

송아지 혈청 농도가 인체의 각막상피세포에 미치는 영향

이종수¹ · 김은희² · 김수진¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 부산성모병원 안과²

목적: 송아지 혈청 농도에 따른 인체의 각막상피세포의 증식력 및 독성에 관한 효과를 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인체각막상피세포를 일차 배양하여 송아지 혈청 10, 20, 30% 농도로 1, 4, 12, 24시간 동안 접촉시킨 후, MTT분석법을 이용하여 세포대사력을 비교하고, 각막상피세포에서 분비되는 IL-1 α , TGF- β 1, MMP-9 등의 생성량을 비교하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) assay를 이용하여 세포독성을 비교하고, 전자현미경을 이용하여 형태학적 변화를 관찰하였다.

결과: MTT상 혈청의 농도가 높을수록 세포 대사활성도가 감소하였고, LDH 역가는 접촉 시간이 길수록, 농도가 높을수록 증가하였다. IL-1 α 와 TGF- β 1, MMP-9의 경우 모든 농도에서 대조군에 비해 생성량이 감소되었다. 세포의 손상 정도는 핵막주변부의 핵질 농축과 세포질 내 구조물의 확대소견 등이 농도가 높을수록 뚜렷하게 나타났다.

결론: 송아지 혈청은 10% 농도에서 20%, 30%보다 각막상피세포의 대사력이 좋으면서 세포 독성이 적고 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향력도 효과적이어서 임상 적용에 유리할 것으로 생각한다.

<대한안과학회지 2011;52(7):852-858>

안구표면의 항상성 유지를 위해서는 정상 눈물막의 생성, 건강한 안부속기, 눈꺼풀테, 적절한 눈감박임 등의 상호 긴밀한 관계가 요구된다.¹ 그중에서 눈물에는 epidermal growth factor (EGF), vitamin A, transforming growth factor (TGF)- β 등 여러 영양 인자를 포함하고 있어 각결막 상피의 재생, 이주, 분화에 중요한 역할을 함으로써 안구 표면 상피의 건강을 유지하는 데 필수적인 역할을 한다.^{2,3} 안구 건조증의 치료에 가장 널리 사용되는 인공누액에는 눈물의 성분 중 안구표면 상피의 성장과 유지에 필수적인 성장 인자, 비타민, 면역글로불린 등이 포함되어 있지 않으며 여러 가지 보존제의 첨가로 인한 독성 효과가 발생할 수 있는 단점이 있다.⁴ 실제 이러한 최대한의 치료에도 불구하고 많은 환자들이 안구표면 변화에 의한 지속적인 증상을 호소하므로 이 경우 안구 표면 상피의 항상성 유지와 관련된 인자들이 포함되어 있는 자가 혈청의 점안이 도움이 될 수 있다.

자가혈청은 각결막 상피의 성장과 유지에 필수적인 EGF, vitamin A, TGF- β , fibronectin, insulin-like growth factor 1

(IGF-1), 여러 사이토카인 등을 포함하고 있어,^{5,6} 심한 안구 건조증, 지속각막상피결손 등의 여러 안구 표면 질환에서 자가혈청이 효과적으로 사용될 수 있다고 알려져 있다.⁵⁻⁹ 그러나 자주 혈액을 채취해야 하는 불편함과 감염의 위험성, 전신질환이 있는 경우 혈액을 채취하기 어렵다는 단점이 있다.¹⁰ 따라서 최근에는 약 8% 농도의 송아지 혈청을 주성분으로 하는 인공누액(Solcorin[®], 한림제약, 서울, 한국)이 시판되어 사용되고 있는데, 송아지 혈청의 농도에 따른 각막상피세포에 대한 효능 및 독성에 대한 보고는 알려진 바가 없다.

이에 저자들은 송아지 혈청을 농도에 따라 각막상피세포에 미치는 영향 및 독성 효과를 관찰하고자 MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 측정, 염증성 사이토카인의 생성 정도, 젖산탈수소효소 분석법(LDH leakage assay)을 각각 시도하고, 각막상피세포의 형태학적 변화를 전자현미경으로 관찰하였다.

대상과 방법

세포배양과 처치

각막이식에 필요한 공여각막을 사용하고 남은 주변부의 각막조직을 이용하여 각막상피와 각막실질을 Ca²⁺, Mg²⁺가 함유되지 않은 1 unit/ml Dispase II (Boehringer Mannheim, Germany)에 담구어 37°C 배양기에 1시간 처리하여 각막

■ 접수 일: 2010년 7월 5일 ■ 심사통과일: 2011년 1월 4일
■ 게재허가일: 2011년 4월 27일

■ 책임저자: 이종수

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

* 본 논문의 요지는 2010년 대한안과학회 제103회 학술대회에서 포스터로 발표되었음.

상피세포를 분리한 다음 5분간 1000 분당 회전수(revolutions per minute, rpm)에서 원심분리하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)로 옮겨 95% air-5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 일차배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL), 20 ng/ml EGF (Gibco BRL), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL)을 첨가한 세포배양액을 2-3일 간격으로 교체하여 세포가 합류(confluent growth)되었을 때 배양배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS: Gibco BRL)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 5×10³ cell/ml이 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 µl씩 심은 후 37°C, 5% CO₂-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 이때 세포수가 너무 뺏뺏할 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 colorimetric 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, USA)를 이용한 분석법을 사용하였는데, 노란색의 tetrazolium salt가 세포 내 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것으로, 생존하고 있는 세포 즉 대사작용이 왕성한 세포를 흡광도를 이용해서 측정하는 방법이다.¹¹

Subconfluence에 도달한 cell을 D-PBS로 1회 세척한 후 송아지 혈청을 전체 배지의 10, 20, 30%가 되도록 첨가하여 1, 4, 12, 24시간 동안 각막상피세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어주었다. 약물처리 후 24시간 정도 세포 배양기에 넣어 배양한 다음 MTT assay를 실시하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로는 배지 자체에 아무 처리를 하지 않은 것으로 하였고,

DMEM 배지를 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)를 100 µl 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, 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).

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

송아지 혈청을 96 well 배지의 전체양 200 µl에서 10, 20, 30% 농도가 되도록 배지액에 넣은 후 각각 1, 4시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH 양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였고, 대조군으로는 배지 자체에 아무 처리를 하지 않은 것으로 하였고, 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.

Inflammatory cytokines (IL-1 α , TGF- β 1), Matrix metalloproteinase (MMP)-9 생성 억제력 비교

안구 건조증의 경우 결막세포 및 눈물에서 IL-1 α , TGF- β 1, MMP-9 등의 염증성 사이토카인의 농도가 정상인보다 증가하기에, 송아지 혈청을 배지의 10, 20, 30% 비율로 1, 4시간 노출한 후 생성의 억제력을 서로 비교하고자 하였다. Cell culture supernates를 각각의 well에 200 µl씩 담고 봉한 후 2시간 동안 상온에서 반응시킨 다음 상층액을 제거하

고 4번에 걸쳐 wash buffer 400 μ l로 씻어내었다. IL-1 α conjugate (RnDSystems, Minneapolis, MN, USA) 200 μ l를 well에 담고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 다시 400 μ l의 wash buffer로 4번 씻어내고, substrate solution 200 μ l를 well에 담고 상온에서 20분간 빛을 차단한 상태로 둔 다음, stop solution 50 μ l을 첨가하여 색깔의 변화가 나타나면 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. TGF- β 1, MMP-9도 같은 방법으로 ELISA kit (RnDSystems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

약제에 따른 세포의 형태학적 변화 관찰

송아지 혈청에 노출 시 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 송아지 혈청을 배지의 10, 20, 30% 비율로 각각 1, 4, 12, 24시간 노출 후 세포의 형태학적인 변화를 관찰하였다. 그 방법은 배양액에 약제 노출된 각각의 각결막 세포를 각각 5×10^3 cell/ml이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μ l씩 심은 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ -95% air의 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 군의 각막상피세포들을 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 ethanol용액으로 탈수한 후 Epon으로 포매하였다. 60-80 nm의 절편을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색시켜 투과전자현미경 (JEOL 1200EX, Tokyo, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였다.

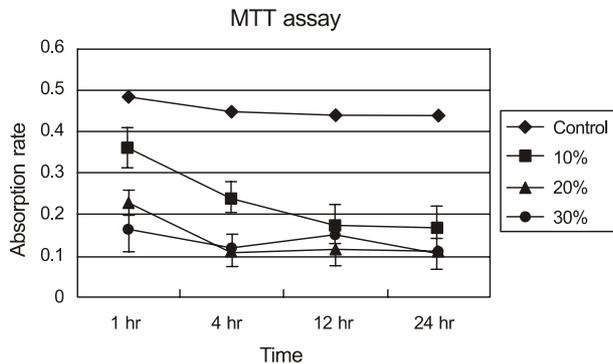


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in corneal epithelial cell exposed to calf serum by a scanning spectrometer (ELISA reader). Metabolic activity of corneal epithelial cells decreased, at the higher concentration and longer exposure duration.

결 과

MTT 분석법을 사용한 세포의 대사력 비교

MTT분석에서의 결과를 보면 송아지 혈청의 농도가 높아질수록 접촉시간이 길어질수록 세포의 대사활성도가 감소되는 경향을 보였다. 10% 농도의 혈청에 접촉한 경우 12시간째부터 대조군의 50% 이하로 세포대사력이 감소되었으나, 20, 30% 농도 혈청의 경우 접촉 1시간째부터 대조군의 50% 이하로 세포활성도가 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

약제의 농도 및 노출시간에 따른 LDH assay

각막상피세포를 송아지 혈청에 10, 20, 30% 농도로 접촉시킨 경우 대조군의 LDH 역가에 비해 노출 시간이 증가할수록, 혈청 농도가 높을수록 LDH 수치가 증가하였다. 모든 농도에서 접촉시간이 12시간째 급격히 LDH 수치가 증가하였고, 24시간째는 약간 감소하는 양상을 보였다. 10% 농도의 혈청에 노출시킨 경우 24시간이 지나도 LDH 역가가 2.0 이하로 유지되는 데 반해 20, 30% 농도의 혈청에 접촉한 경우 12시간째 LDH 수치가 2.0 이상으로 증가하여 세포 손상이 큰 것을 나타냈다(Fig. 2).

염증성 사이토카인 생성 억제력 비교

IL-1 α , TGF- β 1, MMP-9 모두 10, 20, 30% 농도의 혈청에 접촉한 지 1시간, 4시간 후 대조군에 비해 수치가 감소함을 알 수 있었다. IL-1 α 의 경우 혈청 농도 10, 20, 30% 모두 노출 1시간째, 4시간째에 대조군에 비해 유의한 생성량의 감소를 나타냈다(Fig. 3). TGF- β 1의 경우 10%

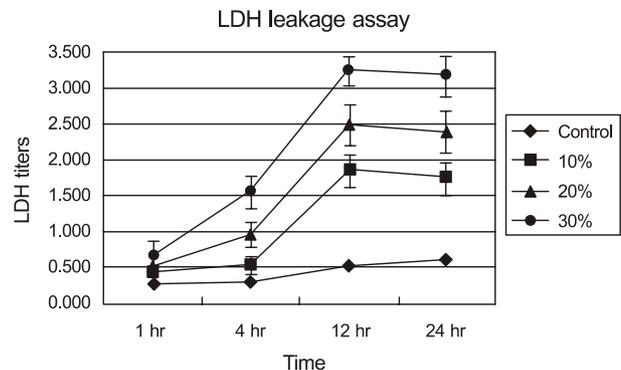


Figure 2. LDH titers of cultured corneal epithelial cells exposed to calf serum. The LDH titers have showed that by dose-and time-dependent response relationship. LDH = lactate dehydrogenase.

혈청에 접촉시켰을 때 접촉 1시간, 4시간째 모두 대조군에 비해 유의하게 감소되었고, 20, 30% 혈청에 노출한 경우에

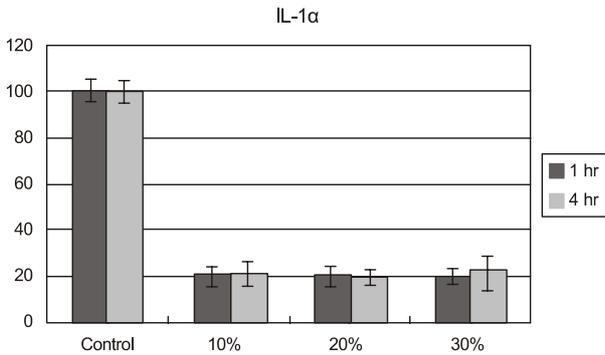


Figure 3. IL-1 α concentration of cultured corneal epithelial cells after exposed to calf serum. The concentration of IL-1 α decreased significantly compared to that in the control after exposed to all the concentrations of calf serum for up to 4 hours.

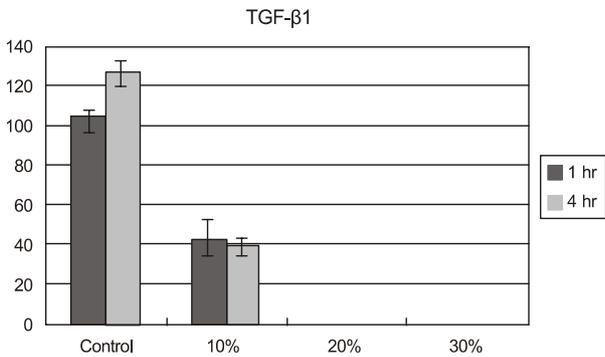


Figure 4. TGF- β 1 concentration of cultured corneal epithelial cells after exposed to calf serum. The concentration of TGF- β 1 was declined significantly after exposed to all the concentrations of calf serum for up to 4 hours. Especially, TGF- β 1 was not detected after exposed to 20, 30 % concentration of calf serum.

는 TGF- β 1이 전혀 검출되지 않았다(Fig. 4). MMP-9의 경우 10% 혈청에 접촉 1시간 후 대조군의 10% 이하로 수치가 감소하였으나, 4시간째는 다시 수치가 상승하여 대조군의 40% 정도로 측정되었다. 20% 혈청에 노출한 경우 접촉 1시간, 4시간 후 모두 대조군 수치의 30% 정도로 감소하였음을 알 수 있었고, 30% 혈청에 접촉시킨 경우 1시간 후의 수치보다 4시간 후의 수치가 약간 상승하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 또한 약제 노출 1시간째 혈청 농도가 증가할수록 MMP-9의 수치가 다소 상승하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 5).

약제의 농도 및 노출시간에 따른 세포의 형태학적 비교

대조군에서 각막상피세포의 전자현미경적 소견은 손상이 없는 원형질막에 미세융모가 있으면서 세포질과 핵질의 분포가 균일하고 형태가 뚜렷하게 관찰되었으며, 세포질 내 사립체(mitochondria)나 과립세포질망(rough endoplasmic

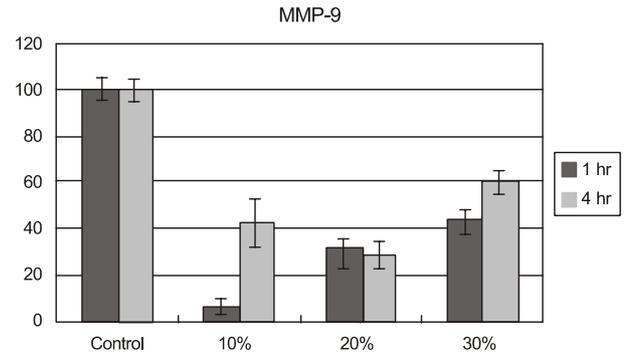


Figure 5. MMP-9 concentration of cultured corneal epithelial cells after exposed to calf serum. The concentration of MMP-9 was lower than in the control after exposed to all the concentrations of calf serum for up to 4 hours.

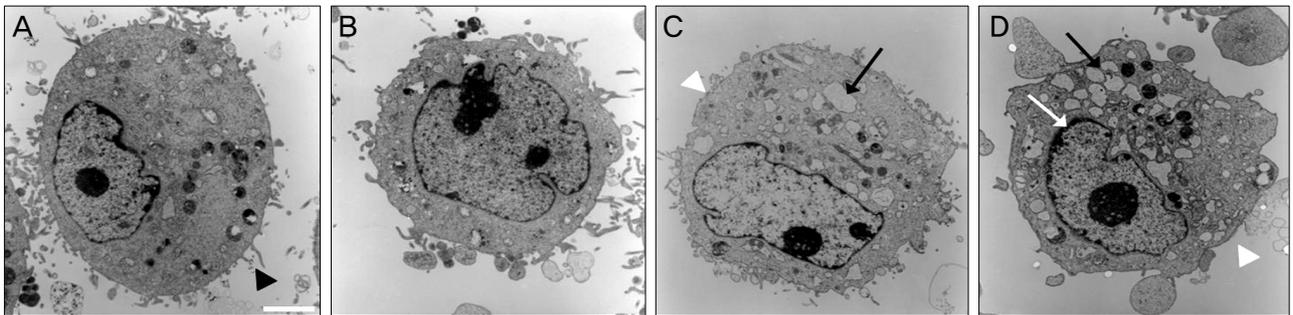


Figure 6. Transmission electron micrographs of corneal epithelial cells appeared after 4-hour exposure to (A) control, (B) 10% calf serum, (C) 20% calf serum, and (D) 30% calf serum. (bar length 2 μ m, original magnification, \times 2000-4000). In general, the plasma membrane with microvilli (black arrow head), nuclear membrane, and nuclei of corneal epithelial cells were visible. 30% calf serum had more severe and damaged cellular structures, such as the plasma membranes with microvilli being disrupted (white arrow head), well-developed vacuole formation (black arrow), and chromatin margination of the nucleus (white arrow), rather than 10, 20% calf serum.

reticulum, RER)의 미세한 확대 소견을 보였다(Fig. 6A). 10, 20, 30% 농도의 혈청에 각각 4시간 접촉한 후에는 원형질막의 미세용도가 감소하면서 세포질 내 소공 형성 및 사립체나 과립세포질망의 확대가 관찰되었다(Fig. 6B, C, D). 이러한 변화는 혈청 농도가 높아질수록 심하게 관찰되었고, 30% 혈청에 접촉한 후에는 핵막주변부의 핵질 농축과 세포질 내 구조물의 심한 확대 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 6D).

고 찰

자가 혈청에는 눈물에서 정상적으로 발견되는 EGF, vitamin A, TGF- β , fibronectin, IGF-1, 여러 사이토카인 등이 포함되어 있어 각결막 상피의 증식, 분화 및 이주에 관여하고 건강한 안구 표면 유지에 중요한 역할을 한다. EGF와 vitamin A는 눈표면상피의 증식, 분화 및 성숙의 조절에 관여하며,^{2,12} EGF는 세포자멸사를 억제함으로써 상피 재생을 촉진시킨다고 알려져 있다.¹³ Acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF)는 토끼에서 상피 치유를 촉진시키는 것이 밝혀졌고,¹⁴ Fibronectin은 상피화를 돕는 역할을 하는 것으로 알려졌으며,¹⁵ vitamin A는 건성 각결막염에서 편평상피화생으로의 진행을 억제할 수 있다.⁸

Fox et al⁷에 의해 처음으로 쇼그렌 증후군에서 안구 건조증의 치료에 자가혈청의 사용이 효과적이라고 보고된 이후, 여러 연구에서 중증의 안구건조증뿐 아니라 graft-versus-host disease (GVHD), neurotrophic keratitis, 지속각막상피결손, 상윤부각결막염, 반복각막진무를 등에서 자가혈청이 안구표면 회복을 유도하여 효과적으로 사용될 수 있음을 발표하였으며,⁵⁻⁹ 국내에서도 반복성각막미란이나 화학화상에서 자가혈청의 점안이 창상치유에 효과가 있음이 보고되고 있다.^{16,17} 그러나 자가혈청의 사용에는 몇 가지 문제점이 있는데, 우선 신선한 혈청을 얻기 위해 환자로 부터 주기적으로 혈액을 채취해야 하는 불편함이 있고,¹⁸ 혈청 점안액을 조제하는 과정이 복잡하여 적절한 기구가 갖추어진 병원에서만 만들 수 있다는 단점이 있다. 또한 전신상태가 불량하거나 만성질환이나 혈액질환이 있는 경우, 소아나 노인에서는 혈액채취 자체가 어려우며, 안약 용기의 세균 오염으로 인한 감염의 위험이 뒤따른다는 문제점이 있다.¹⁰ 이러한 자가혈청을 대신하여 allogenic serum eye drops이 안구 건조증 환자에서 시도되었으나, 혈액전파 질환의 위험으로부터 자유로울 수 없었고, 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)가 전염된 경우가 보고되었다.¹⁹

태아 소 혈청(fetal calf serum)은 실험실에서 배양 시 세

포 성장을 촉진시키기 위해 널리 사용되어 왔으며,⁵ 여러 연구들에서 송아지 혈액에서 단백질을 제거한 추출물을 주 성분으로 하는 Solcoseryl[®]이 각막 상피 결손 환자에서 효과적임을 보여주었다.^{20,21} Tsubota et al⁹은 태아 소 혈청이 생체 외에서 각막 상피 세포의 이주를 촉진시킴을 보고하였고, Spessotto et al²¹은 태아 소 혈청이 인체 단핵구의 분화를 촉진함을 실험적으로 증명하였다.

본 연구에서 MTT 분석법을 통해 세포의 흡광도를 분석한 결과 송아지 혈청의 농도가 높아질수록 접촉시간이 길어질수록 세포의 대사활성도가 감소되는 경향을 보였다. 혈청 성분 중 TGF- β 는 약 50 ng/ml가 포함되어 있어 눈물의 농도보다 약 5배나 높는데, TGF- β 는 증식을 억제하는 효과가 있어 고농도로 존재할 경우 안구 표면 상피의 창상회복을 억제하므로 자가혈청을 사용할 때 20% 정도로 희석해서 사용해야 하는 것으로 알려져 있다.²² 따라서 인체의 혈청과 유사한 송아지 혈청도 고농도로 존재할 경우 세포의 증식을 억제하는 효과가 있을 것임을 예측할 수 있는데, 본 연구의 결과에서도 송아지 혈청의 농도가 증가할수록 세포의 대사활성도가 감소되는 결과가 나타났다. 본 실험에서 측정된 TGF- β 의 경우 송아지 혈청 점안에 따른 사이토카인의 생성 억제 여부를 알아보기 위해, 배양된 인체각막 상피에서 생성된 양을 검출하도록 되어 있기에 송아지 혈청 자체에 포함되어 있는 TGF- β 는 결과에 반영되지 않을 것으로 생각한다.

안구건조증 환자의 눈표면과 눈물에는 염증 세포들의 밀도가 증가되어 있고 염증성 사이토카인과 세포자멸사를 유도하는 인자들이 증가되어 있다. 세포자멸사를 유도하는 tumor necrosis factor (TNF)- α, β 나 interleukin-1이 건성 각결막염 환자의 결막 상피와 눈물에서 증가되어 있고 특히, 쇼그렌 환자의 결막 상피에서 IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β 1 RNA transcript가 유의하게 증가되어 있다고 알려져 있다.²³ 또한 안구 건조증 환자의 눈물에는 matrix metalloproteinase (MMP)의 농도와 활성이 비정상적으로 증가되어 있는데,²⁴ 이 중 MMP-9의 경우 각막상피 바닥막이나 치밀결합 단백 성분들을 분해시키는 데 관여하고 각막상피의 방어 기능을 유지하는 데 역할을 하며, 각막 질환의 중증도가 심해질수록 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다.²⁵ 본 연구에서 송아지 혈청 농도가 높을수록 각막 상피세포에 독성반응이 증가하는 것을 알 수 있는데, 이러한 독성반응 시 보통 염증성 사이토카인 증가, MMP-9 증가 등의 결과를 예측할 수 있으나 실험 결과 염증성 사이토카인인 IL-1 α , TGF- β 1과 MMP-9 모두 10, 20, 30% 농도의 혈청에 접촉한 지 1, 4시간 후 대조군에 비해 수치가 감소하는 소견을 보였다. 세포 독성은 염증 반응뿐 아니라

pH, 오스몰농도, Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} 등의 전해질, 사이토카인과 같은 다른 요소들도 관여하므로 혈청 농도가 증가할 때 염증성 사이토카인은 감소하더라도 다른 인자들에 의해 세포 독성이 증가될 수 있거나, 본 연구에서는 세포의 직접적인 손상으로 염증성 사이토카인의 생성이 억제되어 나타날 수 있다고 생각한다. 그러나 MMP-9의 경우 접촉시킨 혈청 농도가 증가할수록, 노출 시간이 증가할수록 수치가 오히려 상승하는 경향을 보였는데, 이는 농도가 증가할수록 세포손상이 심하여 나타나는 현상으로 생각한다. MMP-9은 건성 각결막염에서 각막상피의 장벽기능이 떨어져 플루오레신 염색이 증가하거나 상피의 탈락이 증가하여 안표면이 불규칙할 때 수치가 상승하는 것으로 알려져 있다.²⁵

생체외에서 세포독성의 측정은 세포막의 완전성이나 대사 기능과 같은 생리적인 변화를 기초로 하게 되는데, 여러 가지 세포 내 효소가 이러한 생리적 변화의 표지자로 사용되고 있으며, 특히 LDH는 세포막이 파괴되었을 때 세포질로부터 유리되는 효소로서 LDH leakage assay는 세포독성 정도를 판단할 수 있는 유용한 검사방법으로 알려져 있다.²⁶ 본 연구에서 LDH 역가 분석 결과 각막상피세포를 송아지 혈청에 접촉시킨 경우 대조군의 LDH 역가에 비해 노출 시간이 증가할수록, 혈청 농도가 증가할수록 LDH 수치가 증가함을 알 수 있었다. 10% 송아지 혈청의 경우 20, 30% 농도의 송아지 혈청에 비해 LDH 수치가 비교적 낮게 측정되어 보다 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다. LDH 역가가 높을수록 투시전자현미경상 많은 각막상피세포들이 손상을 받아 세포막이 파괴되고 과립세포질망이 확장되며, 미토콘드리아가 비대해진 모습을 보였으며, 미세용모가 소실되고 크로마틴이 핵의 주변부로 몰리는 변화가 더욱 현저하게 관찰되었다. 10% 송아지 혈청에 비해 20, 30% 농도의 송아지 혈청에서 세포부종과 세포질의 손상 및 핵의 변형 등이 보다 심하게 관찰되었다. 이처럼 송아지 혈청에 각막상피세포를 접촉시킨 경우 10%의 경우도 대조군에 비해 세포대사 활성도의 감소와 세포 독성의 증가를 관찰할 수 있었는데, 이는 임상에서 각막치유 목적으로 사용하고 있는 자가혈청이나 각막상피세포 배양에 사용되는 태아우혈청과 성분의 차이로 인해 나타난 결과로 예상되며, 향후 자가혈청 및 송아지 혈청의 성분의 차이 분석 및 각막상피세포에 미치는 영향의 비교 연구 등이 필요할 것으로 생각한다.

따라서 각막상피세포의 독성을 고려하면 송아지 혈청의 경우 오히려 농도가 낮은 10%에서 농도가 높을 때보다 각막상피세포의 증식력이 활발하고, 세포에 미치는 독성 및 염증과 연관된 사이토카인의 생성력이 억제되어 효과적으

로 임상에 적용할 수 있을 것으로 생각하며, 향후 송아지 혈청의 농도에 따른 구체적인 연구를 계획 중에 있다.

참고문헌

- 1) Noble BA, Loh RS, MacLennan S, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004;88:647-52.
- 2) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:1879-82.
- 3) Ubels JL, Foley KM, Rismondo V. Retinol secretion by the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1261-8.
- 4) Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:706-14.
- 5) Poon AC, Geerling G, Dart JK, et al. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-97.
- 6) Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004;111:1115-20.
- 7) Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-61.
- 8) Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.
- 9) Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-9.
- 10) Lee GA, Chen SX. Autologous serum in the management of recalcitrant dry eye syndrome. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008; 36:119-22.
- 11) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 12) Wilson SE. Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface. *Am J Ophthalmol* 1991;111:763-5.
- 13) Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, et al. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* 1994;16:133-8.
- 14) Fredj-Reygrobellet D, Plouet J, Delayre T, et al. Effects of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas. *Curr Eye Res* 1987;6:1205-9.
- 15) Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, et al. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 1987;104:494-501.
- 16) Yoo JW, Chung JH, Lee HR. Effects of topically applied autologous serum on experimental corneal epithelial healing following alkali wounds. *J Korean Ophthalmol Soc* 1998;39:2003-12.
- 17) Han MS, Lee JH, Lee SJ. Therapeutic effect of topical autologous serum in recurrent punctate corneal erosion. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:1639-44.
- 18) Yoon KC, Im SK, Park YG, Choi J. Tear film and ocular surface

- changes after umbilical cord serum therapy in dry eye syndrome. J Korean Ophthalmol Soc 2005;46:237-42.
- 19) Eberle J, Habermann J, Gürtler LG. HIV-1 infection transmitted by serum droplets into the eye: a case report. AIDS 2000;14:206-7.
- 20) Egger SF, Huber-Spitzy V, Alzner E, et al. Corneal wound healing after superficial foreign body injury: vitamin A and dexpanthenol versus a calf blood extract. A randomized double-blind study. Ophthalmologica 1999;213:246-9.
- 21) Spessotto P, Dri P, Baschong W, et al. Effect of a protein-free dialysate from calf blood on human monocyte differentiation in vitro. Arzneimittelforschung 1993;43:747-51.
- 22) Kojima T, Higuchi A, Goto E, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases. Cornea 2008;27:S25-30.
- 23) Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. Curr Eye Res 1999;19:201-11.
- 24) Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, et al. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:1703-9.
- 25) Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, et al. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. Am J Pathol 2005;166:61-71.
- 26) Huhtala A, Mannerström M, Alajuuma P, et al. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line and rabbit corneal epithelial cell culture in cytotoxicity testing. J Ocul Pharmacol Ther 2002;18:163-75.

=ABSTRACT=

Effects of Calf Serum on Human Corneal Epithelial Cells *in Vitro*

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

*Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine, Medical Research Institute,
Pusan National University Hospital¹, Busan, Korea
Department of Ophthalmology, Busan St. Mary's Medical Center², Busan, Korea*

Purpose: To investigate the biologic effects of topical calf serum on corneal epithelial cells *in vitro*.

Methods: The effects of calf serum on the corneal epithelial cells were evaluated using the MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, and the concentration of IL-1 α , TGF- β 1 and MMP-9 in the cells was measured. Cell damage was determined using lactate dehydrogenase (LDH), and cellular morphologies were examined by transmission electromicroscopy.

Results: Metabolic activity of the corneal epithelial cells decreased at higher concentrations and longer exposure durations. IL-1 α , TGF- β 1 and MMP-9 titers were lower in calf serum-treated cells than in the control. LDH and cellular damage to the corneal epithelial cells, such as chromatin margination and cytoplasmic organelle swelling, were prominent in cells treated with 30% calf serum.

Conclusions: Cellular metabolic activity was higher and cellular toxicity was lower in cells treated with 10% calf serum compared to those treated with the 20% and 30% concentrations. Furthermore, inflammatory cytokines were sufficiently inhibited in cells treated with the 10% solution. These results indicate that 10% calf serum could be used clinically.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(7):852-858

Key Words: Calf serum, Corneal epithelial cell toxicity, LDH, MTT

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