

무방부제 인공누액이 인체각막상피세포에 미치는 영향

김수진¹ · 김은희² · 이지은¹ · 이종수¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 부산성모병원 안과²

목적: 임상에서 사용되는 무방부제 인공누액들이 각막상피세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인체각막상피를 일차 배양하여 Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®]와 접촉시킨 후 MTT 및 lactate dehydrogenase (LDH) assay를 이용하여 세포증식력 및 독성을 비교하였으며, 약제의 구성성분을 분석하고, 유세포 분석을 통하여 세포자멸사를 확인하였다.

결과: MTT 및 세포이주, 창상회복에서 세 약제 모두 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. LDH 역가는 노출시간이 길어질수록 증가하는 양상을 보였으나, 세 약제 모두 대조군에 비해 의미 있는 차이를 보이지 않았고, 유세포 분석에서는 대조군과 세 약제 모두에서 24시간째 세포자멸사와 함께 세포괴사의 소견을 보였다. 세 약제의 주성분을 제외한 전해질, pH, 삼투압 등의 차이는 없었다.

결론: 임상에서 흔히 사용되는 일회용 인공누액제인 Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®]의 경우 각막상피세포에 미치는 영향이 미미하여 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2010;51(8):1113-1120〉

임상에서 사용되는 점안제에는 약물의 수명을 연장시키고 세균오염을 방지하기 위해 보존제가 첨가되어 있다. 흔히 사용되는 보존제에는 benzalkonium chloride, chlorobutanol, parahydroxybenzoate 등이 있는데,¹ 여러 연구에서 이러한 보존제가 각막상피세포에 독성을 나타내고 상피세포의 재생을 지연시킨다고 보고하였다.²⁻⁵ 보존제 독성은 녹내장이거나 알리지 결막염, 건성안 등 장기간 점안약을 사용해야 하는 경우 더욱 문제가 되는데, 보존제 독성을 피하여 안전하게 사용하기 위해 보존제가 없는 점안약이 제품화되어 널리 사용되고 있다.

그러나 아직 보존제가 없는 인공누액 제제인 hyaluronic acid와 carboxymethylcellulose를 주성분으로 하는 무방부제 일회용 인공누액의 경우 각막상피세포에 미치는 효과 및 독성에 대한 국내보고가 없어, 저자들은 Kynex[®] (hyaluronic acid 0.1%, Alcon, Seoul, Korea), Hyalein Mini 0.3%[®] (hyaluronic acid 0.3%, Santen, Osaka, Japan), Refresh Plus[®] (carboxymethylcellulose 0.5%, Allergan, Irvine, California)의 각막상피세포에 미치는 영향 및 독성을 관찰

하고자 MTT 분석법으로 세포의 대사력을 측정하고, 세포이주능력 검사, 창상회복능력 검사, 젖산탈수소효소 분석법 (LDH leakage assay)을 각각 시도하였으며, 유세포분석기를 이용하여 세포자멸사를 비교하였다.

대상과 방법

세포배양과 처리

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 담겨서 37℃ 배양기에 1시간 처리하여 각막상피세포를 분리한 다음 5분간 1,000 분당회전수(revolutions per minute, rpm)에서 원심분리하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning Incorporated, Corning, NY)로 옮겨 95% air-5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기에서 일차배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Rockville, MD)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, MD), 20 ng/ml epidermal growth factor (Gibco BRL, Rockville, MD), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD)을 첨가한 세포배양액을 2~3일 간격으로 교체하여 세포가 합류(confluent

■ 접수 일: 2009년 7월 2일 ■ 심사통과일: 2010년 6월 29일

■ 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 학술대회에서 포스터로 발표되었음.

* 이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

growth)되었을 때 배양배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco BRL, Rockville, MD)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°C, 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.

MTT 분석법을 사용한 세포의 대사 활성도 측정

세포의 대사능력을 측정하기 위해 calorimetric assay를 이용하여 세포 내에 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, MO)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.⁶

Subconfluence에 도달한 cell을 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco BRL, Rockville, MD)로 1회 세척한 후 무방부제 인공누액 3가지를 30분, 4시간, 12시간, 24시간 동안 각막상피세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지에 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, MD)를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 세포를 배양하여 세포대사능력을 측정하였다.

세포의 흡광도를 측정하기 위해 5 mg의 MTT solution을 PBS 1 ml에 녹인 후 0.2 μ L syringe filter로 거른 다음 DMEM 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배양액을 140 μ L 정도 제거한 후 MTT solution을 100 μ L 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층액을 110 μ L 제거한 후 DMSO (Dimethyl

sulfoxide: Sigma, Cat. D-5869, St. Louis, MO)를 100 μ L 넣어 실온에서 20분간 흔들여 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)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 대조군간의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 세포의 생존율(%)=각 칸의 흡광도/대조군간의 흡광도 \times 100으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩 시도하여 각 군과의 통계학적 유의성을 비교하였다(Student's *t* test, $p < 0.05$).

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

세 가지 인공누액을 96 well 배지의 전체양 200 μ L에서 100% 농도가 되도록 배지액에 넣은 후 각각 30분, 4시간, 12시간, 24시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH 양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)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 각막상피세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 유의 수준은 95% 수준이었고, ANOVA 검사법을 사용하였다.

약제에 따른 세포의 이주 정도 검사

인공누액에 노출 시 세포의 이주 정도를 관찰하기 위해 transwell 6.5 mm insert (5 μ m pore size membrane)를 100 μ g/ml 콜라겐 1형으로 하룻밤 동안 코팅한 후 insert를 PBS로 씻은 뒤 24시간 동안 건조시켰다. 각막상피세포를 3×10^6 cells/ml가 되도록 EGM-2 배지에 각 농도별로 희석한 후 각 well에 600 μ L씩 넣어주었다. 24시간 동안 37°C 배양기에서 배양한 후 insert를 PBS로 씻은 후 Diff-Quick Stain set으로 고정하고 염색한 후 건조시켰다. 막을 떼내어 현미경하에 슬라이드를 고정하여 세포의 수를 세었다.

약제에 따른 세포의 창상 회복 정도 검사

인공누액에 노출 시 세포의 창상 회복 정도를 관찰하기

위해서 배양액에 각막상피세포를 각각 5×10^3 cell/well이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μ L씩 심은 후 37°C, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 4~5일 정도 배양하였다. Subconfluence에 도달한 배지에 100 μ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 후, 상층의 배지를 제거하고, 3가지 인공누액을 접촉시킨 후 역상 광학 현미경(Inverted phase-contrast light microscope)으로 24시간 후 세포가 스크래치 부분으로 자라 들어오는 정도를 관찰하였다. 창상부위의 너비를 정량화하기 위해 Adobe Photoshop 7.0으로 사진을 불러온 후 10군데 위치를 정하여 스크래치난 부분의 거리를 각각 측정하고, 약물 처리 후 24시간째 이주한 세포의 경계 사이의 거리를 측정하여, 창상회복의 정도를 퍼센트로 표시하였다.⁷

유세포분석기에 의한 세포자멸사 분석

세포자멸사 정도를 확인하기 위해 배양액에 각막상피세포가 5×10^5 cell/ml이 되도록 부유시킨 후 세포를 증식시킨 후 세 약제를 100%로 4시간, 24시간 동안 접촉시킨 후 반응을 관찰하였다. 트립신을 이용하여 세포를 분리시킨 후 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리시켜 세포를 대상으로 binding buffer 200 μ L 넣고 씻은 후 다시 5분간 4°C에서 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 이중 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[®](Beckman Coulter, Miami, FL)를 이용하였다.

인공누액의 구성성분 비교

세 가지 인공누액의 분석은 약제의 성분인 전해질 조성, pH, 삼투압 및 보존제를 각각 조사하여 약물 간의 차이를 확인하고자 하였다. 점안약을 sample tube에 담은 후 전해질의 조성은 LX-20 (Beckman coulter, USA), 삼투압은 Micro sample Osmometer (Fiske Associates, Norwood, MA)를 이용하여 측정하였으며, pH는 Metrohn 780 (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland)을 사용하였다.

결 과

MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 비교

MTT 분석법을 사용하여 세포의 흡광도를 측정한 결과 세 가지 약제 모두 노출 후 30분, 4시간, 12시간, 24시간째 대조군과 대사활동능력의 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

약제의 농도 및 노출시간에 따른 LDH Assay

각막상피세포를 Kynex[®] 점안액에 노출한 경우 대조군과 유사하게 LDH 역가가 낮게 측정되었고 24시간까지 0.6 이하로 유지되었다. Hyalein Mini 0.3%[®]에 노출한 경우 시간이 지날수록 LDH 역가가 증가하는 양상을 보였으나, 역가는 1.0 이하로 유지되어 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하지는 않았다. Refresh Plus[®]에 노출한 경우에도 시간이 지날수록 LDH 역가가 증가하는 양상을 보였으나 0.9 이하로 유지되었고, 대조군에 비해 유의한 증가 소견은

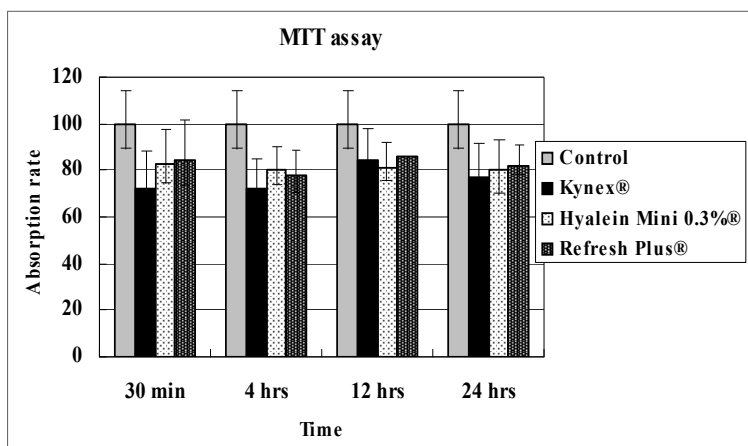


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in corneal epithelial cell exposed in three preservative-free artificial tear drops-Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®]- by a scanning spectrometer (ELISA reader). The values were not statistically significant ($p > 0.05$).

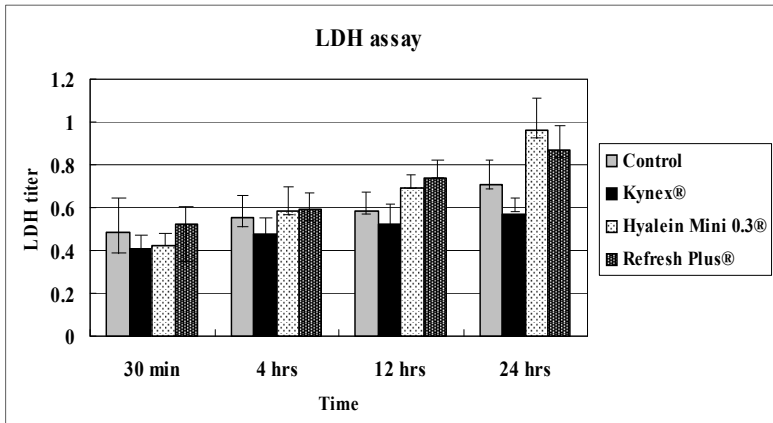


Figure 2. LDH titers of cultured corneal epithelial cells exposed in three preservative-free artificial tear drops, Kynex®, Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus®. The LDH titer in Kynex® was lower than in the control, but not significant, and the LDH titers tended to increase after all preservative-free artificial tear drops were exposed up to 24 h, but there was no significant difference of LDH titer between control groups and artificial tear drops-treated groups ($p > 0.05$).

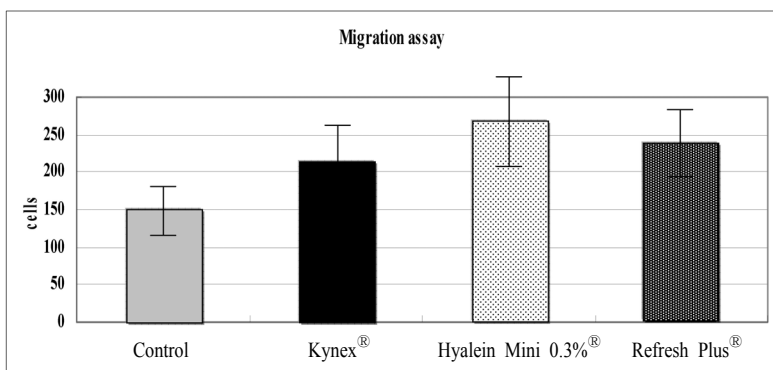


Figure 3. Migration assay of corneal epithelial cells after 24 hour exposure to Kynex®, Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus®. Corneal epithelial cells were proliferated and moved into collagenous membrane in media. Hyalein Mini 0.3% showed most prominent cellular migration activity, but the values were not statistically significant.

없었다(Fig. 2).

약제에 따른 세포의 이주 현상

24시간 약물에 노출한 경우 Migration assay 결과 막을 통과하여 자라는 정상 각막상피세포가 Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus®, Kynex® 순서로 세포의 이주현상이 나타났다, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

약제에 따른 세포의 창상회복 정도 검사

24시간 동안 약제에 노출한 경우 Scratch assay 결과를 보면 대조군, Kynex®, Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus® 모두 정상 각막상피세포가 창상 부위로 증식, 이주하여 창상회복이 이루어짐을 알 수 있었다(Fig. 4A-H). 각막상피세포가 자라 들어오는 정도는 세 가지 약제 중에서 Hyalein Mini 0.3%가 가장 현저하였고(Fig. 4G), 그 다음으로 Refresh Plus® 와 Kynex® 의 창상회복 정도는 유사하게 나타났다(Fig. 4F, H), 세 약제 모두 대조군과 창상회복 정도의 유의한 차이는 보이지 않았다. 약물처리 전과 비교하

였을 때 창상 크기의 감소 정도는 Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus®, Kynex® 순으로 나타났으나 통계적 의미는 없었다(Fig. 4I).

유세포 분석기를 이용한 세포자멸사 비교

Kynex®, Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus® 점안액에 처리 시 노출 후 4시간째 Annexin V 염색에 음성 반응을 보였으나, 노출 후 24시간째 Annexin V 염색에 양성 반응, PI 염색에 음성 반응을 보여 세포자멸사 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

약물 간의 구성성분 비교

Kynex®, Hyalein Mini 0.3%, Refresh Plus®의 구성성분 중 Na^+ 는 각각 129.4 mmol, 133.6 mmol, 155.8 mmol 이었고, Cl^- 은 각각 133.6 mmol, 131.9 mmol, 124.9 mmol이었으며, K^+ 농도는 각각 16.38 mmol, 15.43 mmol, 17.97 mmol로 측정되어 약제 간의 차이를 보이지 않았다. pH는 세 약제 모두 5.5로 약산성을 보였다. 삼투압 역시 Kynex® 284 mosm/kg, Hyalein Mini 0.3% 284 mosm/

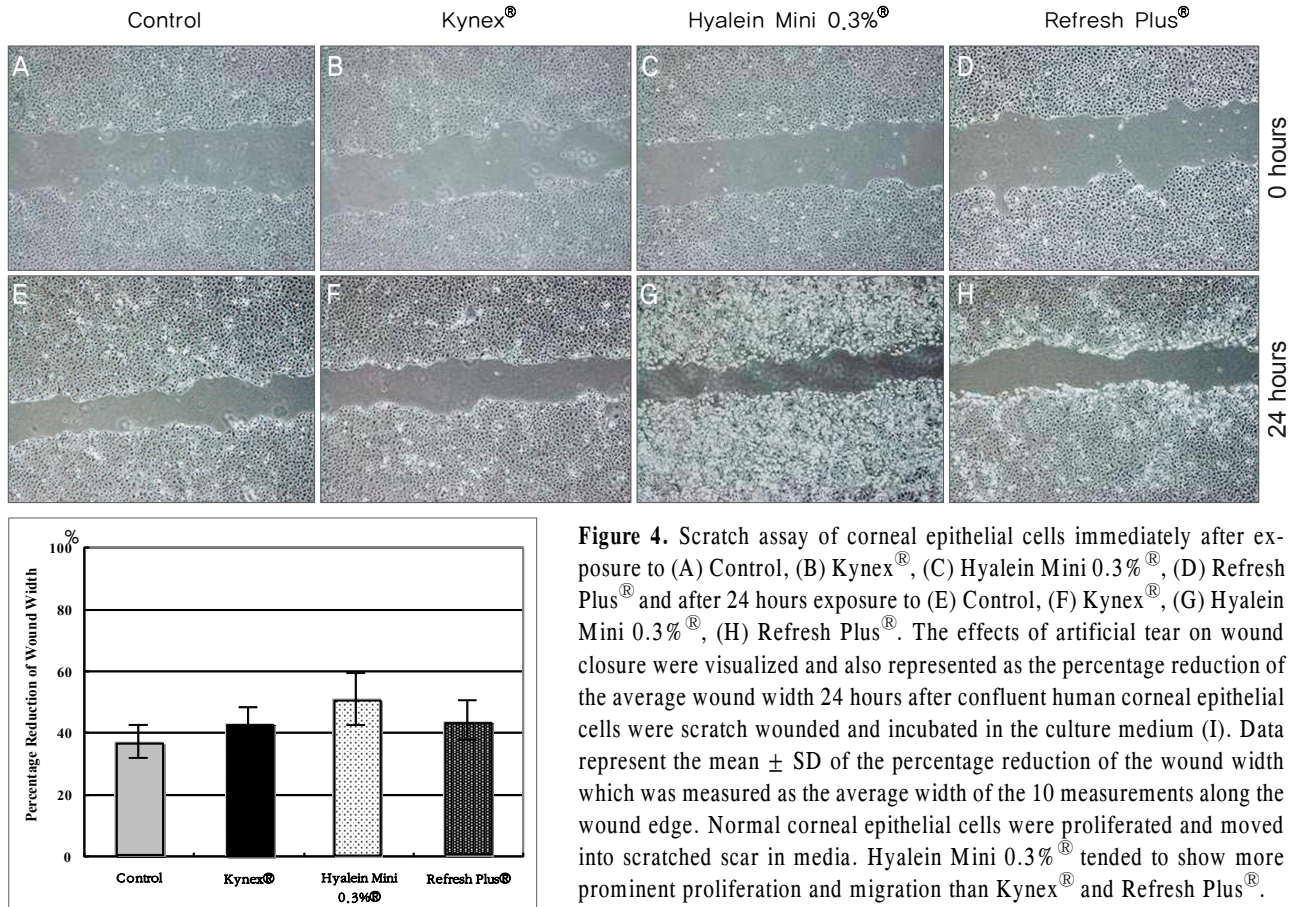


Figure 4. Scratch assay of corneal epithelial cells immediately after exposure to (A) Control, (B) Kynex®, (C) Hyalein Mini 0.3%, (D) Refresh Plus® and after 24 hours exposure to (E) Control, (F) Kynex®, (G) Hyalein Mini 0.3%, (H) Refresh Plus®. The effects of artificial tear on wound closure were visualized and also represented as the percentage reduction of the average wound width 24 hours after confluent human corneal epithelial cells were scratch wounded and incubated in the culture medium (I). Data represent the mean \pm SD of the percentage reduction of the wound width which was measured as the average width of the 10 measurements along the wound edge. Normal corneal epithelial cells were proliferated and moved into scratched scar in media. Hyalein Mini 0.3% tended to show more prominent proliferation and migration than Kynex® and Refresh Plus®.

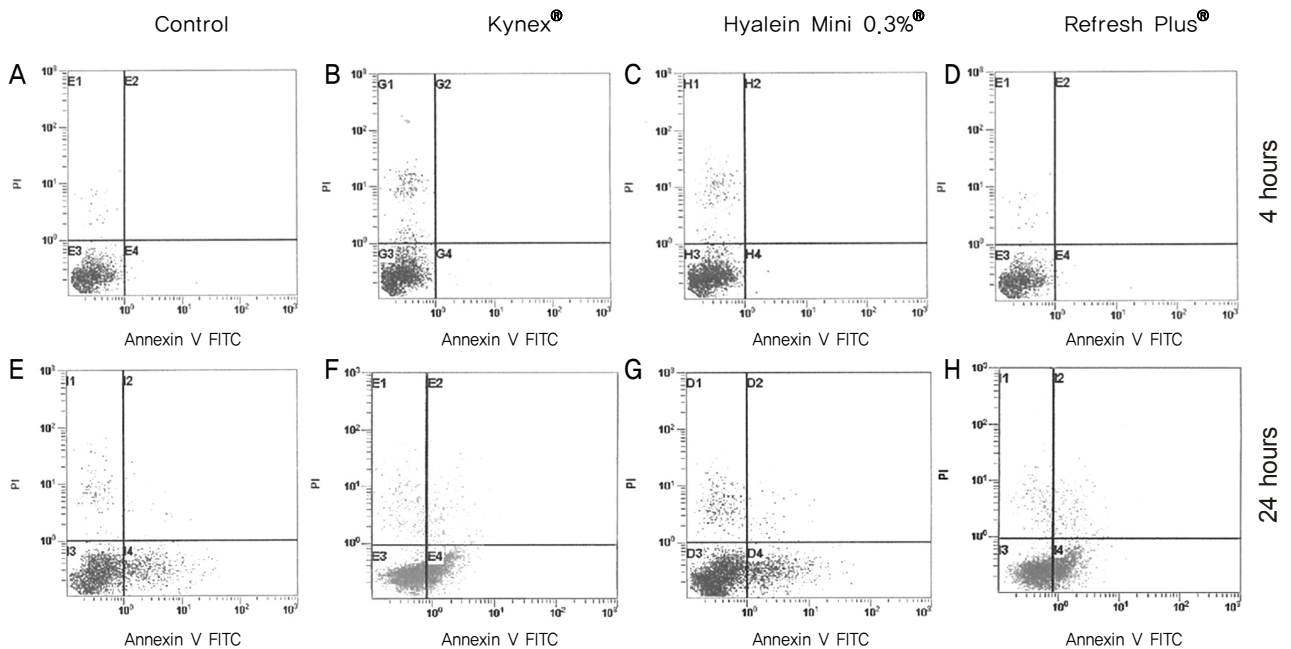


Figure 5. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V FITC after 4-hour exposure to (A) Control, (B) Kynex®, (C) Hyalein Mini 0.3%, (D) Refresh Plus® and after 24 hours exposure to (E) Control, (F) Kynex®, (G) Hyalein Mini 0.3%, (H) Refresh Plus®. After 24-hour treatment with artificial tear, a number of cells are positive Annexin V and negative PI (F, G, H) indicating that the cells were in the stage of apoptosis.

Table 1. The ingredient, electrolyte composition, pH and osmolarity of the three commercial preservative-free artificial tear

| Artificial tear | Chief ingredient | Na ⁺ (mEq/L) | K ⁺ (mEq/L) | Cl ⁻ (mEq/L) | pH | Osmolarity (mosm/kg) |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|-------------------------|
| Kynex [®] | Sodium hyaluronate 0.1% | 129.4 | 16.38 | 133.6 | 5.5 | 284 |
| Hyalein Mini 0.3% [®] | Sodium hyaluronate 0.3% | 133.6 | 15.43 | 131.9 | 5.5 | 284 |
| Refresh Plus [®] | Carboxymethylcellulose 0.5% | 155.8 | 17.94 | 124.9 | 5.5 | 303 |

kg, Refresh Plus[®] 303 mosm/kg로 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

고 찰

안구건조증은 눈물막의 증가된 삼투압과 안구표면의 염증으로 인하여 눈의 불편감, 시각장애, 눈물막의 불안정성을 유발하는 눈물과 안구 표면의 다요소적 질환으로 알려져 있다. 이 때 기본적으로 1차적인 치료는 인공누액을 점안하는 것인데, 경한 안구건조증인 경우에는 하루에 3~4회 점안으로 증상을 경감시킬 수 있지만, 심한 경우에는 보다 자주 인공누액을 점안해야 효과를 볼 수 있다.⁸ 따라서 심한 안구건조증 환자에게는 보존제의 독성을 고려하여, 무방부제 인공누액이 널리 사용되고 있는데, Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®]가 대표적인 약제로 사용되고 있다.

Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®]의 주성분인 염화 히알루론산(Sodium hyaluronate)은 점탄성질을 가지고 있는 글리코사미노글리칸의 하나로 N-acetyl-D-glucosamine과 sodium-D-glucuronate로 구성된 이당체 단위가 반복적으로 이루어져 있다.⁹ 국소 점안 시 각막상피세포의 이동을 촉진시켜 창상치유를 향상시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며,¹⁰⁻¹² Chung et al^{13,14}은 각막 알칼리 화상 후에 국소 점안할 경우 다핵형 백혈구의 침윤을 억제하고 상피세포의 결손부위를 막아 줌으로써 창상치유에 기여한다고 보고하였고, 농도가 높을수록 각막상피세포의 창상 회복 속도가 빠르다고 하였다. 본 연구의 경우도 hyaluronic acid의 농도가 0.1%보다는 0.3%에서 각막상피세포의 이주현상이 보다 뚜렷하게 나타났다.

카르복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose) 또한 각막 상피세포의 창상회복에 기여한다고 보고되고 있는데,¹⁵⁻¹⁷ 각막상피세포의 부착과 이주, 재상피화를 촉진시켜 창상회복을 향상시키는 것으로 알려져 있다.¹⁶ 본 연구에서 MTT 분석법을 통해 세포의 흡광도를 측정한 결과 약제에 노출되는 시간이 증가하더라도 Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®] 경우 대조군에 비해 의미 있는 세포 대사 활성도의 감소를 보이지 않았다. Migration assay상 배지에 만들어 놓은 콜라겐 막 위쪽으로 세포가 이주해 오는 정도

는 0.3% hyaluronic acid 성분인 Hyalein Mini 0.3%[®]가 가장 현저하였고, 0.5% carboxymethylcellulose 성분인 Refresh Plus[®]가 그 뒤로, 0.1% hyaluronic acid 성분인 Kynex[®]에서 이주된 세포수가 가장 적은 경향을 보였다.

Scratch assay는 배지에 생긴 창상부위로 정상 각막상피세포가 자라 들어오는 것을 관찰하여, 세포의 창상 회복 능력을 보는 것인데, 세 약제 모두 정상적으로 창상 회복이 이루어졌으나, Hyalein Mini 0.3%[®]에 접촉한 경우 정상각막상피세포의 이동이 가장 현저하였고, 그 다음으로 Refresh Plus[®]와 Kynex[®]의 경우는 세포의 이주가 유사하게 나타났으나, 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다. Carboxymethylcellulose의 경우 농도가 0.5%로 높으나, 0.1% 농도의 hyaluronic acid 약제와 세포의 이주현상이 유사하게 나타났으므로, hyaluronic acid의 창상회복 능력이 더 우수함을 예상해 볼 수 있으며, 농도를 동일하게 하여 성분별 세포증식력 및 창상회복능력에 대한 연구가 필요할 것이다.

LDH 역가 분석 결과 Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®] 모두 시간이 지날수록 LDH 역가가 증가하는 양상을 보였으나, 모든 역가가 1.0 이하로 유지되어 세포 손상이 비교적 적은 것으로 나타났다. Kynex[®]의 경우 Hyalein Mini 0.3%[®]과 Refresh Plus[®]보다 LDH 역가가 낮은 경향을 보여 세포 손상이 더욱 적음을 알 수 있었다.

약제에 의한 세포의 독성은 크게 세포괴사와 세포자멸사로 나누어지는데, 인공누액의 경우 세포 손상은 주로 세포자멸사로 이루어지며, 이는 염증반응과 연관되어 초기에 발생하고, 유기체내 항상성의 유지, 감염, 창상 치유의 과정에 주로 관여한다.^{18,19} 약제에 의한 세포자멸사 유도를 확인하고자 본 연구에서는 세 가지 인공누액에 의해 나타나는 세포자멸사의 반응 정도를 Annexin V와 PI를 이용한 유세포 분석의 결과로 분석하였다. 각막상피세포는 3가지 약제 모두 노출 후 24시간째 세포자멸사 현상이 나타났으며, 일부 세포괴사 소견도 함께 관찰되었다. 대조군에서도 세포자멸사 및 세포괴사가 함께 나타나 배양 조건 자체가 손상을 유도하는 것이 예상되므로 추가적인 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 등

이 있다.¹ 특히 전해질과 삼투압이 안표면 세포의 기능 이상을 야기하는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다.²⁰ 일반적으로 점안약에 포함되어 있는 전해질은 Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} 등이 있는데, 본 연구에서 K^+ 은 세포손상에 영향을 일으킬 정도의 차이를 보이지 않았다. 세포외액에서 적정 농도로 알려져 있는 Na^+ 142~152.7 mEq/L, Cl^- 104.0~117.4 mEq/L²¹와 큰 차이가 없었고, 세 약제 간에도 의미 있는 차이를 보이지 않아, 세포 손상에 큰 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

삼투압의 불균형 또한 세포 기능의 손상을 야기할 수 있다. 일반적으로 세포에 손상을 주지 않는 삼투압은 260~320 mosm/kg로 알려져 있는데²², Kynex[®]와 Hyalein Mini 0.3%[®]는 284 mosm/kg로 동일한 삼투압을 보였고, Refresh Plus[®]는 303 mosm/kg로 측정되어 모두 정상 범위였으나, 같은 삼투압을 가진 Kynex[®]와 Hyalein Mini 0.3%[®]에서 세포 손상의 정도가 다르게 나타나 hyaluronic acid 농도 차이 나 다른 요인들도 세포손상에 관여함을 짐작할 수 있어 보다 정밀한 관찰 및 검사가 필요한 것으로 생각된다.

세포외액의 pH가 7.0~7.7 범위일 때 세포의 생명 현상이 유지되므로 점안약의 pH도 세포의 손상에 영향을 미치는 요인으로 볼 수 있는데,²³ 세 약제 모두 5.5로 약산성으로 나타나 세포손상의 차이에 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다.

본 연구에서 살펴본 것과 같이 현재 임상에서 안구 건조증 환자에서 사용되고 있는 일회용 인공누액 제재인 Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], Refresh Plus[®]는 각막상피세포에 미치는 영향이 적어 안전하게 점안할 수 있고, 각막상피 손상이 있는 경우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 향후 약제의 주성분 자체의 약동학적 연구조사 및 임상적 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

- 1) Ayaki M, Yaguchi S, Iwasawa A, Koide R. Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells and conjunctival epithelial cells. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36:553-9.
- 2) Tonjum AM. Effects of benzalkonium chloride upon the corneal epithelium studies with scanning electron microscopy. *Acta Ophthalmol* 1975;53:358-66.
- 3) Burstein NL. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. *Surv Ophthalmol* 1980;25:15-30.
- 4) Burstein NL. Preservative cytotoxic threshold for benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate in cat and rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19:308-13.
- 5) Collin HB, Grabsch BE. The effect of ophthalmic preservatives on the healing rate of the rabbit corneal epithelium after keratectomy. *Am J Ophthalmol Physiol Opt* 1982;59:215-22.
- 6) Mosmann TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 7) Garrett Q, Simmons PA, Xu S, et al. Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1559-67.
- 8) Berdy GJ, Abelson MB, Smith LM, George MA. Preservative-free artificial tear preparations; assessment of corneal epithelial toxic effects. *Arch Ophthalmol* 1992;110:528-32.
- 9) Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:109-12.
- 10) Miyauchi S, Sugiyama T, Machida A, et al. The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol* 1990;6:91-9.
- 11) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronate stimulate corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 1991;53:753-8.
- 12) Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88:821-5.
- 13) Chung JH. Experimental corneal alkali wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl* 1988;187:1-35.
- 14) Chung JH, Fargherholm P, Lindstrom B. Hyaluronate in healing of corneal alkali wound in the rabbit. *Exp Eye Res* 1989;48:569-76.
- 15) Garrett Q, Xu S, Simmons PA, et al. Carboxymethyl cellulose stimulate rabbit corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res* 2008;33:567-73.
- 16) Garrett Q, Simmons PA, Xu S, et al. Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1559-67.
- 17) Ahee JA, Kaufman SC, Samuel MA, et al. Decreased incidence of epithelial defects during laser in situ keratomileusis using intraoperative nonpreserved carboxymethylcellulose sodium 0.5% solution. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:1651-4.
- 18) 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.
- 19) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
- 20) Wee WR, Wang XW, McDonnell PJ. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. *Cornea* 1995;109:860-3.
- 21) Park YS. Physiology of body fluid. In: Kang DH, ed. *Physiology*, 5th ed. Seoul: Sin-Kwang publishing & printing, 2000;chap.5.
- 22) Freshney RI. *The culture environment: Substrate, gas phase, medium, and temperature*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1987;70-1.
- 23) Kim K. Acid-base balance. In: Sung HK, Kim KH, eds. *Physiology*, Seoul: Eui-hak publishing & printing, 1996;326-7.

=ABSTRACT=

Effect of Preservative-free Artificial Eye Drop on Human Corneal Epithelial Cell *in vitro*

Su Jin Kim, MD¹, Eun-Hee Kim, MD², Ji-Eun Lee, MD, PhD¹, Jong Soo Lee, MD, PhD¹

*Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine, Medical Research Institute,
Pusan National University Hospital¹, Busan, Korea*

Department of Ophthalmology, St. Mary's Hospital², Busan, Korea

Purpose: To investigate the biologic effects of preservative-free artificial tear drops on cultured human corneal epithelial cells *in vitro*.

Methods: Efficacies of the preservative-free artificial tear drops-Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], and Refresh Plus[®]-were evaluated using the MTT assay. Cell damage was determined using the lactate dehydrogenase (LDH) assay. Cellular proliferation was determined using a migration and wound-healing assay. The ingredients of the drugs were analyzed. Apoptotic response was evaluated with flow cytometric analysis.

Results: Metabolic activity of the corneal epithelial cells showed similar activity to that of the control. Cellular migration and proliferation also were not significantly different between the preservative-free artificial tear drop groups and the control. The LDH titers tended to increase for up to 24 hours after exposure to the preservative-free artificial tear drops, but there was no significant difference in LDH titers between the control groups and the artificial tear drop-treated groups. Apoptosis and necrosis were observed using flow cytometry at 24 hours in all groups. The electrolyte levels, pHs and osmolarities of the three drugs were not significantly different.

Conclusions: The clinically available preservative-free artificial tear drops Kynex[®], Hyalein Mini 0.3%[®], and Refresh Plus[®] had no significant toxic effects on corneal epithelial cells and thus can be used safely.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(8):1113-1120

Key Words: Corneal epithelial cell toxicity, LDH, MTT, Preservative-free artificial tear

Address reprint requests to **Jong Soo Lee, MD, PhD**

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