

겔형태 인공누액이 각막실질세포 및 결막상피세포에 미치는 영향

이종수¹ · 김은희² · 김수진¹ · 이지은³ · 김나미¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 부산성모병원², 양산부산대학교병원³

목적: 겔형태 인공누액이 인체각막실질세포 및 결막상피세포에 미치는 영향을 비교하고자 하였다.

대상과 방법: 인체 각막실질세포 및 결막상피세포를 배양하여 Soothe[®], Systane[®] 농도별로 접촉 후 MTT 분석법으로 세포 생존율, 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법으로 세포손상정도를 측정하였다. 세포자멸사 유무 확인 위해 형광현미경 및 유세포 분석을 시행하고 전자현미경상 세포형태학적변화를 관찰하였다.

결과: Soothe[®]와 Systane[®]에서 약물농도가 높을수록, 접촉시간이 길수록 각결막세포의 증식억제력이 증가되었다. 각결막세포 모두에서 Soothe[®]는 노출시간과 농도에 비례하여 높은 LDH가 측정되나 Systane[®]은 안정적이었다. 두 약제 모두 형광현미경상 세포사소견을 보였고 유세포분석상 세포자멸사를 보였다. Soothe[®]에 비해 Systane[®]에서 세포형태학적 손상이 경미하였다.

결론: Soothe[®]와 Systane[®]의 각막실질세포 및 결막상피세포 증식억제는 세포자멸사와 연관 있으며, 약물의 농도 및 노출시간에 비례하여 심하게 나타났고, Systane[®]이 Soothe[®]보다 각결막세포에 미치는 손상이 적었다.

〈대한안과학회지 2010;51(12):1643-1651〉

안구건조증은 임상에서 흔히 볼 수 있는 질환이며¹ 일반적인 치료 방법으로는 인공누액 점안, 스테로이드 점안, 사이클로스포린 투여, 치료용 콘택트렌즈 착용, 보호안경의 착용, 눈물점 폐쇄 등이 있고 보통 인공누액 점안이 기본적으로 행하여지고 있다.²⁻⁴ 이러한 안구건조증의 원인으로는 눈물층 중 수성층의 부족, 점액층의 부족, 마이봄샘 질환에 의한 지질층의 부족, 그리고 다른 여러 가지의 경우로 생각할 수 있다.³ 그 중 눈물막의 불안정성은 안구 건조증의 중요한 요인 중 한 가지로 지질층의 두께가 눈물막의 안정성과 연관성이 매우 높다.⁵ 이러한 지질층의 두께를 증가시키고 눈물막의 안정성을 향상시키는 목적으로 최근 Soothe[®] (Alimera Science, Inc., Alpharetta, GA, USA)와 Systane[®] (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX, USA)이 개발되어 임상에 사용되고 있다. Soothe[®]는 oil-in-water emulsion으로 지질층을 두텁게 하여 강화시키는 약제이고,⁶ Systane[®]은 hydroxypropyl guar (HP-guar)와 윤활성분인

polyethylene glycol 400, propylene glycol로 구성되어 pH 7.5 정도의 염기성인 안구표면에 점안 시 봉산과 교차결합 후, 젤과 같은 기질을 형성하게 되어 안구표면 점액층을 보완한다. 특히 점액 성분이 부족한 안구건조증의 경우 점액성을 보강하여 주기에 안구 표면의 윤활 및 보존 기능을 함으로써 안구건조증 증상 완화에 유의한 효과가 있다고 알려져 있다.⁷⁻¹⁰

인공누액은 장기간 사용되는 점안약이므로 결막 및 각막 등에 독성이 가능한 적어야 한다. 또한 안구건조증 환자에서 각막찰과상이 있거나 상피층의 결손이 종종 동반되며 이 경우 점안되는 약제의 투과성이 증가하여 각막실질세포에 미치는 영향이 더욱 크게 작용할 수 있다. 뿐만 아니라 인공누액은 각막상피가 외상으로 벗겨진 경우, 각막궤양으로 상피가 손상된 경우에 보조적으로 사용될 수 있으므로 약제들의 각막실질세포에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다. 아직 국내에는 이 약제들의 농도 및 노출 시간에 따른 각막실질세포 및 결막상피세포에서의 영향과 연관된 연구는 없다. 이에 저자들은 Soothe[®]와 Systane[®]의 독성 유무 및 세포변화를 관찰하고자 배양된 인체의 각막실질세포 및 결막상피세포를 이용하여 약제의 농도와 접촉시간에 따라 MTT 분석법으로 세포의 대사력을 측정하고 젖산탈수소효소 분석법(lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay)을 시도하였으며, 유세포분석기 및 형광현미경을 이용하여 세포자멸사 반응을, 전자현미경을 통해 형태학적 변화를 비교하고자 하였다.

■ 접 수 일: 2009년 11월 10일 ■ 심사통과일: 2010년 10월 25일

■ 책임저자: 이 종 수

부산광역시 서구 구덕로 305
부산대학교 의학전문대학원 안과학교실
Tel: 051-240-7323, Fax: 051-242-7341
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

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

대상과 방법

1. 세포배양과 처치

각막실질세포의 경우, 각막이식에 필요한 공여각막을 사용하고 남은 주변부의 각막조직을 이용하여 endothelium-free explant method로 계대 배양시켰다. 먼저 멸균 상태에서 10% fetal bovine serum, 5% chondroitin sulfate, 아미노산이 함유된 배지 EMEM/NEAA (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 2 cc를 60 mm 크기의 조직배양접시 (Corning, NY, USA)에 넣은 후 고르게 배지가 바닥에 묻도록 하였다. 각막이식을 사용하고 남은 공여각막의 주변조직을 멸균상태에서 12 mm² 크기로 절제하고 각막의 내피층과 상피층을 knife로 제거한 후, 각막상피층의 면이 배양접시의 바닥쪽으로 오게 하고 조직이 배지에 충분히 잠기도록 얹어 놓았다. 그리고 37°C, 5% CO₂-95% air 보육기에 넣고 세포가 충분히 자랄 때까지 배양액을 주면서 세포를 발육시켰다. 세포가 충분히 자랐을 때(confluence), 배지를 완전히 제거하고 0.25% trypsin-0.02% EDTA를 처리하여 세포를 배양접시로부터 분리시킨 후, 배양액을 약 5 cc 정도 넣고 피펫으로 바닥면에 부착된 세포를 분리시켰다. 각막실질세포가 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 각막간질 세포 5×10³ cell/mL이 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 μL씩 심은 후 37°C, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 이때 세포수가 너무 뾰뾰할 경우 각 약물에 의한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 각막실질세포가 80~90% 정도 성장할 때까지 4~5일 정도 배양시켰다. 모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였다.

결막상피세포의 경우, 인체의 결막조직을 채취하여 transfer media에 담아 실험실로 옮긴 후 25 cm² flask에 배양시켰다. 2×2 mm의 크기로 결막조직을 절제한 후 배양접시에 외이식법으로 배양하였는데, 배양액으로는 10% 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 배양기에서 결막상피세포를 3일간 배양하였다. 나머지는 각막과 동일한 방법으로 진행하였다.

2. MTT 분석법을 사용한 세포의 흡광도 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, USA)를 이용한 분석법을 사용하였는데,¹³ 이 방법은 노란색의 tetrazolium salt가 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것이다. 생존하고 있는 세포 즉, 대사작용이 왕성한 세포내의 미토콘드리아에서 형성되는 formazan 화합물의 흡광도를 이용하여 생존하는 세포율을 측정하는 방법이다.

흡광도 측정을 위해 5 mg의 MTT 용액을 PBS 1 mL에 녹여 0.2 μm syringe filter로 거른 후 DMEM 배지에 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배지를 140 μL 정도 제거한 후 MTT 용액을 100 μL 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층을 110 μL 제거한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide: Sigma, St. Louis, USA)를 100 μL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이러한 과정들을 3회 반복하여 점안액 10, 20, 30% 농도로 30분, 4, 12, 24시간에 따라 측정된 흡광도의 평균을 구하여 각 세포의 생존율을 구하였는데, 세포 생존률은 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).

3. 약제의 농도 및 노출시간에 따른 LDH Assay

Soothe[®]와 Systane[®] 두 가지 약제는 96 well 배지의 전체 양 200 μL에서 각각 10, 20, 30% 농도가 되도록 점안액을 배지액에 넣은 후 각각 30분, 4시간, 12시간, 24시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였고, 대조군으로 평형염액(Balanced salt solution)을 처리하여 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다. 모든 실험군과 대조군은 각각 10개의 배양된 각막 및 결막세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 유의 수준은 95% 수준이었고, ANOVA 검사법을 사용하였다.

4. 유세포 분석기를 이용한 세포자멸사 비교

세포자멸사를 확인하기 위해 배양액에 세포가 5×10⁵ cell/mL

이 되도록 부유시킨 후 세포를 증식시켜 10, 20, 30% 농도의 약제를 각각 30분, 4시간 접촉시킨 후 반응을 관찰하였다. 트립신을 이용하여 세포를 원심 분리시킨 후 4℃에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리시켜 세포를 대상으로 binding buffer 200 μ L 넣고 씻은 후 다시 5분간 4℃에서 12,000 rpm으로 원심분리시킨다. 이런 과정을 한번 더 시행한 후 세포자멸사에 빠진 세포를 정량화하기 위하여 pro-pididium iodide (PI) 5 μ L와 FITC-labeled annexin V 10 μ L를 각각 첨가시켰다. 15분간 암실에서 둔 후 완충액으로 씻은 후 이중 색상 유세포분석(two-color flow cytometry)을 시행하였다. 이 때 세포자멸사(apoptosis)에 빠진 세포들은 annexin V에만 반응을 나타내고, 세포괴사(necrosis) 상태의 세포는 annexin V와 PI에 모두 양성을 나타내며, 이들 각각의 세포분율을 구하였고, 통계학적 유의성을 비교하였다(Student's *t* test, $p < 0.05$). 유세포 분석은 CYTOMICS FC500[®]×(BECKMAN COULTER, USA)를 이용하였다.

5. 형광현미경을 이용한 세포자멸사 확인

세포자멸사를 확인하기 위해 Lab-Tek[®] Chamber SlideTM system (No 177380, Sigma, USA)을 이용하여 각결막세포에 10, 20, 30% 농도의 약제를 30분, 4시간 노출시킨 후 반응을 관찰하였다. Binding buffer로 씻은 후 200 μ L 용량의 binding buffer에 propidium iodide (PI) 5 μ L와 FITC-labeled annexin V 10 μ L의 농도를 첨가하여 슬라이드에 떨어뜨려 접촉시킨다. 슬라이드가 마르지 않게 암소에 15분간 반응시킨 후 binding buffer로 재차 씻고 2% 포름알데히드로 5분간 고정시키고, cover slip을 사용하여 덮은 후 형광현미경으로 200배의 배율로 관찰하였다.

6. 약제에 따른 세포의 형태학적 변화 관찰

10, 20, 30% 농도의 약제에 4시간 노출 후 세포의 형태학적인 변화를 관찰하였다. 그 방법은 배양액에 약제 노출된 각각의 각결막세포를 각각 5×10^3 cell/ml이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μ L씩 분 seeding한 후 37℃, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 군의 각막실질세포 및 결막세포들은 0.1 M sodium cacodylate buffer로 씻어내고, 약 2시간 동안 Karnosky fixative (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 0.1 M sodium cacodylate buffer)에 고정시킨 후 0.1 M sodium cacodylate buffer로 3차례에 걸쳐 세척한 후 세포를 osmium tetroxide로 고정시키고 계열 ethanol 용액으로 탈수한 후 Epon으로 포매하였다. 60~

80 nm의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색시켜 투과전자현미경(JEOL, 1200 EX, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

결 과

1. MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 측정

DMEM 배지를 이용하여 Soothe[®]와 Systane[®]의 각막실질세포 및 결막상피세포의 세포대사능력을 측정한 결과, 두 약제 모두에서 농도가 증가할수록, 노출시간이 길어질수록 세포대사력이 낮게 측정되고 세포 증식이 억제되는 경향을 보였다.

각막실질세포에서 Soothe[®]는 4시간 노출 시 20%, 12시간 이상 노출 시 10% 농도부터 50%이상 세포활성도가 저하되었다. 그러나 Systane[®]은 각막실질세포 대사력이 완만하게 감소하였으며, 12시간 이상 노출 시 30% 농도에서만 50% 이상의 억제력을 보였다(Fig. 1).

결막상피세포에서는 Soothe[®]는 4시간 노출 시 30%, 12시간 이상 노출 시 20%의 농도부터 50% 이상의 억제력이 나타났고, Systane[®]은 노출 시간이 길수록, 노출 농도가 높을수록 결막세포 대사력이 서서히 감소하였으나 50% 이상의 억제력을 보인 경우는 없었다(Fig. 2).

2. 약제의 농도 및 노출시간에 따른 LDH Assay

각막실질세포와 결막상피세포 모두에서 Soothe[®]는 노출 시간이 길어질수록, 농도가 높을수록 LDH가 급격히 증가하는 양상을 보였으나 Systane[®]은 LDH 수치가 대조군과 비교하여 큰 변화가 없었다. 각막실질세포에서 Soothe[®]는 4시간 노출 시 30%, 12시간 이상 노출 시 10%의 농도부터 LDH가 급격히 증가하였으나, Systane[®]은 높은 농도 및 24시간 노출시간까지도 LDH 수치의 큰 변화가 없었다(Fig. 3). 배양된 결막상피세포에서 Soothe[®]는 4시간 노출 시 30%, 12시간 이상 노출 시 20%의 농도부터 LDH의 급격한 증가가 나타났으며, Systane[®]은 어느 농도에서도 24시간 노출까지 LDH 수치가 비교적 안정적이었다(Fig. 4).

3. 유세포 분석기를 이용한 세포자멸사 비교

대조군에서 PI 및 Annexin V에 음성을 보인 반면, Soothe[®]와 Systane[®]로 처리 시에서는 30분 노출시는 세포자멸사가 거의 관찰되지 않았고(Fig. 5), 4시간 노출 시부터 세포자

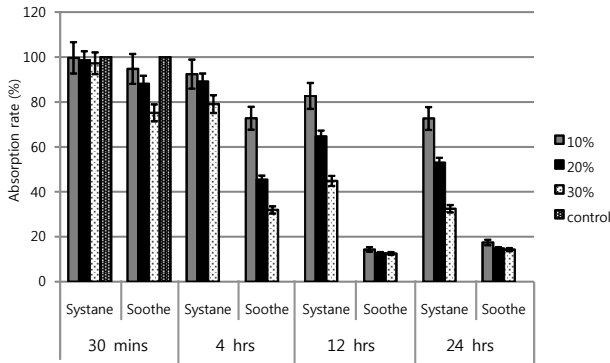


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in corneal keratocytes exposed in Soothe® and Systane® by a scanning spectrometer (ELISA reader). Metabolic activity of keratocytes was decreased, at the higher concentration and longer the exposure duration in both artificial tears. The survival rate of Systane® was higher value than that of Soothe®.

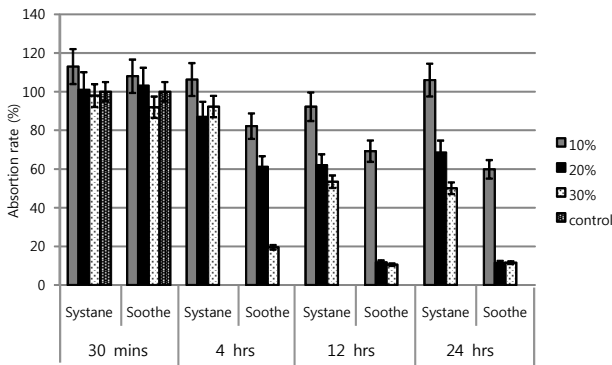


Figure 2. Metabolic activities of cultured human conjunctival epithelial cells showed the dose-response and time-response. Soothe® has more inhibitory effect than Systane®.

멸사가 관찰되었다(Fig. 6). Soothe®는 20% 농도 이상으로 4시간 노출 시 뚜렷한 세포자멸사를 보였고, Systane®은 30% 농도로 4시간 노출 시 뚜렷한 세포자멸사를 보였다. 그러나 대조군과 비교 시 의미 있는 세포자멸사의 변화 차이는 없었다.

4. 형광현미경을 이용한 세포자멸사 확인

대조군에서 보이는 방추형의 무형광인 각막실질세포에 비해 4시간 약물에 노출된 Soothe®와 Systane®의 경우 모두에서 핵막의 손상으로 인해 세포질 내로 유출된 DNA와 결합하여 형광을 발하는 세포자멸사를 관찰할 수 있었다. Soothe®는 결막상피 및 각막실질세포 모두에서 10% 농도로 4시간 노출 시부터 양성 형광반응을 보였고, Systane®은 결막상피 및 각막실질세포 모두에서 30% 농도로 4시간

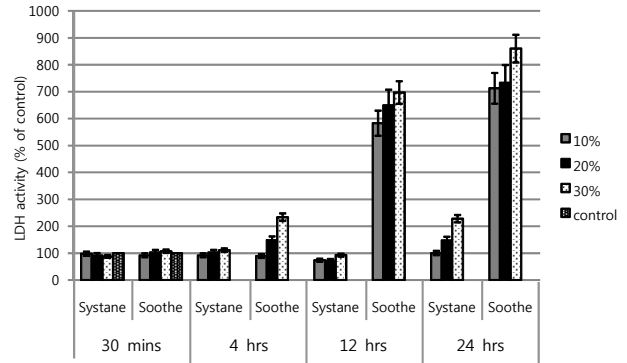


Figure 3. LDH activities of cultured human corneal keratocytes showed that Systane® didn't affect LDH activity significantly, but Soothe® has showed that by dose and time-dependent response relationship.

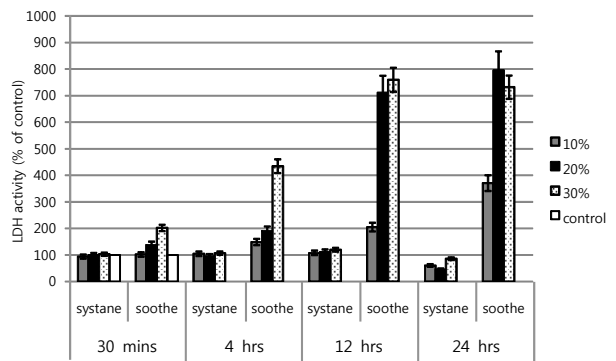


Figure 4. LDH activities of cultured human conjunctival epithelial cells in Soothe® and Systane®. Soothe® showed greater LDH titer of the conjunctival cells than that of Systane®, especially in the rate of dilution of 20 and 30% after 12 hours exposure.

노출 시에만 양성 형광반응을 보였다(Fig. 7).

5. 약제의 농도 및 노출시간에 따른 세포의 형태학적 비교

대조군에서 각막실질세포의 전자현미경적 소견은 정상적인 원형질막에 미세융모가 있으면서 세포질과 핵질의 분포가 균일하고 형태가 뚜렷하게 관찰되었다. 10% Soothe®에 4시간 접촉한 경우 정상적인 각막실질세포에 비해 원형질막의 미세융모가 소실되면서, 세포질내의 사립체 및 과립세포질의 확대, 소공형성이 관찰되었다. 20% Soothe®에 4시간 노출된 경우 핵막주변부의 핵질농축과 세포질내 소공화가 보이며, 세포자멸사의 초기 소견을 관찰할 수 있었다. Systane®의 경우 30%의 농도로 4시간 접촉 시부터 전자현미경상 원형질막의 미세융모 소실 및 세포질내 소공 등의 비정상적인 전자현미경 소견을 나타내었다(Fig. 8A, B, C).

결막상피세포의 경우 Soothe®는 4시간 노출 시 20% 농

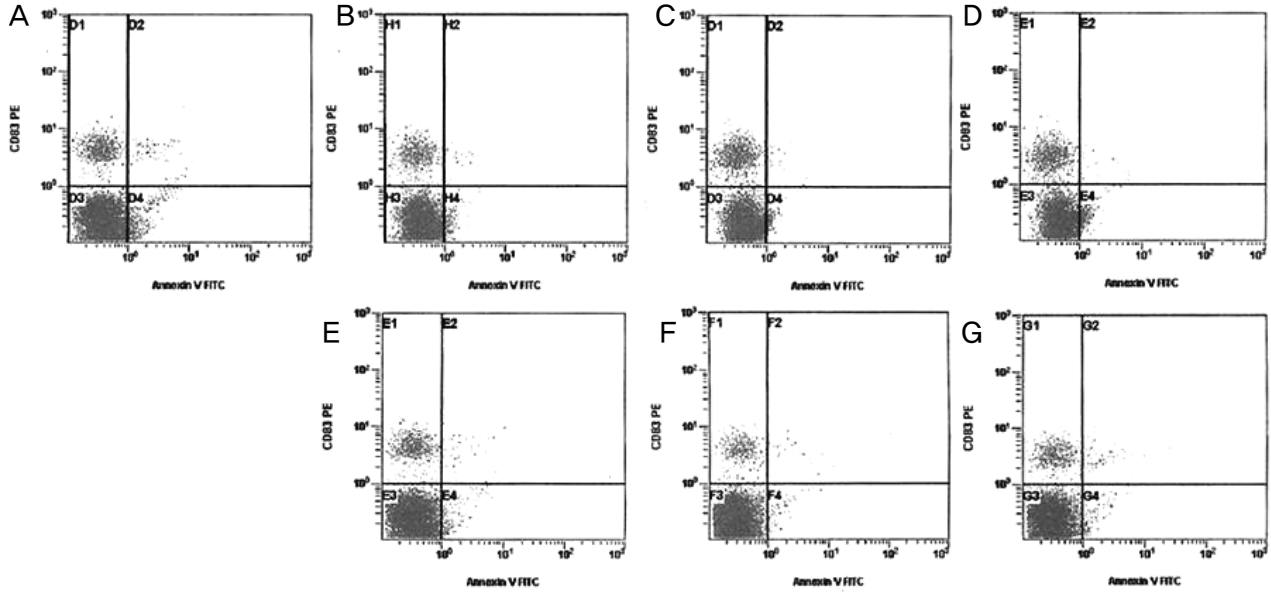


Figure 5. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V-FITC at 30 minutes after exposure. Human corneal keratocytes were left untreated (A) or were treated with 10% (B), 20% (C), and 30% (D) by Soothe®, were treated with 10% (E), 20% (F), and 30% (G) by Systane®. After 30 minutes exposure, most corneal keratocytes in both artificial tears were primarily Annexin V and PI negative.

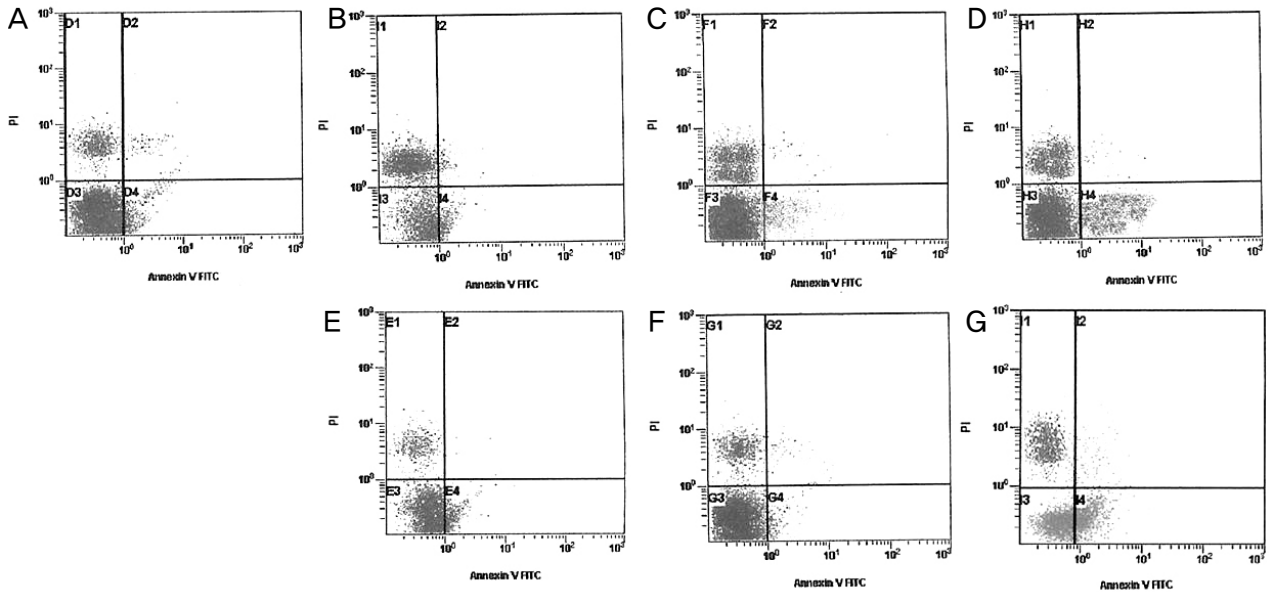


Figure 6. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V-FITC at 4 hours after exposure. Human corneal keratocytes were left untreated (A) or were treated with 10% (B), 20% (C), and 30% (D) by Soothe®, were treated with 10% (E), 20% (F), and 30% (G) by Systane®. After 20% Soothe®, 30% Soothe® and 30% Systane® exposure, a number of cells are positive Annexin V and negative PI (C, D, G) indicating that the cells were in the stage of apoptosis.

도부터 전자현미경상 세포질내 소공화 및 미세융모의 소실, 정상 구조의 불규칙화가 나타났으며, Systane®은 4시간 30% 농도에서부터 불규칙한 핵막, 무정형의 세포내 소기관 및 세포질내 소공형성을 보였다(Fig. 8D, E, F).

고 찰

안구건조증은 눈물분비의 감소 및 과도한 증발로 인한 눈물층의 질환으로 눈꺼풀 사이 안구표면에 손상을 가져와 안구자극증상을 일으키는 질환으로 정의된다.¹ 미국에서 30~60세 인구에서는 10%, 65세 이상의 인구에서는 15%

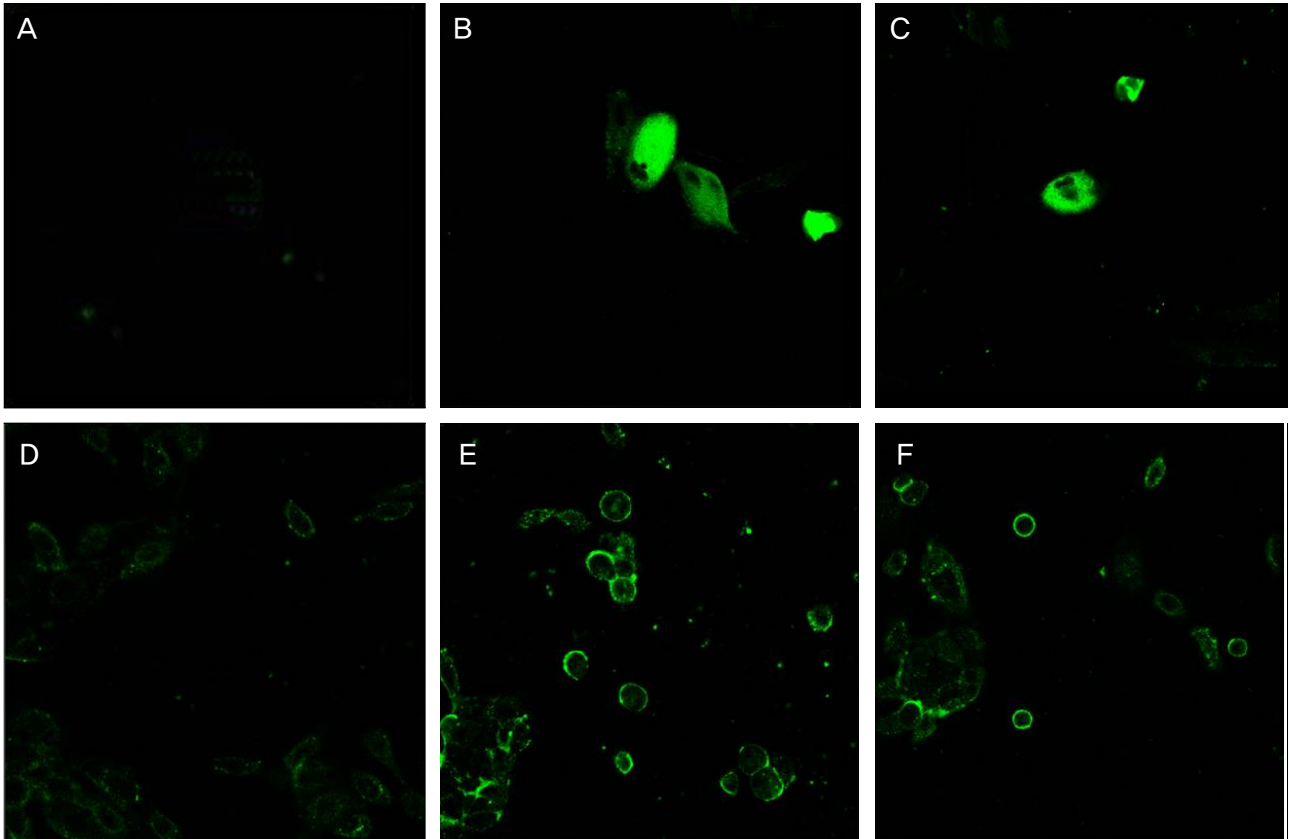


Figure 7. Fluorescent microscopic findings of human conjunctival epithelial cells (A, B, C) and corneal keratocytes (D, E, F) at 4 hours after exposure (original magnification, $\times 200$). (A, D) control. (B, E) 10% Soothe®. (C, F) 30% Systane®. After treating with Soothe® and Systane®, apoptotic cells were visible, which represent fluorescence after binding DNA flowing into cytoplasm due to disruption of nuclear membrane.

이상에서 나타날 정도로 흔한 질병이다.¹¹ 최근 제대혈청 점안 및 국소 테스토스테론 젤을 눈꺼풀 주위에 사용하는 등의 새로운 치료법이 소개되고 있지만,^{12,13} 기본적으로 사용하는 1차 치료는 인공누액을 점안하는 것이다. 임상에서 많은 종류의 인공누액이 사용되고 있으나 지질층에 영향을 미치는 인공누액으로는 Soothe®와 Systane®이 최근 외국에서 많이 사용되고 있다. 눈물막 파괴시간이 짧아진 안구 건조증의 경우 마이봄샘 질환 등에 의한 지질층의 이상, 점액층 결핍 등의 가능성이 높으며, 대부분의 인공누액은 지질층 두께를 감소시키는 반면,¹⁴ Soothe®와 Systane® 모두 지질층 두께를 증가시킨다. Soothe®은 두 배 이상으로, Systane®은 약 16%의 지질층의 두께를 증가시키기에 눈물막 파괴시간이 짧아진 안구 건조증의 경우 Soothe®와 Systane®의 임상적 유용성이 매우 효과적일 수 있다.^{15,16}

Soothe®는 2003년 승인된 점안약으로 새로운 지질 회복제(lipid restorative)인 Restoryl을 포함하여 지질층을 빠르게 회복시켜 조직 윤활을 증가시키고 눈물 증발을 감소시킨다. 반면, Systane®은 HP-guar와 borate 성분을 포함하여, pH에 관계한 polymerization mechanism을 통해 점안

시 교차결합(cross-link)을 유도하여 안구 표면에 보호장벽을 형성한다.¹¹ 이러한 약제들의 사용이 안구건조증에서 기존의 약제에 비해 특히 점액 성분이 부족한 안건조증의 증상과 증후를 더욱 호전시킨다는 보고들도 있다.¹⁶⁻¹⁸

장기간 사용하게 되는 인공누액의 독성에 관한 연구는 매우 중요하다. 현재까지 인체 각막 및 결막세포를 대상으로 하여 안약의 보존제에 대한 독성을 보고한 경우는 많다. Adams et al¹⁹ 흔히 상용되는 안약의 보존제 유무에 따른 세포생존율을 보고하였다. 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol)과 벤잘코니움클로라이드(benzalkonium chloride)의 보존제가 포함된 점안약, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(hydroxypropylmethylcellulose formulation) 계열, 보존제를 포함하지 않은 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol-based product), 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose based product) 순으로 각막상피세포의 손상이 나타났다. 또한 Berdy et al²⁰은 보존제가 없는 인공 누액제 (Hypotears®, Refresh®)에서 0.02% 벤잘코니움클로라이드(benzalkonium chloride)가 포함된 점안약에 비해 각막 상피세포의 독성이 적다고 발표하였다. Diebold et al²¹ 젤 형태의 인공누

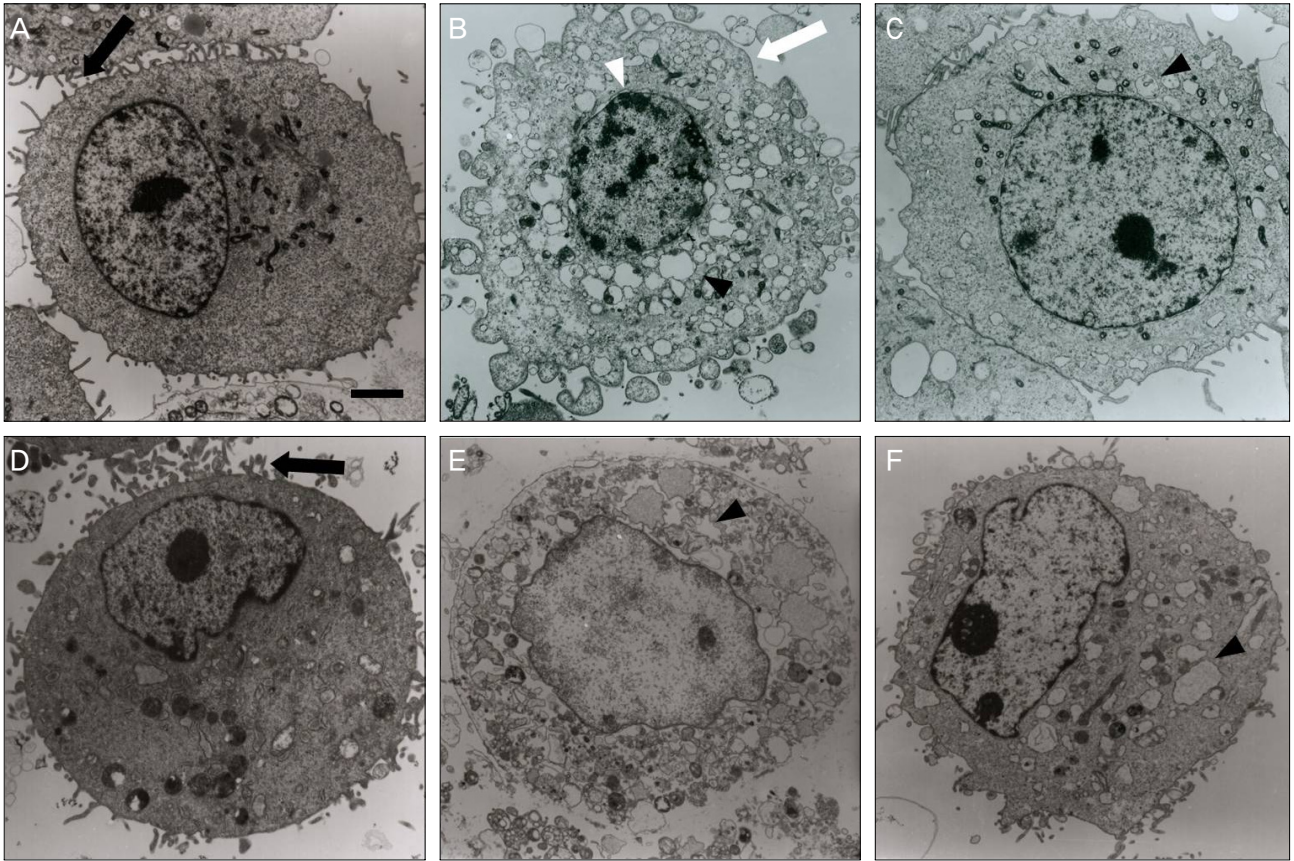


Figure 8. Transmission electron micrograph of human corneal keratocytes (A, B, C) and human conjunctival epithelial cell (D, E, F) appeared after 4 hours exposure to (A, D) control, (B, E) 20% Soothe®, (C, F) 30% Systane®. (Bar length 2 μ m, original magnification, $\times 3,000 \sim 4,000$). In general, the plasma membrane with microvilli (black arrow), nuclear membrane, and nuclei of corneal keratocytes were visible. 20% Soothe® had more severe and damaged cellular structures, such as the plasma membranes with microvilli being disrupted (white arrow), vacuoles enlarge (black arrow head). The chromatin of the nuclear remnant had condensed along the nuclear periphery (white arrow head). The keratocyte and conjunctival epithelial cell showed loss of microvilli, vacuoles formation suspected swollen cytoplasmic organelles at the cytoplasm (black arrow head) compared with control after 4 hours exposure to 30% Systane®.

액제와 기존의 인공누액제의 각막세포에 미치는 독성을 보고하였다. Carbomer gel formulation (Lacrisvisc®, Lacrisvisc unit-doses®, Viscotear®)와 카르복시메틸셀룰로오스 (carboxymethylcellulose, Celluvisc®, Cellufresh®)에서 전자가 각막 세포에 더 많은 독성을 나타내며, 30분의 짧은 노출시간에서 심한 독성이 나타났다.

그러나 눈물의 증발을 방지하는 오일 성분을 포함한 인공누액제인 Soothe®나 점액 성분을 대체하는 글리세린 인공누액제 Systane®에 의한 안표면에서의 독성은 거의 알려진 보고가 없다. 단지 Kasper et al²²은 Hydroxypropyl guar (HP-guar, 겔 형성 매질, gel forming matrix)와 보존제 Polyquad®가 혼합된 점안약 Systane®에서 안표면의 독성을 연구한 결과, 보존제가 있는 경우와 없는 경우 모두 HP-guar 성분의 점안약 사용 시 사람의 각막 및 결막 세포에서, 보존제가 없는 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스

(Hydroxypropylmethyl cellulose, HPMC)보다 낮은 ATP 활성을 나타냈다고 보고하였다.

본 연구에서 MTT solution을 이용한 세포생존율을 살펴보면, 두 약제 모두에서 농도가 높을수록, 노출시간이 길수록 세포생존율이 감소하였으며, Systane®에 비해 Soothe®에서 보다 현저한 세포생존율 감소를 확인할 수 있었다. LDH 효소 측정에서도 높은 농도, 긴 노출시간에서 역가가 증가하는 양상을 보이며, Systane®에 비해 Soothe®에서 LDH 활성이 유의하게 증가하였다. 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.^{23,24} 약제에 의한 세포자멸사 유도를 확인하고자 본 연구에서는 두 가지 점안약에 의해 나타나는 세포자멸사의 반응 정도를

Annexin V와 PI을 이용한 유세포분석의 결과로 분석하였다. 각막상피세포는 2가지 약제 모두 노출 후 4시간째 세포자멸사 현상이 나타났으며, Soothe[®]가 20%의 농도에서 세포자멸사가 측정되어, 세포 손상에 따른 LDH 역가와 관련이 있을 것으로 생각되지만, 세포 괴사소견은 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 또한 세포자멸사 현상을 형광현미경 소견으로도 입증하였는데, 초기에는 세포막에 Annexin V가 결합하여 초록형광을 나타내지만, 후기에는 세포핵에 PI가 결합하여 오렌지색 형광을 발하는 것으로서 대조군의 정상적인 결막상피 및 각막실질세포와 분명한 형광의 차이를 보였다. 본 연구의 결과에 의하면, Soothe[®]의 경우 결막상피와 각막실질세포 모두 10% 농도에서, Systane[®]의 경우 30% 농도에서 세포자멸사가 현저히 발생하여, Soothe[®]의 경우 Systane[®]에 비해 더 낮은 농도에서 세포자멸사를 일으킬 수 있음을 보여주었다. 전자현미경상 Systane[®]에 비해 Soothe[®]에서 세포들이 더 심한 손상을 받아 세포막이 파괴되고 과립세포질망이 확장되며, 미토콘드리아가 비대해진 모습을 보였으며, 미세용모가 소실되고 크로마틴이 핵의 주변부로 몰리는 변화가 현저하게 나타났다. 즉, Soothe[®]는 LDH 역가가 높을 뿐만 아니라, 세포 손상이 심하게 관찰되었다.

임상적으로 사용되는 점안약은 장기간 사용하거나 과량을 사용했을 때 보존제에 의한 안내 독성을 야기할 수 있는데, Soothe[®]는 polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB)가, Systane[®]은 polyquaternium (Polyquad[®])가 각각 보존제로 사용된다. Maller and Kramer²⁵는 benzalkonium (BAK), PHMB, cetylpyridinium chloride (CPC), chlorhexidine digluconate (CHX) 등의 세포독성을 비교 분석하였으며, 이 중 PHMB가 가장 세포독성이 심하고, CHX, BAK, CPC 순으로 세포독성이 덜하였다. Meloni et al²⁶은 Polyquad[®]와 BAK 보존제가 들어있는 인공누액에서 세포 생존능력을 비교하였고, BAK이 함유된 인공누액에서는 현저한 세포 생존능 감소를, Polyquad[®]가 포함된 인공누액에서는 중등도의 세포 생존능력 저하를 보고하였다. 이를 미루어 볼 때, 장시간 노출 시, PHMB 보존제가 포함된 점안약이 Polyquad[®]가 포함된 점안약보다 높은 세포 독성을 보이는 것으로 추정되며, 본 연구에서도 PHMB 보존제가 포함된 Soothe[®]와 Polyquad[®] 보존제가 포함된 Systane[®] 비교해 본 결과 유사한 소견이 나타났다. 즉, Systane[®]보다 Soothe[®]에서 인체 결막상피 및 각막실질세포의 세포손상이 크며, 유의한 결막 및 각막실질세포 증식 억제제를 알 수 있었고, 두 약제 모두 세포의 증식억제는 세포자멸사 작용과 연관성을 가지고 있음을 관찰할 수 있었다. 향후 이 약제들의 주 성분 자체의 약동학적 연구 및 임상적 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

- 1) Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. CLAO J 1995;21:221-32.
- 2) Perry HD, Donnenfeld ED. Dry eye diagnosis and management in 2004. Curr Opin Ophthalmol 2004;15:299-304.
- 3) Smith RE. The tear film complex pathogenesis and emerging therapies for dry eyes. Cornea 2005;24:1-7.
- 4) Balaram M, Schaumberg DA, Dana RD. Efficacy and tolerability outcomes after punctual occlusion with silicone plugs in dry eye syndrome. Am J Ophthalmol 2001;131:30-6.
- 5) Isreb MA, Greiner JV, Korb DR, et al. Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. Eye 2003;17:79-83.
- 6) Greiner JV, Glonek T. Treatment of dry eye with a metastable formulation containing lipids and dineric interfacial molecules. Presented at the American Academy of Ophthalmology Annual Meeting 2004.
- 7) Korb DR, Scaffidi RC, Greiner JV, et al. The effect of two novel lubricant eye drops on tear film lipid layer thickness in subjects with dry eye symptoms. Optom Vis Sci 2005;82:594-601.
- 8) Petricek I, Berta A, Higazy MT, et al. Hydroxypropyl-guar gellable lubricant eye drops for dry eye treatment. Expert Opin Pharmacother 2008;9:1431-6.
- 9) Christensen MT, Cohen S, Rinehart J, et al. Clinical evaluation of an HP-guar gellable lubricant eye drop for the relief of dryness of the eye. Curr Eye Res 2004;28:55-62.
- 10) Ubels JL, Clousing DP, Van Haitsma TA, et al. Pre-clinical investigation of the efficacy of an artificial tear solution containing hydroxypropyl-guar as a gelling agent. Curr Eye Res 2004;28:437-44.
- 11) Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among the elderly. Am J Ophthalmol 1997;124:723-8.
- 12) Woon KC, Im SK, Park YG, et al. Tear film and ocular surface changes after umbilical cord serum therapy in dry eye syndrome. J Korean Ophthalmol Soc 2005;46:237-42.
- 13) Heo H, Kang IS, Wu MH, et al. Therapeutic effect of topical testosterone gel in patients with dry eye syndrome. J Korean Ophthalmol Soc 2006;47:1259-65.
- 14) Trees GR, Tomlinson A. Effect of artificial tear solutions and saline on tear film evaporation. Optom Vis Sci 1990;67:886-90.
- 15) Korb DR, Scaffidi RC, Greiner JV, et al. The effect of two novel lubricant eye drops on tear film lipid layer thickness in subjects with dry eye symptoms. Optom Vis Sci 2005;82:594-601.
- 16) Hartstein I, Khwarg S, Przydryga J. An open-label evaluation of HP-Guar gellable lubricant eye drops for the improvement of dry eye signs and symptoms in a moderate dry eye adult population. Curr Med Res Opin 2005;21:255-60.
- 17) Sall KN, Cohen SM, Christensen MT, et al. An evaluation of the efficacy of a cyclosporine-based dry eye therapy when used with marked artificial tears as supportive therapy in dry eye. Eye Contact Lens 2006;32:21-6.
- 18) Gifford P, Evans BJ, Morris J. A clinical evaluation of Systane. Contact Lens Anterior Eye 2006;29:31-40.
- 19) Adams J, Wilcox MJ, Trousdale MD, et al. Morphologic and physiologic effects of artificial tear formulations on corneal epithelial derived cells. Cornea 1992;11:234-41.

- 20) Berdy GJ, Abelson MB, Smith LM, et al. Preservative-free artificial tear preparations Assessment of corneal epithelial toxic effects. Arch Ophthalmol 1992;110:528-32.
- 21) Diebold Y, Herreras JM, Callejo S, et al. Carbomer-versus cellulose-based artificial-tear formulations: morphologic and toxicologic effects on a corneal cell line. Cornea 1998;17:433-40.
- 22) Kasper K, Kremling C, Geerling G. Toxicity of a new moistening agent and preservative in vitro. Ophthalmologe 2008;105:557-62.
- 23) Adler R. Mechanism of photoreceptor death in retinal degeneration. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology or the 21st century. Arch Ophthalmol 1996;114:79-83.
- 24) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-62.
- 25) Muller G, Kramer A. Biocompatibility of index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother 2008;61:1281-7.
- 26) Meloni M, Pauly A, Servi BD, et al. Occludin gene expression as an early in vitro sign for mild eye irritation assessment. Toxicol In Vitro 2010;24:276-85.

=ABSTRACT=

Effects of Gel Type Artificial Tears on Human Corneal Keratocytes and Conjunctival Epithelial Cells

Jong Soo Lee, MD, PhD¹, Eun Hee Kim, MD², Soo Jin Kim, MD¹, Ji Eun Lee, MD, PhD³, Na Mi Kim, MD¹

Department of Ophthalmology, Pusan National University College of Medicine¹, Busan, Korea

Department of Ophthalmology, Pusan St. Mary's Medical Center², Busan, Korea

Department of Ophthalmology, Pusan National University Yangsan Hospital³, Busan, Korea

Purpose: To evaluate the biological effects and cytotoxicity of gel-type artificial tears on human corneal keratocytes and conjunctival cells *in vitro*.

Methods: Human corneal keratocytes and conjunctival epithelial cells were exposed to Soothe[®] and Systane[®] at variable concentrations. Evaluations were conducted through an MTT-based calorimetric assay to measure the metabolic activity and through a lactate dehydrogenase (LDH) assay to assess cellular damage. Apoptotic response was examined using fluorescent microscopy and flow cytometric analysis, and cellular morphologic results were evaluated with a transmission electron microscope.

Results: The inhibitory effects of corneal keratocyte and conjunctival cell proliferations increased at higher concentrations and longer exposure times to Soothe[®] and Systane[®]. The LDH titers increased after Soothe[®] exposure, but showed no significant difference after Systane[®] exposure. Soothe[®] and Systane[®] treatments both produced fluorescence, representing apoptotic cells. In flow cytometry, the maximal apoptotic response was observed for both types of artificial tears, although Systane[®] showed less edema, as well as reduced cytoplasmic and nuclear cell degeneration compared to those of Soothe[®].

Conclusions: The apoptotic responses of Soothe[®] and Systane[®] are associated with inhibitory effects of human corneal keratocyte and conjunctival epithelial cell proliferations. To inhibit the cellular proliferation of human corneal keratocytes and conjunctival epithelial cells, Systane[®] may be less severe than Soothe[®] at higher concentrations and longer exposure times.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(12):1643-1651

Key Words: Apoptosis, Human conjunctival epithelial cell, Human corneal keratocytes, Soothe[®], Systane[®]

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