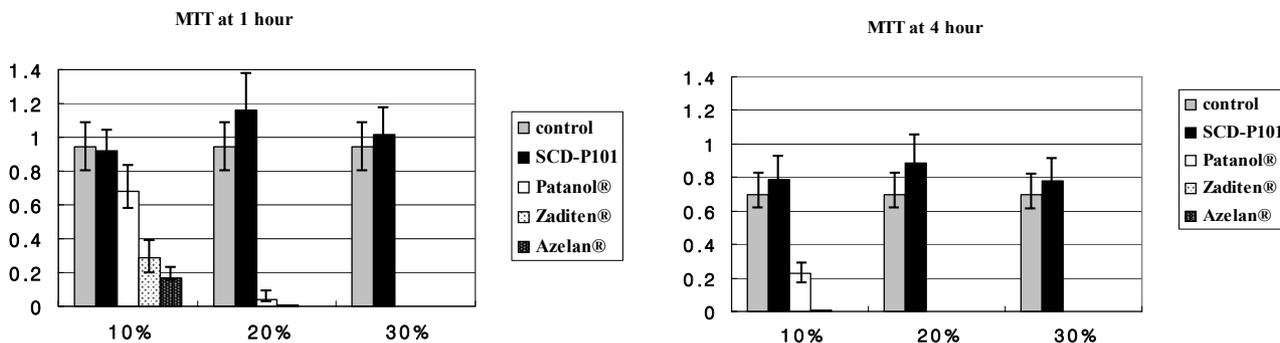


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in conjunctival cells with vernal keratoconjunctivitis exposed in the four anti-allergic agents by a scanning spectrometer (ELISA reader). The higher the concentration and the longer the exposure duration, the more decreased the metabolic activity of conjunctival cells, except fexofenadine.

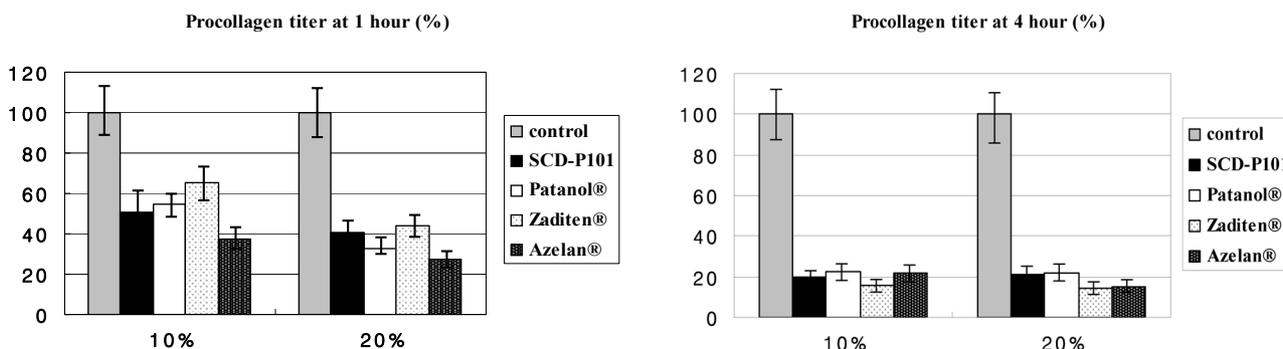


Figure 2. Procollagen titers of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in four anti-allergic agents. The procollagen titers in group of anti-allergic agents were lower than control. The concentration of procollagen was decreased, the longer the exposure duration.

결 과

MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 비교

MTT 분석에서의 결과를 보면 Azelan®, Zaditen® 및 Patanol® 세 가지 약제에서 10% 농도로 약제 노출 후 1시간째 세포의 대사력이 감소하는 경향을 보였으나 통계적 의미는 없었고, 20% 이상에서는 약제 노출 후 1시간째 세포대사력이 거의 측정되지 않았다. 4시간 노출 후에는 10% 농도에서는 세포활성도가 1시간째보다 더 감소되는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 20% 이상의 농도에서 역시 세포의 활성도는 거의 측정되지 않았다. Azelan®, Zaditen® 및 Patanol® 세 가지 약제에서 흡광도는 약제의 농도가 높을수록, 노출시간이 길수록 낮게 측정되어 결막세포의 대사활동능력이 저하되는 경향을 보였지만 통계적 유의성은 없었다. SCD-P101의 경우 세포의 활성도가 대조군과 비슷하게 유지되어, 다른 약제와 세포의 대사활동능력에 차이를 보였다(Fig. 1).

Procollagen type I 생성 억제력 비교

Procollagen type I 은 약제 노출 1시간째 10% 농도에서는 4가지 약제 모두 감소 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 20% 농도에서는 4가지 약제 모두 대조군 역가의 50% 이하로 감소되었다. 약제 노출 4시간째에는 10%, 20% 농도에서 4가지 약제 모두 대조군 역가의 25% 이하로 감소되었으며, 약제간의 생성량에 있어 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, 모든 약제에서 노출시간이 길어질수록 대조군에 비해 생성량이 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

Laminin의 생성 비교

라미닌의 경우 약제 노출 1시간 후 4가지 약제 모두에서 대조군의 역가와 유의한 차이를 보이지 않았으나, 4시간 노출 후에는 모든 약제에서 대조군에 비해 의미 있게 감소하였으며, 약제간의 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

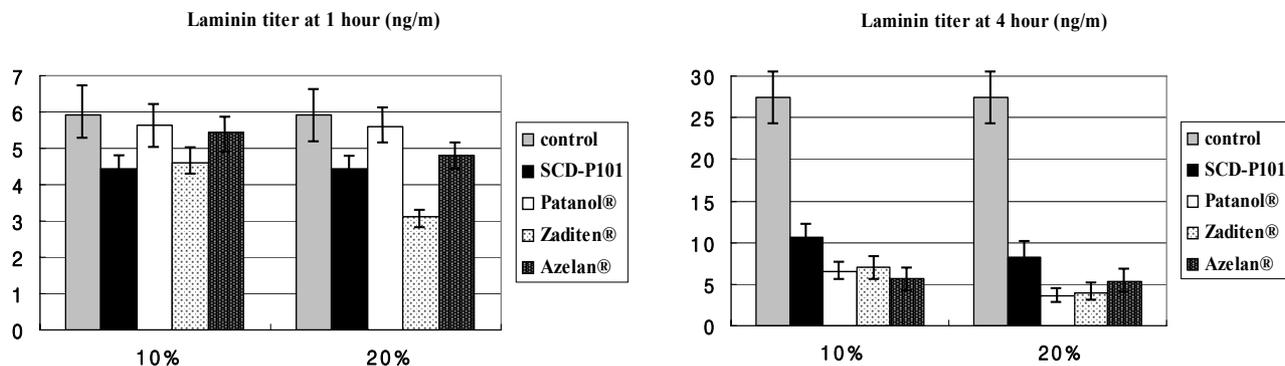


Figure 3. Laminin titers of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the four anti-allergic agents. The concentration of laminin was similar to the control after all the antiallergic agents were exposed for 1 hour. However, after 4 hour exposure, laminin titers decreased compared to the control.

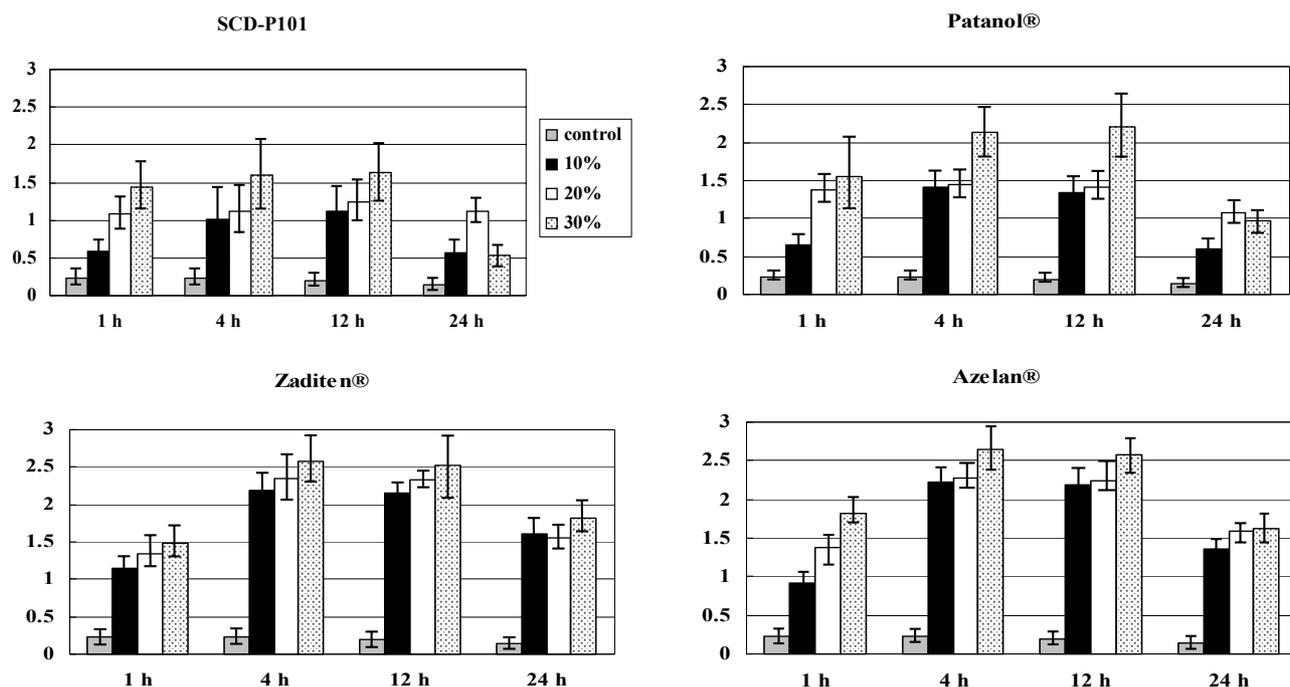


Figure 4. LDH titers of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the four anti-allergic agents. Within 24 hour, the lactate dehydrogenase (LDH) titer of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the antiallergic agents showed a kind of dose and time response. LDH titers increased up to 4 hours after exposure and maintained its level for the following 12 hours, and then decreased. The LDH titer of ketotifen and azelastine was a higher value than that of olopatadine and fexofenadine, especially in the rate of dilution of 10 and 20%.

약제의 농도 및 노출시간에 따른 LDH Assay

결막세포에서 SCD-P101, Patanol®, Zaditen® 및 Azelan® 네 가지 약제 모두 노출 후 1시간째와 4시간째 세포외로 유리된 LDH 수치가 급격히 증가하였고, 12시간까지는 유지 및 감소되는 양상을 보이다가 12시간 이후 24시간까지는 다시 감소하는 양상을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 4). Zaditen®과 Azelan®은 10%, 20% 약물농도에서 접촉 후 4시간째 LDH 역가가 2.00 이상으로 최고치

를 나타낸 반면, SCD-P101, Patanol®의 경우 10%, 20% 약물 농도에서 LDH 역가가 1.50 이하로 유지되었다.

염증성 사이토카인 생성 억제력 비교

TNF-β의 경우 4가지 약제 모두에서 10%, 20% 농도로 노출시켰을 때 1시간째와 4시간째 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). IL-6의 경우 10% 약제에 노출 후 1시간 째 Azelan®에서 104.49 pg/ml로 대조

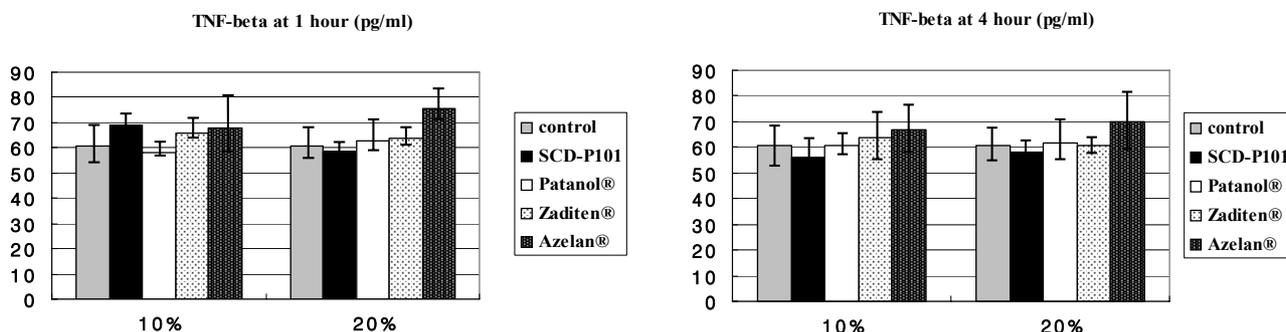


Figure 5. TNF-β concentration of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the four anti-allergic agents. The concentration of TNF-β was similar to the control after all the antiallergic agents were exposed for up to 4 hours.

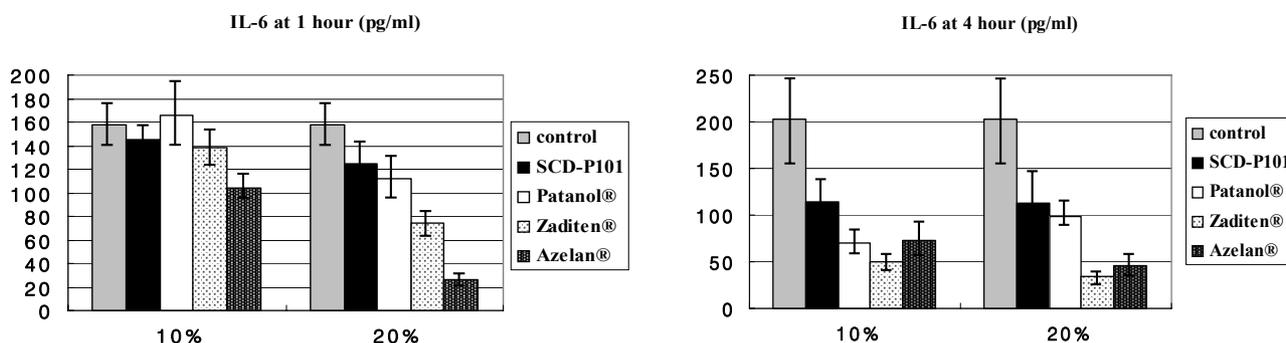


Figure 6. IL-6 concentration of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the four anti-allergic agents. The concentration of IL-6 was lower than the control after all the antiallergic agents were exposed for 4 hours.

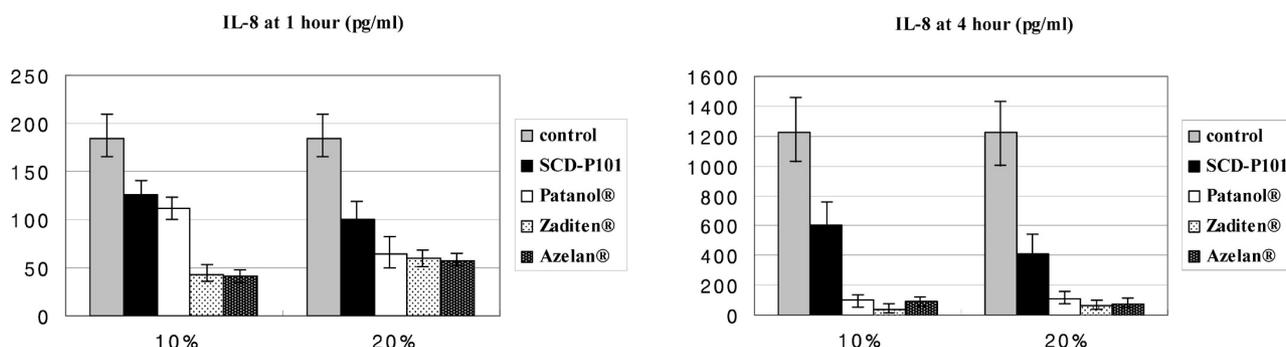


Figure 7. IL-8 concentration of cultured conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis in the four anti-allergic agents. The concentration of IL-8 was lower than control after all the antiallergic agents were exposed for up to 4 hours.

군에 비해 감소 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았고, 20% 약제에 노출 후 1시간 째 Azelan®에서 26.65 pg/ml로 뚜렷하게 감소됨을 알 수 있었다. 약제 노출 4시간 후에는 10%, 20% 모든 약제에서 대조군 역가의 50% 이하로 감소되었고, 약제간의 차이는 보이지 않았다(Fig. 6). IL-8의 경우를 분석해 보면 10%, 20% 모두 4가지 약제에서 대조군에 비해 감소되는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 특히 약제 노출 4시간 후에는 대조군 역가의 50%이하로 감소하여 노출시간이 길수록 감소비율이 더 큰 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 7).

약물간의 구성성분 비교

SCD-P101, Patanol®, Zaditen® 및 Azelan®의 약제 분석에서 모든 약제에는 보존제로 Benzalkonium chloride (BAC)가 0.1mg/ml로 동일하게 함유되어 있었으며, 전해질 구성은 SCD-P101, Zaditen® 및 Azelan®이 Patanol®에 비해 매우 낮은 농도의 Na⁺, Cl⁻을 함유하고 있었고, pH는 Patanol®의 경우 중성에 가깝게 측정되었으나 나머지 세 약제에서는 산성으로 나타났다. 또한 삼투압은 SCD-P101 273 mosm/kg, Patanol® 296 mosm/kg, Zaditen® 257 mosm/kg, Azelan® 284 mosm/kg로 유의한 차이는 없었다(Table 1).

Table 1. The ingredient, electrolyte composition, pH, osmolarity and preservatives of the commercial four anti-allergic agents

Antiallergic agents	Chief ingredient	Na+ (mEq/L)	K+ (mEq/L)	Cl- (mEq/L)	pH	Osmolarity (mosm/kg)	Preservative (mg/ml)
SCD-P101	Fexofenadine	7.3	1.63	<15	5.32	273	BAC 0.1
Patanol [®]	Olopatadine hydrochlorid	177	1.46	118.1	7.31	296	BAC 0.1
Zaditen [®]	Ketotifen fumarate	5.3	1.45	<15	5.21	257	BAC 0.1
Azelan [®]	Azelastrine hydrochloride	9.7	1.95	<15	5.47	284	BAC 0.1

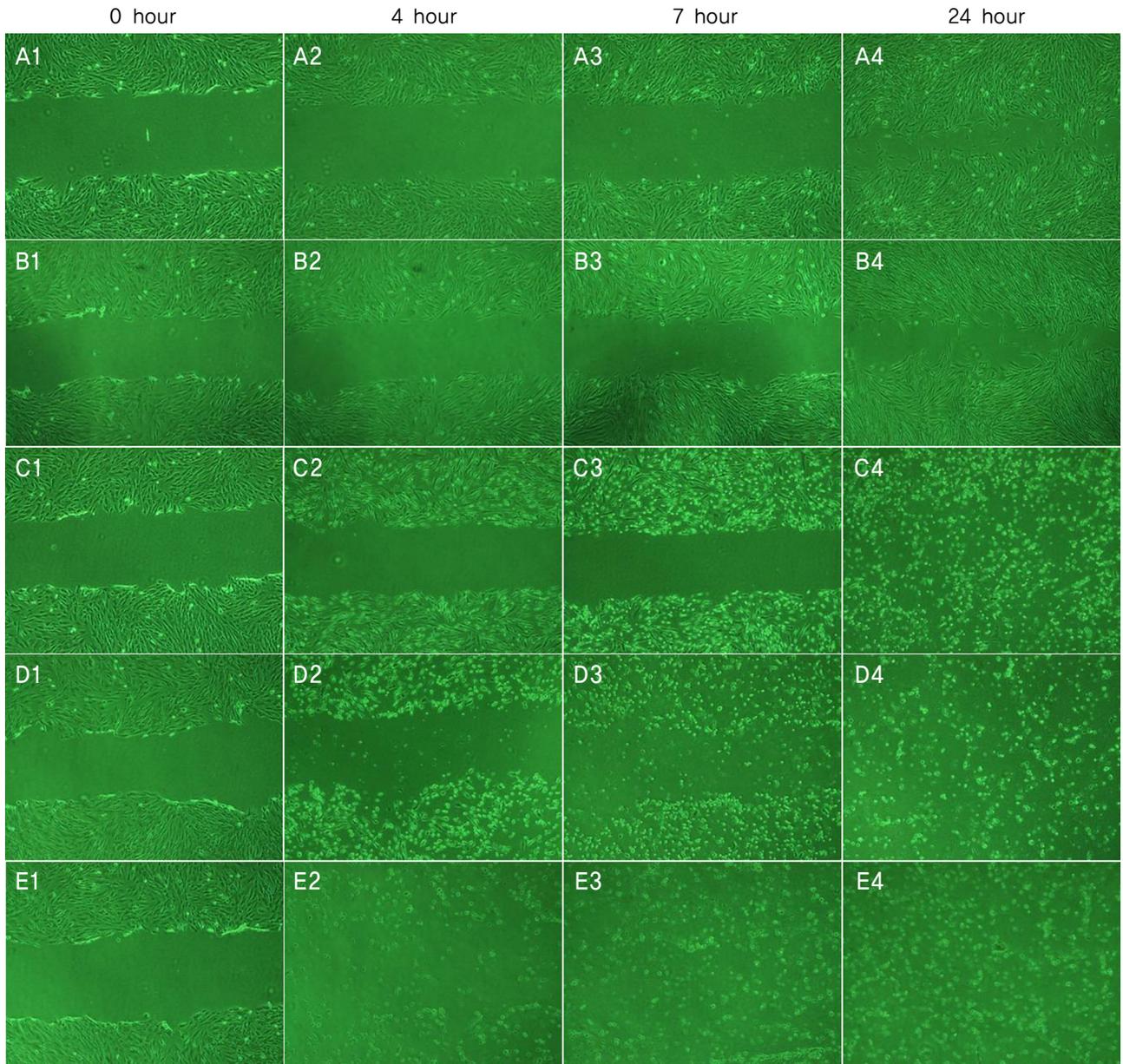


Figure 8. Scratch assay of conjunctival cells after 0-hour exposure to (A1) control (B1) 10% SCD-P101, (C1) 10% Patanol[®], (D1) 10% Zaditen[®], (E1) 10% Azelan[®], 4-hour exposure to (A2) control (B2) 10% SCD-P101, (C2) 10% Patanol[®], (D2) 10% Zaditen[®], (E2) 10% Azelan[®], 7-hour exposure to (A3) control (B3) 10% SCD-P101, (C3) 10% Patanol[®], (D3) 10% Zaditen[®], (E3) 10% Azelan[®], 24-hour exposure to (A4) control (B4) 10% SCD-P101, (C4) 10% Patanol[®], (D4) 10% Zaditen[®], (E4) 10% Azelan[®]. In control group (A), normal conjunctival cell was proliferated and moved into scratched scar in media. After exposure to SCD-P101 (B), conjunctival cell was proliferated and moved into scratched scar in media. However, in group of Patanol[®] (C), Zaditen[®] (D), Azelan[®] (E), normal conjunctival cells decreased and proliferation was not found.

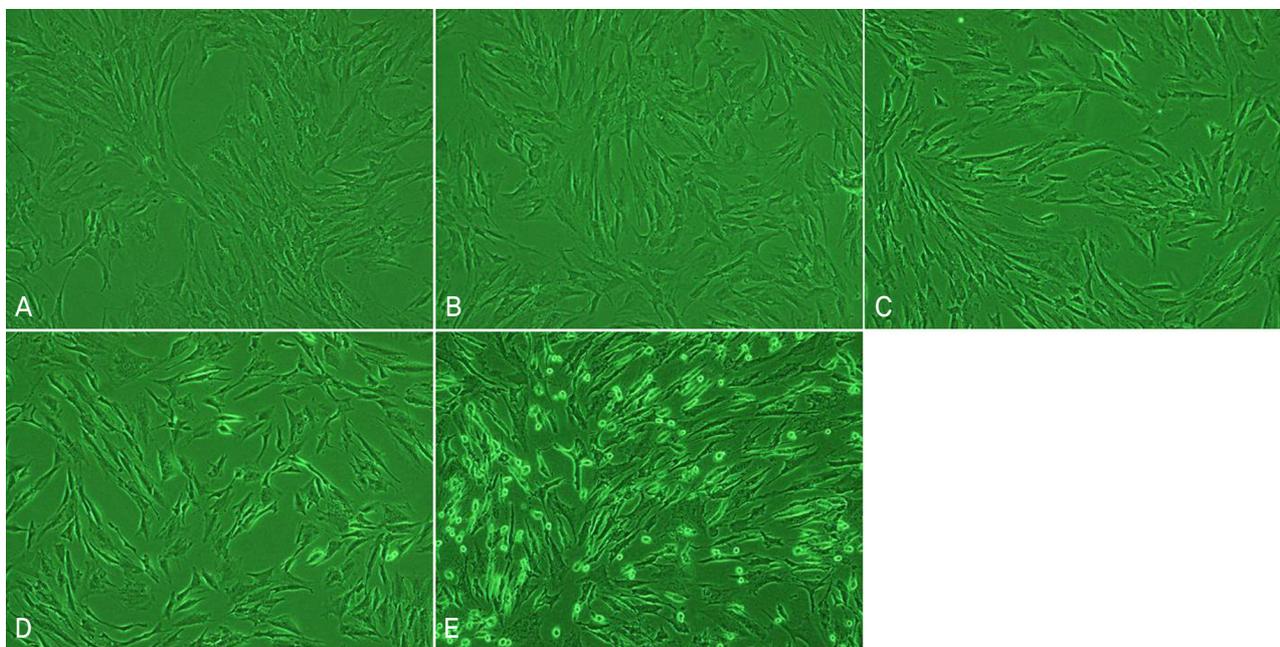


Figure 9. Phase-contrast microscopic photographs of conjunctival cells after 1-hour exposure to (A) control (B) 10% SCD-P101, (C) 10% Patanol[®], (D) 10% Zaditen[®], (E) 10% Azelan[®]. Many cultured conjunctival cells of the control are of an elongated, spindle-shaped appearance. The number of conjunctival cells decreased and round, rather than normal conjunctival cells after exposure to 10% rate of dilution of antiallergic agents, especially Azelan[®].

약제에 따른 세포의 창상 회복 정도 검사

Scratch assay 결과를 보면 대조군과 SCD-P101의 경우 24시간이 지나면 정상 결막세포가 창상 부위로 증식, 이주하여 창상회복이 이루어짐을 알 수 있었고(Fig. 8A, B), Patanol[®]의 경우 약제 노출 24시간째 정상결막세포가 손상되면서 세포의 이주 현상을 관찰할 수 없었다(Fig. 8C). Zaditen[®] 및 Azelan[®]의 경우도 약제 노출 4시간째부터 정상 결막세포가 손상되면서 세포수가 감소되었고, 세포의 창상회복에 따른 증식 소견이 보이지 않았다(Fig. 8D, E).

약제의 농도 및 노출시간에 따른 세포의 형태학적 비교

위상차현미경으로 관찰한 결막세포는 1시간 노출시킨 대조군의 경우 모양은 원주 혹은 입방형으로 핵은 뚜렷하지 않지만 수가 많아 뾰뾰한 양상을 나타내었으며(Fig. 7A), 항알레르기 점안약 1시간 접촉 후 SCD-P101, Patanol[®]의 경우 결막세포의 밀도는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, Zaditen[®]과 Azelan[®]의 경우 세포의 밀도가 감소됨을 알 수 있었고, 특히 Azelan[®]의 경우 현저하게 세포의 수가 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 7B-F).

결막세포의 전자현미경적 소견은 대조군에서는 정상적인 원형결막에 미세융모가 있으면서 세포질과 핵질의 형태

가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 9A). 각 약제 10% 농도에 4시간 접촉한 후 SCD-P101의 경우 미세융모가 일부 탈락되고 세포질내의 사립체의 확장 및 공포화소견이 보였다(Fig. 9B). Patanol[®]과 Zaditen[®]에서는 미세융모의 대부분이 소실되었고, 사립체의 확장 및 파열, 과립세포질세망의 확장이 더욱 뚜렷하게 보였다(Fig. 9C, D). Azelan[®]의 경우 앞서 언급한 3가지 약제에 비해 세포 손상이 심하여 세포질내 공포화 소견이 심하게 관찰되었고, 핵막은 유지되고 있으나, 미세융모는 관찰할 수 없었다(Fig. 9E).

고 찰

항히스타민/비만세포 안정화 복합제제는 히스타민이 히스타민 수용체에 결합하는 것을 막고 비만세포를 안정화시켜 초기 알레르기반응에서 즉각적인 증상개선을 가져오고, 후기 알레르기반응에서 장기적인 예방효과가 있어, 새로이 항알레르기약제의 1차 약제로 각광받고 최근에는 임상적에서도 널리 사용되고 있다.^{7,8} 알레르기결막염에 흔히 사용되는 약제인 Azelan[®], Zaditen[®], Patanol[®]은 모두 항히스타민제와 비만세포 안정화 작용을 가지고 있고, 최근 소개되는 Fexofenadine 또한 항히스타민/비만세포 안정화 복합제제로 점안약으로 개발되었다.^{9,10} 기존에 흔히 사용되고 있던 약제들의 결막독성에 대한 보고는 있지만, 새로 소개된 약

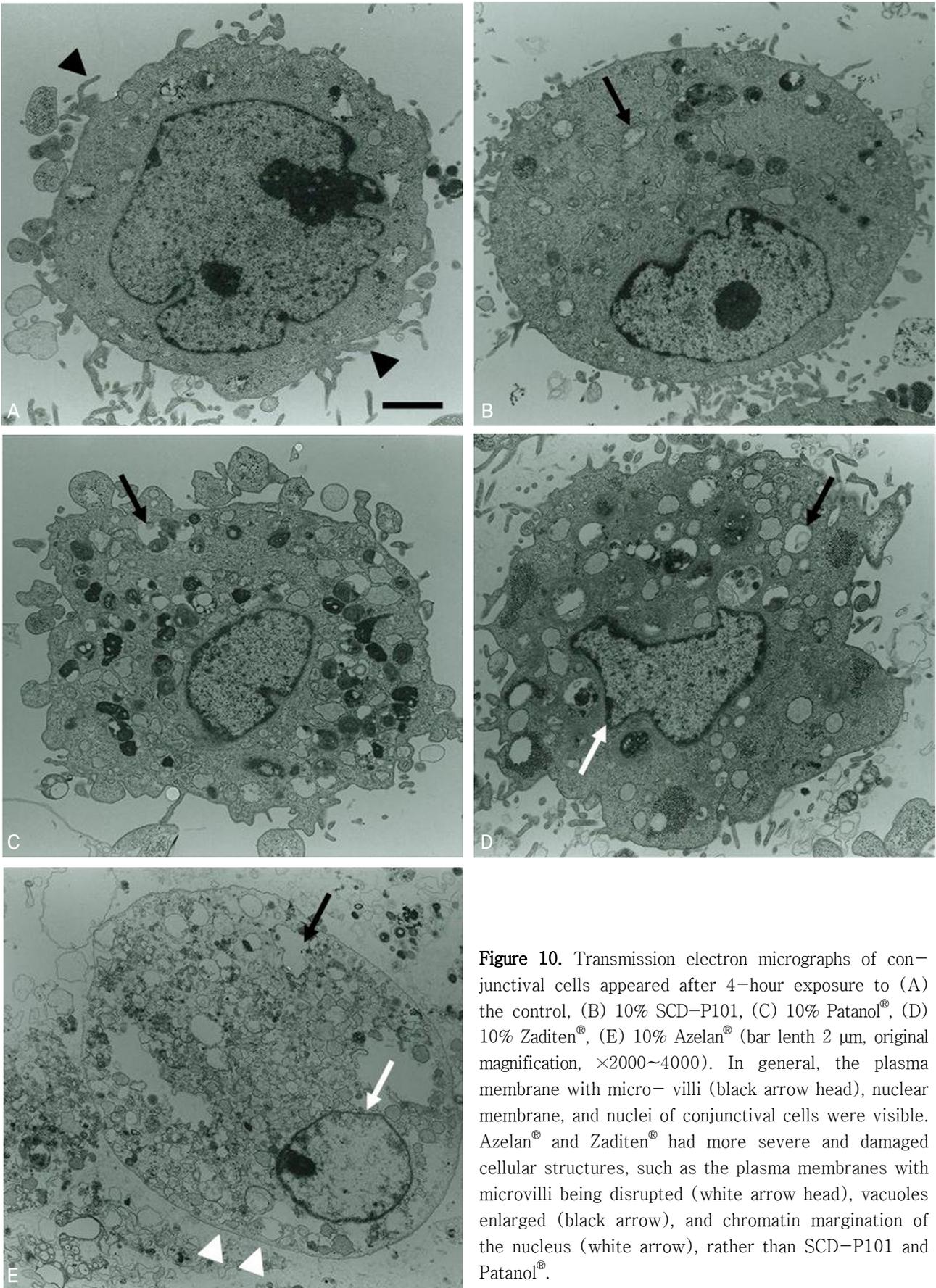


Figure 10. Transmission electron micrographs of conjunctival cells appeared after 4-hour exposure to (A) the control, (B) 10% SCD-P101, (C) 10% Patanol[®], (D) 10% Zaditen[®], (E) 10% Azelan[®] (bar length 2 μ m, original magnification, $\times 2000\sim 4000$). In general, the plasma membrane with microvilli (black arrow head), nuclear membrane, and nuclei of conjunctival cells were visible. Azelan[®] and Zaditen[®] had more severe and damaged cellular structures, such as the plasma membranes with microvilli being disrupted (white arrow head), vacuoles enlarged (black arrow), and chromatin margination of the nucleus (white arrow), rather than SCD-P101 and Patanol[®].

제의 항알레르기 효과와 결막 세포에 미치는 영향에 대해 기존 약제들과 비교한 보고가 국내에서는 없어 본 연구에서는 각 약제가 결막세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

MTT 분석법을 통해 세포의 흡광도를 분석한 결과 SCD-P101의 경우 세포 대사 활성도 감소를 보이지 않았고, Azelan®, Zaditen® 및 Patanol®에서는 노출시간이 길수록 약제의 비율이 높을수록 세포대사 활성도가 감소되는 경향을 보였다. 봄철각결막염 환자의 결막조직에는 교원질과 그 전구물질인 프로콜라겐의 생성이 증가되어 있고, 라미닌도 많이 생성된다. 이러한 프로콜라겐의 생성량을 비교함으로써 알레르기약제의 치료효능을 비교할 수 있는데, 네 가지 약제 모두에서 비슷한 효과를 보였고, 1시간째보다 4시간째 치료효과가 더 좋은 경향을 보였다. 알레르기결막염 환자의 눈물에는 인터루킨(IL)-6, TNF- α , β , 인터페론(INF)- γ 등의 염증성 사이토카인과 인터루킨(IL)-8, eotaxin 등의 케모카인 농도도 증가되어 있다고 알려져 있다.^{12,13} 본 연구에서는 TNF- β 의 역할은 항알레르기점안약 네 가지 모두에서 대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으나, 인터루킨-6 및 8의 경우는 농도가 높을수록 약제의 노출시간이 길수록 대조군에 비해 생성량이 감소하는 경향을 보여 알레르기결막염에서 증가되는 염증성 사이토카인의 생성 억제 효과를 확인할 수 있었으나, 통계적 유의성은 없었다.

LDH 역가 분석 결과 LDH는 약제 노출 후 4시간에 최고치를 보이고 12시간까지 유지되다가 24시간에는 다시 감소되었다. 또한 약제 희석 농도가 높을수록 결막세포 손상이 더 심한 경향을 보였다. 10% 농도에서는 SCD-P101과 Patanol®이 Zaditen®, Azelan®보다 LDH 역가가 낮은 경향을 보였고, 20% 농도에서도 SCD-P101과 Patanol®이 Zaditen®, Azelan®보다 4, 12시간째 LDH 역가가 낮은 경향을 보였다. 이는 Azelan®, Zaditen®이 결막세포의 세포질의 변성과 손상이 더 심한 경향을 보여준다. SCD-P101과 Patanol®의 경우 30% 농도에서만 4시간 및 12시간째 LDH 역가가 2.0 이상으로 상승하였지만, Azelan®과 Zaditen®은 10%, 20% 30% 희석 농도 모두에서 4시간 이상 노출시 2.0 이상으로 증가하였으나, 통계적 의미는 없었다. LDH 역가는 노출 12시간이 지나면서 2.0 이하로 다시 감소하였다. 이는 항알레르기점안약의 세포독성에 의해 많은 결막세포들이 죽어 남아있는 일부의 결막세포들이 LDH 효소를 유리하는 것으로 해석될 수 있다. 본 연구에서는 소수의 봄철각결막염 환자 결막조직을 채취하여 반복 실험을 시행한 것으로, 임상시험의 특성상 샘플의 수가 많지 않아 통계적인 유의성을 관찰하기는 어려웠으나, 그럼에도 불구하고 약

제에 따른 결막의 반응을 추정하는 데에는 이 결과가 의의가 있다고 판단되며, 향후 추가적인 환자를 대상으로 한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

임상적으로 사용되는 점안약은 장기간 사용하거나 과량을 사용했을 때 안구 표면에 독성을 야기할 수 있는데, 그 요인으로는 약제의 전해질, pH, 삼투압, 보존제의 성분 등이 있다. 특히 전해질과 삼투압이 안표면 세포의 기능 이상을 야기하는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다.¹⁴ 일반적으로 점안약에 포함되어 있는 전해질은 Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} 등이 있는데, 본 연구에서는 K^+ 은 다섯 가지 약제 모두에서 낮게 측정되었으나 세포손상에 영향을 일으킬 정도의 차이는 보이지 않았다. 그러나 Na^+ , Cl^- 의 경우 세포외액에서 적정 농도는 각각 142~152.7 mEq/L, 104.0~117.4 mEq/L인데¹⁵, Patanol®에 비해 SCD-P101, Zaditen®, Azelan®에서 매우 낮은 농도를 보여 낮은 농도의 Na^+ , Cl^- 이 세포의 기능 이상 및 손상에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. Luo et al¹⁶는 고삼투성 NaCl이 조직배양결과 결막 상피에 염증유발 스트레스 효과가 있다고 보고하였고, Lee and Oum¹⁷에 의하면 diclofenac sodium (Decrol®, Ilyang, Korea)에 각막 실질세포를 노출한 경우 스테로이드 제제보다 세포 손상이 많이 발생하였고, 낮은 농도의 Na^+ , Cl^- 이 원인으로 간주되었다. SCD-P101의 경우 Na^+ , Cl^- 농도가 낮음에도 불구하고, 세포손상은 적어 다른 요인들도 세포손상에 관여함을 짐작할 수 있어 보다 정밀한 관찰 및 검사가 필요한 것으로 생각된다.

삼투압의 불균형 또한 세포 기능의 손상을 야기할 수 있다. Wee et al¹⁴은 토끼 각막세포가 삼투압이 227 mosm/kg로 낮은 인공 누액인 Aqua Site에 노출되었을 때 세포 손상이 일어남을 보고하였고, Luo et al¹⁶는 고삼투성 생리식염수가 조직배양결과 결막 상피에 염증을 유발하는 효과가 있다고 보고하였다. 일반적으로 세포에 손상을 주지 않는 삼투압은 260~320 mosm/kg로 알려져 있는데¹⁸, SCD-P101, Patanol®, Azelan®은 각각 273, 296, 284 mosm/kg로 정상 범위였고, Zaditen®은 257 mosm/kg로 약간 낮은 삼투압을 보여 세포 손상에 영향을 줄 수 있을 것으로도 생각된다. 세포외액의 pH가 7.0~7.7 범위일 때 세포의 생명 현상이 유지되므로 점안약의 pH도 세포의 손상에 영향을 미치는 요인으로 볼 수 있다.¹⁹ Patanol®의 경우 다른 세 가지 약제들과 달리 중성으로 나타나 세포 손상이 적은 것이 이런 연유인 것으로도 생각된다.

점안약에는 세균의 성장을 억제하기 위해 보존제를 첨가하는데, Benzalkonium chloride (BAC)가 가장 흔히 사용되고 있다. BAC는 세포막에서 친지질성 성분으로 존재하면서 전해질이 세포내로 들어갈 수 있도록 세포막의 성질

을 바꾸어 세포내의 전해질 농도에 변화를 초래하여 세포의 손상을 초래하며, 세포막에 작용하여 이온이나 물질의 투과성을 변화시켜 결막이나 각막의 세포조직에 독성을 초래할 수 있다.²⁰⁻²³ 본 연구에서는 네 가지 약제 모두 BAC 0.1 mg/ml가 첨가되어 있어 보존제로 인한 세포의 손상이 나타날 수 있으나 농도가 같으므로 약제간의 차이는 비교할 수 없을 것으로 생각된다.

위상차현미경 상에서 대조군의 결막 세포는 방추상이나 길쭉한 모양으로 세포 배열은 밀집되어 있었다. 그러나 항알레르기점안약에 노출되어 LDH 역가가 증가한 경우 많은 결막세포들이 배지에서 떨어져 나와 부풀고 둥근모양으로 변해있었다. LDH 역가가 높을수록 투시전자현미경상 많은 결막세포들이 손상을 받아 세포막이 파괴되고 조면소포체가 확장되며, 미토콘드리아가 비대해진 모습을 보였으며, 미세융모가 소실되고 크로마틴이 핵의 주변부로 몰리는 변화가 더욱 현저하게 관찰되었다. 항알레르기점안약의 약물 농도가 높을수록 노출시간이 길수록 결막세포의 손상은 증가함을 알 수 있었다. 대조군에 비해 네 가지 약제 중에서 SCD-P101, Patanol[®]의 경우 결막 세포의 손상이 경미하였으나, Azelan[®]과 Zaditen[®]은 LDH 역가가 높을 뿐만 아니라 세포부종과 세포질의 손상 및 핵의 변성 등이 보다 심하게 관찰되었다.

본 연구에서 살펴본 것과 같이 새로 소개된 항알레르기 점안약제인 SCD-P101도 현재 널리 사용되고 있는 약제들과 항알레르기효과는 비슷하면서 결막세포에 미치는 독성은 적어 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각되며, 알레르기결막염의 증상 개선에 대한 임상적 연구나 약제의 주성분 자체의 약동학적 연구조사가 필요할 것이다.

참고문헌

- 1) Holgate ST, Lack G. Improving the management of atopic disease. Arch Dis Child 2005;90:826-31.
- 2) Weeke ER. Epidemiology of hay fever and perennial allergic rhinitis. Monoger Allergy 1987;21:1-20.
- 3) Foster CS. Immunologic disorders of the conjunctiva, cornea, and sclera In: Albert PM, Jakobiec FA, eds. Principles and Practice of Ophthalmology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994; v. 2. chap. 65.
- 4) Bielory L. Therapeutic targets in allergic eye disease. Allergy Asthma Proc 2001;22:25-8.
- 5) Mosmann TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and

- survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- 6) Schultz BL. Pharmacology of ocular allergy. Current Opin Allergy Clin Immunol 2006;6:383-9.
- 7) Abelson MB, Smith L, Chapin M. Ocular allergic disease: Mechanisms, disease sub-types, treat. Ocul Su 2003;1:127-49.
- 8) McGill JI. A review of the use of olopatadine in allergic conjunctivitis. Int Ophthalmol 2004;25:171-9.
- 9) Frossard N, Strolin-Benedetti M, Purohit A, Pauli G. Inhibition of allergen-induced wheal and flare reactions by levocetirizine and desloratadine. Br J Clin Pharmacol 2007;65:172-9.
- 10) Spangler DL, Abelson MB, Ober A, Gomes PJ. Randomized, double-masked comparison of olopatadine ophthalmic solution, mometasone furoate monohydrate nasal spray, and fexofenadine hydrochloride tablets using the conjunctival and nasal allergen challenge models. Clin Ther 2003;25:2245-67.
- 11) Lee JS, Lee JE, Kim NM, Oum BS. Comparison of the conjunctival toxicity of topical ocular antiallergic agents. J Ocular Pharmacol Ther 2008;24:557-62.
- 12) Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. Clin Exp Allergy 2006;36:777-84.
- 13) Sarac OI, Erdener U, Irkec M, et al. Tear eotaxin levels in giant papillary conjunctivitis associated with ocular prosthesis. Ocul Immunol Inflamm 2003;11:223-30.
- 14) Wee RW, Wang XW, McDonnell PJ. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. Cornea 1995;14:273-9.
- 15) Park YS. Physiology of body fluid. In: Kang DH, ed. Physiology, 5th ed. Seoul: Sin-Kwang publishing & printing 2000; chap. 5.
- 16) Luo L, Li DQ, Corrales RM, et al. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. Eye Contact Lens 2005;31:186-93.
- 17) Lee JS, Oum BS. The effects of artificial tear formulation and anti-inflammatory agents on the cultured keratocytes of rabbit. J Korean Ophthalmol Soc 1998;39:42-51.
- 18) Freshney RI. The culture environment: Substrate, gas phase, medium, and temperature, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1987;70-1.
- 19) Lee SJ. Body fluid and acid-base balance. In: Kim KH, Oum YE, Kim J, eds. Physiology. Seoul: Eui-hak publishing & printing 2002; v. 7. chap. 20.
- 20) Burstein NL. Preservative cytotoxic threshold for benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate in cat and rabbit corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 1980;19:308-13.
- 21) Cha SH, Lee JS, Oum BS, Kim CD. Corneal epithelial cellular dysfunction from benzalkonium chloride (BAC) in vitro. Clin Exp Ophthalmol 2004;32:180-4.
- 22) Green K, Tonjum A. Influence of various agents on corneal permeability. Am J Ophthalmol 1971;72:897-905.
- 23) Lee JS, Jung DY, Oum BS, Kim CD. Cytotoxicity of benzalkonium chlorid on the corneal epithelial cell of rabbit. J Korean Ophthalmol Soc 1998;39:1326-33.

=ABSTRACT=

Comparison of the Efficacy of Topical Antihistamine/Mast Cell Stabilizers *in vitro*

Su Jin Kim, MD¹, Tae Jin Yoon, MD², Ji Eun Lee, MD, PhD¹, Jong Soo Lee, MD, PhD¹

Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine, Medical Research Institute¹, Busan, Korea
Shinsegae Eye Clinic², Ulsan, Korea

Purpose: To investigate the biologic effects of topical anti-allergic agents with H1-receptor antagonism and inhibition of histamine release from mast cells in the cultured conjunctival cells of patients with vernal keratoconjunctivitis *in vitro*.

Methods: Conjunctival cells of vernal keratoconjunctivitis were exposed to the anti-allergic agents SCD-P101 (Fexofenadine, Samchundang, Korea), Patanol[®] (Alcon, USA), Zaditen[®] (Novartis, USA), and Azelan[®] (Taejoon, Korea). Efficacy of the topical antihistamine/mast cell stabilizers was evaluated using the MTT assay, measuring the concentration of procollagen and inflammatory cytokines. Cell damage was determined using the lactate dehydrogenase (LDH) assay with dilution rates of 10, 20, and 30% and compared with the balanced salt solution-treated group. Cellular morphologic results were examined by inverted light microscopy and transmission electromicroscopy.

Results: Metabolic activity of conjunctival cells decreased at higher concentrations and longer exposure durations, except for the SCD-P101 agent. The procollagen, laminin, IL-6 and IL-8 titers tended to be lower than that of the control in the eyes exposed to all the anti-allergic drugs tested in this study, but the concentration of TNF- β was similar to that of the control group. Zaditen[®] and Azelan[®] tended to show a greater LDH titer and edema, as well as cytoplasmic and nuclear degeneration of the conjunctival cells than did SCD-P101 or Patanol[®].

Conclusions: Cellular metabolic activity was the highest in the new anti-allergic agent SCD-P101. SCD-P101 and Patanol[®] caused marginally less damage to cultured conjunctival cells than did Zaditen[®] and Azelan[®].
J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(3):406-417

Key Words: Azelan[®], Conjunctival cell toxicity, Patanol[®], SCD-P101, Zaditen[®]

Address reprint requests to **Jong Soo Lee, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital
#1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea
Tel: 82-51-240-7323, Fax: 82-51-242-7341, E-mail: jongsool@pusan.ac.kr