대한안과학회지 2011년 제 52 권 제 10 호
J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(10):1215-1221
pISSN: 0378-6471
eISSN: 2092-9374
http://dx.doi.org/10.3341/jkos.2011.52.10.1215

마이토마이신, 덱사메타존, 사이클로스포린 0.05%가 인간 각막실질세포에 미치는 영향

신종훈[1] · 김수진[1] · 이지은[2] · 이종수[1]

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실[1], 양산부산대학교병원 안과[2]

목적: 마이토마이신C, 덱사메타존, 사이클로스포린이 인간각막실질세포에 미치는 영향을 비교하고자 하였다.
대상과 방법: 인간각막실질세포를 배양한 후 0.05% 마이토마이신C, 0.05% 덱사메타존, 0.05% 사이클로스포린에 3, 5, 10분간 접촉시켰다. MTT 분석법으로 각막실질세포의 증식억제력을 확인하였고, 콜라겐 및 Laminin 생성정도를 비교하였다. 젖산탈수소효소 분석법을 이용해 세포사 정도를 측정하였으며, 약제노출 시간에 따른 세포자멸사 유무를 확인하기 위해 유세포 분석기를 시행하였다.
결과: 세 약제 모두에서 노출시간이 증가할수록 대사활성도가 감소하고, 세포독성이 증가하는 경향을 보였다. 세포외기질 생성의 억제 및 세포의 손상 정도는 마이토마이신C 및 덱사메타존이 사이클로스포린에 비해 크게 나타났다. 세포자멸사 또한 세 약제 모두 노출시간에 따라 증가됨을 알 수 있었고 사이클로스포린이 마이토마이신C, 덱사메타존보다 약하게 나타났다.
결론: 각막실질세포 증식억제는 세포자멸사와 연관성이 있으며, 각막혼탁을 줄이기 위해서는 마이토마이신C 및 덱사메타존이 사이클로스포린보다 효과적일 것으로 생각하며, 사이클로스포린의 경우 각막혼탁을 줄이기 위해서는 0.05% 이상의 고농도가 필요할 것으로 생각한다.
〈대한안과학회지 2011;52(10):1215-1221〉

각막굴절교정수술을 시행하는 경우 각막의 절제된 실질부위에 조사된 엑시머레이저는 각막실질세포의 세포사를 야기하고, 이로 인해 염증성 세포를 불러모으는 화학주성인자가 유리된다. 또한 각막상피바닥막의 구조적이고 기능적인 결손으로 인해 TGF-β가 유리되면서 근섬유모세포가 활성화되고, 비정상적인 콜라겐과 세포외기질이 축적되어 각막혼탁이 발생하는 것으로 알려져 있다.[1-3] 이러한 각막혼탁 지속시기를 줄이고 빈도를 감소시키기 위해 현재 수술 중 또는 후에 여러 가지 약제인 덱사메타존, 마이토마이신C, 사이클로스포린 등의 점안제가 흔히 사용되고 있다.[1,4-7]

안과영역에서 덱사메타존은 DNA와 단백질 합성을 저해함으로써 상처회복과정을 지연시키지만, 강력한 항염증효과를 나타내는 약제로, 굴절교정각막절제술 후 상피하 혼탁이나 근시로의 퇴행을 억제하기 위하여 널리 사용하여 왔다.[8-11] 마이토마이신C는 익상편 제거술 후 결막하섬유모세포의 과도한 증식과 녹내장여과수술 후 과도한 반흔형성을 억제하기 위해서 뿐만 아니라, 굴절교정각막절제술이나 다른 표면 연마술 후 각막혼탁의 발생을 막기 위해 사용되어 왔다. 최근에는 면역역제제인 사이클로스포린에 의한 치료영역의 확대로 염증질환 뿐 아니라 안표면 질환에서도 사용되기 시작하였으며, 0.05% 농도의 사이클로스포린을 점안하는 것이 효과적이고 안전하기에 안건조증을 포함한 건성각결막염의 치료에 유용하게 사용되며 점차 사용이 늘어가고 있다.[12,13] 나아가 스테로이드를 대신하여 굴절교정각막수술 후에 발생할 수 있는 각막혼탁을 예방하기 위해 사용되기도 한다.[1] 그러나, 안표면 질환 치료 시 아직까지 세 가지 약제 마이토마이신C, 덱사메타존, 사이클로스포린에 의한 각막에 미치는 영향에 대한 비교연구가 드물며,[14] 특히 세 약제의 효과 및 독성을 비교한 연구는 알려진 바가 없는 실정이다.

이에 저자들은 배양된 인간각막실질세포를 대상으로 0.05% 마이토마이신C (Mitomycin C®, Kyowa Hakko), 0.05% 덱사메타존(dexamethasone®, Sigma, St. Louis, USA), 그리고 0.05% 사이클로스포린(CsA, Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 각막실질세포의 증식 억제효과, 세포외 기질의 생성, 세포자멸사 반응을 비교하여 각막혼탁의 억제효과를 비교해 보고자 하였으며, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 통해 세포 독성 정도도 알아보고자 하였다.

■ 접 수 일: 2010년 8월 25일 ■ 심사통과일: 2011년 4월 7일
■ 게재허가일: 2011년 8월 26일

■ 책 임 저 자: 이 종 수
부산시 서구 구덕로 305
부산대학교병원 안과
Tel: 051-240-7323, Fax: 051-242-7341
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

* 이 논문의 요지는 2010년 대한안과학회 제103회 학술대회에서 포스터로 발표되었음.
* 이 논문은 2010년 부산대학교병원 임상연구비지원 논문임.

대상과 방법

세포배양과 처치

각막이식에 필요한 공여각막을 사용하고 남은 주변부의 각막조직을 이용하여 endothelium-free explant method로 각막실질세포를 계대배양시켰다. 먼저, 멸균상태에서 10% fetal bovine serum, 5% chondroitin sulfate, 아미노산이 함유된 배지EMEM/NEAA (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 2 cc를 60 mm 크기의 조직배양접시(Corning, NY, USA)에 넣은 후 고르게 배지가 바닥에 묻도록 한다. 각막이식을 사용하고 남은 공여각막의 주변조직을 멸균상태에서 12 mm^2 크기로 절제한 후 각막의 내피층과 상피층을 knife로 제거한 후 각막상피층의 면이 배양접시의 바닥 쪽으로 오게 하고 조직이 배지에 충분히 잠기도록 얹어 놓았다. 그리고 37℃, 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 각막실질세포 5×10^3 cell/ml이 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 μl씩 심은 후 37℃, 5% CO2-95% air의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 이 때 세포수가 너무 빽빽할 경우 각 약물에 의한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 각막실질세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 4-5일 정도 배양시켰다.

MTT 분석법을 사용한 세포 증식력 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-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, USA)를 이용한 분석법을 사용하였는데,[15] 이 방법은 노란색의 tetrazolium salt가 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것이다.

Subconfluence에 도달한 세포를 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Giboco BRL, Rockville, NY, USA)로 1회 세척한 후 0.05% 마이토마이신C (MitomycinC®, Kyowa Hakko), 0.05% 덱사메타존(dexamethasone®, Sigma)와 0.05% 사이클로스포린(Restasis®, Allergan)을 3분, 5분, 10분간 각막실질세포에 접촉시킨 후 D-PBS로 1회 세척 후 세포대사 능력을 측정하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로 Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM: Giboco BRL, Rockville, NY, USA)를 사용하여 동일한 방법으로 비교하였다.

흡광도 측정을 위해 5 mg의 MTT 용액을 PBS 1㎖에 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℃에서 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 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 3번씩을 시도하여 각 군과의 통계학적 유의성 (Student's t-test, $p<0.05$)을 비교 관찰하였다.

세포외기질인 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP) 및 Laminin의 측정

24 well plate에 well당 1×10^4 cells/ml을 심은 후 충분히 자랄 때까지 4일 정도 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS를 이용하여 세척하였다. 0.05% 마이토마이신C, 0.05% 덱사메타존과 0.05% 사이클로스포린을 3분, 5분, 10분간 접촉시킨 후 상층액을 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 신선한 DMEM배지를 첨가하여 24시간 배양한 뒤 배지를 채취하여 -80℃에 보관하였다. 세포층은 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.2)가 함유된 PBS 0.5 ml로 추출하여 세포추출물을 -80℃에 보관하였다. 각 배양배지와 세포추출물의 PIP, Laminin의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 시행하였다.

젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 세포사 측정

0.05% 마이토마이신C, 0.05% 덱사메타존, 0.05% 사이클로스포린을 3분, 5분, 10분간 각막실질세포에 약물을 접

촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물 처리후 24시간 정도 배양한 다음 세포사를 측정하였다. 세포질에서 유리된 LDH 양을 37℃온도의 암순응 상태에서 ELISA reader (Moleculae Devices, Sunnyvale, CA)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 실질세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 유의 수준은 95% 수준이었고, ANOVA 검사법을 사용하였다.

유세포 분석기를 이용한 세포자멸사 비교

세포자멸사 정도를 확인하기 위해 배양액에 각막실질세포가 5×10^5 cell/ml이 되도록 부유 시킨 후 세포를 증식시킨 후 세 약제 모두 3분, 5분, 10분간 접촉시킨 후 반응을 관찰하였다. 트립신을 이용하여 세포를 분리시킨 후 4℃에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리시켜 세포를 대상으로 binding buffer 200 μl 넣고 씻은 후 다시 5분간 4℃에서 12,000 rpm으로 원심분리 시킨다. 이런 과정을 한번 더 시행한 후 세포자멸사에 빠진 세포를 정량화하기 위하여 propidium iodide (PI) 5 μl와 FITC-labeled annexin V 10 μl를 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 나타나고, apoptosis 상태의 세포는 annexin V과 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®X (Beckman Coulter, USA)를 이용하였다.

결 과

MTT 분석법을 사용한 세포 증식 억제력 비교

마이토마이신C, 덱사메타존, 사이클로스포린의 세포증식 억제력을 측정하기 위해 대조군으로 DMEM 배지를 이용하여 각막실질세포의 대사능력을 측정한 결과, 세 약제 모두 접촉시간이 길어질수록 각막실질세포의 증식이 억제되는 경향을 보였으며, 10분 노출 시 대조군보다 유의한 세포 증식 억제를 나타내었다($p=0.03$). 각 노출시간에서 세포증식 억제력은 마이토마이신C에서 3분, 5분, 10분 노출 시 52.6%, 46.4%, 41.5%로 세포 증식 억제가 가장 현저하였고, 그 다음으로 덱사메타존은 각각의 노출 시간에서 55.8%, 54.6%, 41.8%이며, 사이클로스포린은 72.7%, 70.1%, 50.3%로 증식 억제력을 나타내었다. 세 약제 간의 세포 증식 억제력은 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 1).

세포외 기질 PIP와 Laminin의 측정

PIP와 Laminin 생성양(ng/ml)은 세 약제 모두 접촉시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였으며, PIP 생성양은 3, 5, 10분 노출시간에서 마이토마이신C의 경우 170.1, 137.1,

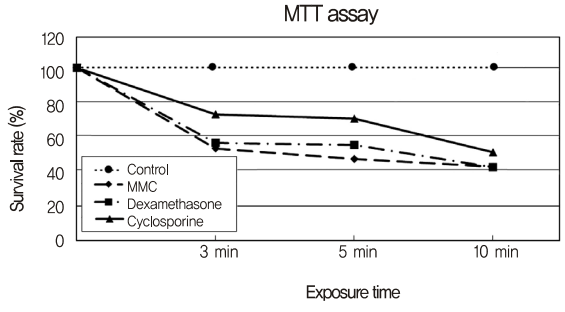

Figure 1. The absorption rate of the water-insolubale formazan dye in cultured human keratocytes exposed in the four eye drops by a scanning spectrometer (ELISA reader). The longer the exposure duration, the more decreased the metabolic activity of keratocytes in all drugs. After 10 minutes of exposure, the metabolic activity of keratocytes in all drugs was decreased more significantly than control (p = 0.03). Mytomicin-C (MMC) showed most prominent inhibitory effect for cellular metabolic activity, and cyclosporine showed minimal inhibitory effect, but the values were not statistically significant.

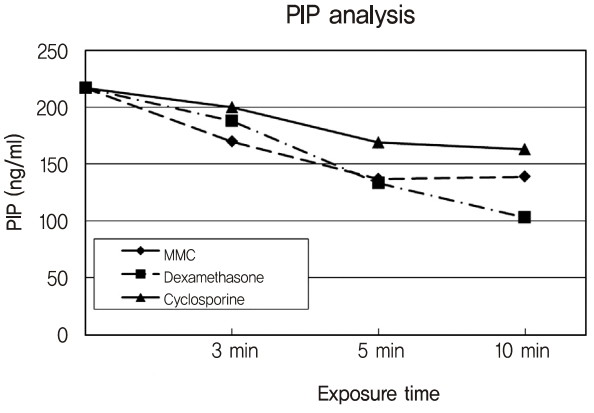

Figure 2. PIP titers of cultured human keratocytes in three eye drops. The concentration of PIP was decreased, the longer the exposure duration in all drugs. Mytomicin-C (MMC) and dexamethasone showed more prominent inhibitory effect for PIP level than cyclosporine, but the values were not statistically significant. PIP = procollagen type I COOH-terminal peptide.

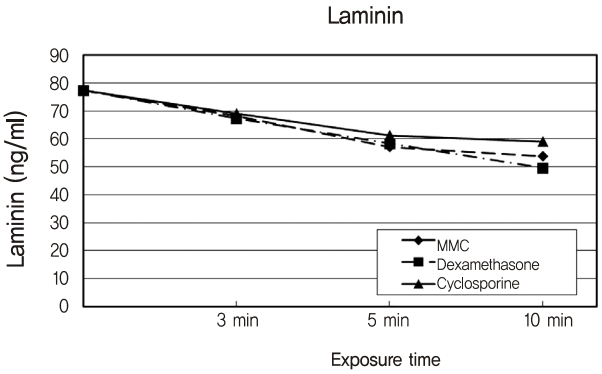

Figure 3. Laminin titers of cultured human keratocytes exposed in three eye drops, Mytomicin-C (MMC), dexamethasone and cyclosporine. The concentration of laminin was decreased, the longer the exposure time in all drugs. MMC and dexamethasone showed more prominent inhibitory effect for PIP level than cyclosporine, but the values were not statistically significant. PIP = procollagen type I COOH-terminal peptide.

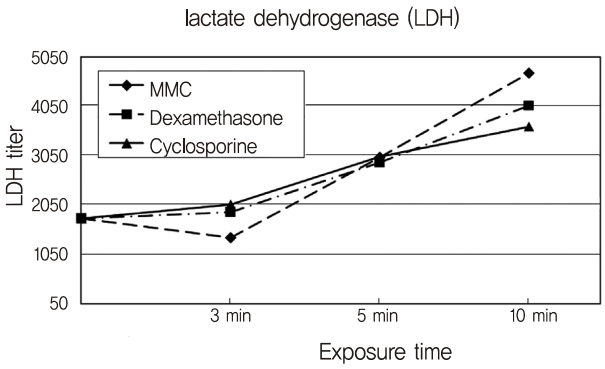

Figure 4. LDH activity of cultured human keratocytes exposed in three eye drops, mitomycin-C (0.05%), dexamethasone (0.05%) and cyclosporine A (0.05%). The lactate dehydrogenase (LDH) titers of cultured human keratocytes showed a kind of time dependent response. The LDH titers of MMC and dexamethasone were higher values than that of cyclosporine at 10 minutues, but the values were not statistically significant. MMC = mitomycin-C.

139.2이며, 덱사메타존의 경우 188.0, 133.7, 103.2로 측정되었다. 사이클로스포린은 각각의 노출시간에서 200.0, 168.9, 162.9로 다른 두 약제에 비해 PIP의 생성량 감소가 적었다(Fig. 2). Laminin 생성양의 경우, PIP의 생성량 결과와 유사하게 사이클로스포린은 3, 5, 10분 노출시간에서 69.1, 61.2, 59.0으로 마이토마이신C, 덱사메타존에 비해 생성양의 감소가 적게 나타났으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 3).

약제 노출시간에 따른 LDH Assay

LDH활성은 세 약제 모두에서 노출 시간이 길어질수록, LDH가 증가하는 경향을 보였다. 본 연구에서 처음 3분 노출시 사이클로스포린에서 덱사메타존, 마이토마이신C에 비해 LDH 활성이 더 높았으나, 약제 노출 10분 후에는 마이토마이신C, 덱사메타존, 사이클로스포린 순으로 LDH 수치(unit/ml)가 각각 4708, 4084, 3627로 높게 측정되었으며, 각 노출 시간에서 세 약제 간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 4).

유세포분석기에 의한 세포자멸사 분석

세포자멸사 현상에서 대조군에서는 세 약제 모두 주로 PI 및 Annexin V염색에 음성반응을 보인 반면, 세 가지 약제 처리 시에는 노출시간이 3분인 초기부터 Annexin V염색에 양성반응, PI 염색의 반응에 음성반응을 보이고 시간이 경과함에 따라 세포자멸사 현상을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 마이토마이신C는 노출 초기에는 세포자멸사 발현율이 약했으나 후기에 세포자멸사가 강하게 나타났으며, 사이클로스포린은 시간의 경과에 구별 없이 일정하게 세포자멸사가 일어났고, 덱사메타존은 초기에 세포자멸사가 약하다가 시간이 지날수록 강하게 나타났다(Fig. 5).

고 찰

각막굴절교정수술 후 각막 혼탁은 각막 창상회복반응(corneal wound healing process)과 밀접하게 관련되어 있다. 조직학적으로 엑시머레이저 시술 후 2-3주가 지나면서 후부 각막실질의 각막실질세포들이 증식되어 전부의 각막실질로 이동하여 활성화된 근섬유모세포가 증식되면서 비정상적인 교원질이나 세포외 기질이 축적되어 각막 혼탁이 발생한다. 이러한 각막조직의 창상회복은 염증반응에 연계되어 일어나며, 술 후 조기에 조직의 염증반응을 억제함으로써 반흔형성을 조절할 수 있다. 이러한 각막 혼탁을 예방하기 위해 이전부터 스테로이드 제재가 널리 사용되어 왔으며, 마이토마이신C, 최근에는 사이클로스포린 제재의 사용 또한 이루어지고 있다. 이들 제재가 각막굴절교정수술 후 각막혼탁을 줄이는 데 효과적이라는 보고는 있지만,[7,16-18] 세 가지 약제의 효능을 비교 연구한 논문은 알려진 바가 없어, 본 연구에서는 각막실질세포의 증식 억제효과 및 세포자멸사 반응을 비교하고자 하였다.

스테로이드 제제를 장기간 사용하는 경우 속발성 백내장, 녹내장, 면역기능의 억제에 따른 세균의 이차적인 감염, collagenase 효소의 활성화에 따른 각막천공 등이 발생할 수 있으므로 임상에서 고농도 스테로이드를 적용하는 데는 제한점이 있다. 따라서 임상에서 사용되는 스테로이드 안약

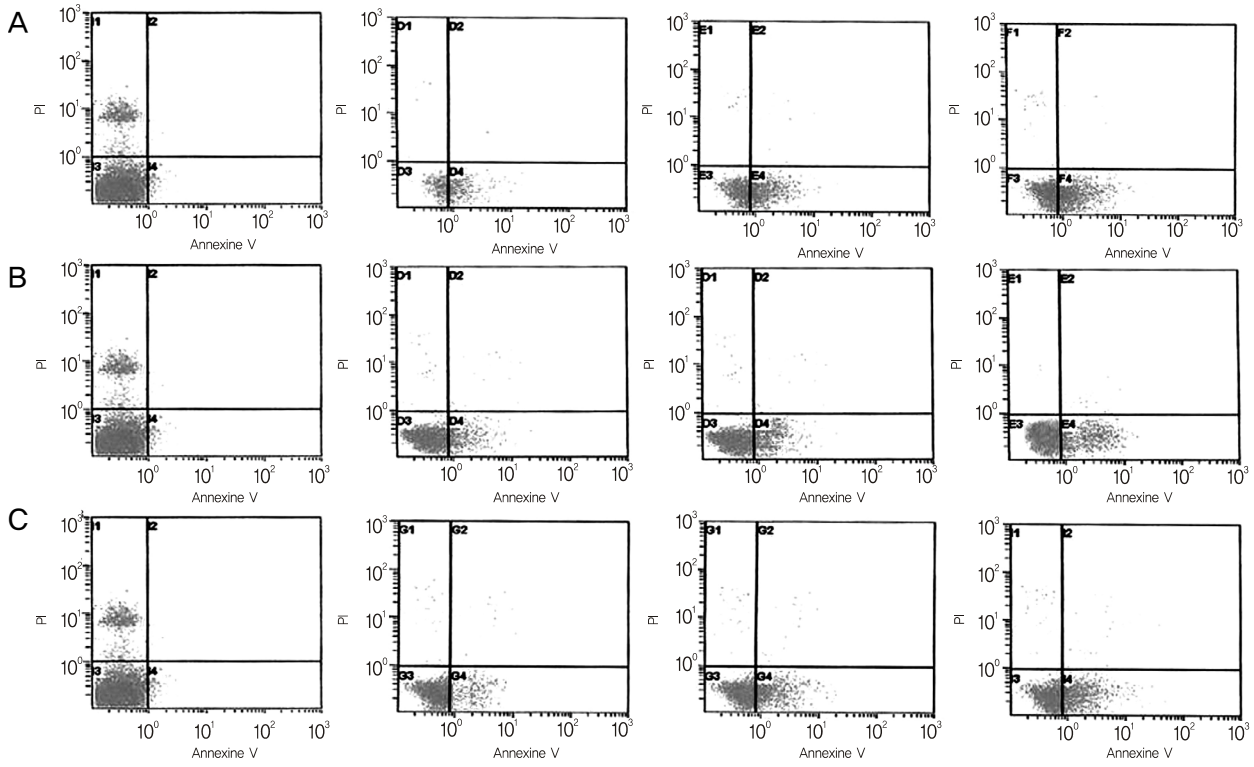

Figure 5. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V FITC after being treated treating with MMC (A), dexamethasone (B) and cyclosporine A (C). In all cases, apoptosis showed a time-dependent response. Cyclosporine A results in less apoptosis of keartocyte than dexamethasone and MMC. MMC = mitomycin-C; FITC = fluorescein isothiocyanate.

의 점안 농도로는 각막 혼탁의 근본적인 원인을 제공하고 있는 활성화된 각막실질세포나 변형된 근섬유모세포의 증식을 효과적으로 억제할 수는 없고, 단지 세포외기질인 교원질의 형성이나 침착을 억제하는 정도의 효과만 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.[19]

세포의 핵산과 단백질 합성을 방해함으로써 과도한 섬유모세포의 증식과 반흔 형성을 억제하는 보조약제인 마이토마이신C는 굴절교정수술 후 각막의 전부실질의 각막실질세포의 수를 감소시키고, 활성화되는 각막실질세포나 세포외기질을 감소시켜 각막혼탁을 줄이는 효과가 있다고 보고되고 있다.[6,20,21] 그러나 마이토마이신 처치 후 6개월 이상 전부 각막 실질의 세포 밀도가 현저히 감소되어 콜라겐 같은 세포외기질을 유지하지 못하여 발생할 수 있는 각막조직의 약화에 따른 주의가 필요하다.[22]

싸이클로스포린은 T-cell 관련 염증반응을 억제하여 항염증작용 및 면역조절 작용을 한다. 0.05% 사이클로스포린은 안과영역에서 보다 안전하게 사용할 수 있고, 스테로이드를 중단하고 나서 발생할 수 있는 혼탁의 재발을 방지하며 근섬유모세포나 혼탁을 야기하는 바닥막 이상을 회복하는 데 필요한 1-2년간 유지해서 장기간 사용할 수 있다.[1]

Lee et al[23]은 덱사메타존과 디클로페낙의 각막실질세포 증식 억제력의 비교에서 덱사메타존이 뚜렷한 증식 억제 효과를 보고하였고, Ursea et al[7]은 LASIK 시행 후 사이클로스포린 0.05%을 사용한 경우 각막 반흔형성을 억제하는 항염증 반응에 의해 더 빠른 시력회복을 유도한다고 하였으며, Argento et al[18]은 마이토마이신C을 LASEK 시행 중에 점안한 군에서 각막혼탁이 유의하게 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서 세 약제 모두 노출 시간이 증가할수록 각막실질세포의 증식이 강하게 억제되는 경향을 보였으며, 마이토마이신C, 덱사메타존, 사이클로스포린 순으로 증식 억제 효과를 나타냈다.

LDH 분석 결과 약제 노출 초기인 3분째에는 사이클로스포린, 덱사메타존, 마이토마이신C 순서로 역가가 높았으나, 5분째에는 세 약제 모두 비슷한 수치를 보이다가 노출 10분째에는 마이토마이신의 역가가 가장 높았고, 덱사메타존, 사이클로스포린 순서로 나타났다. 초기에는 사이클로스포린에 의한 각막실질세포의 독성효과가 크게 나타나나, 후기에는 마이토마이신에 의한 세포 독성 효과가 큰 경향을 보였다.

세포외기질은 조직을 지지하면서 모세혈관과 세포사이의 조직액의 이동에 중계역할을 할 뿐 아니라 조직의 분화과정에도 중요한 역할을 한다. 교원질을 구성하는 PIP는 주

로 섬유모세포에서 만들어지는데 세포 내에서 프로콜라겐 분자가 만들어진 후 분비세포 형태로 분비되어 세포 밖으로 나오면 프로콜라겐 가수분해효소에 의해 모교원질이 되고 이들이 모여 콜라겐 섬유를 형성한다. 따라서 각막창상 회복 과정에서 발생하는 콜라겐 섬유소의 형성을 억제하는 정도가 약제의 효과를 알 수 있는 지표가 될 수 있는데, 본 연구에 따르면 PIP의 생성이 세 약제 모두에서 노출시간이 증가할수록 억제되는 양상을 보였다. 약제 노출 3분째는 마이토마이신C의 억제효과가 가장 크고, 그 다음으로 덱사메타존, 사이클로스포린 순으로 나타났으며, 약제 노출 10분째는 덱사메타존이 가장 PIP 생성 억제 효과가 크며, 그 다음으로 마이토마이신, 사이클로스포린으로 나타났으나, 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 라미닌은 세포막의 기저막을 형성하는 당단백질 성분으로 결막의 상피층 창상 회복에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[24] 본 연구에서 세 약제에 노출된 후 라미닌의 생성 정도는 노출시간이 증가할수록 억제됨을 알 수 있었고, 약제 노출 10분째 라미닌의 생성억제 정도가 덱사메타존이 가장 크고, 그 뒤를 마이토마이신C, 사이클로스포린이 이어 PIP 생성 억제 정도와 비슷한 경향을 보였다.

각막창상 치유과정에서 활성화되는 각막실질세포의 증식을 약제로 조절하여 각막조직내 세포자멸사를 유발시켜 각막실질세포의 밀도를 줄일 수 있다면 증식되는 각막실질세포에서 분비되는 세포외 기질 성분을 감소시켜 각막혼탁의 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 생각한다. 이러한 세포자멸사 유도를 확인하기 위해 본 연구에서 약제의 세포자멸사의 반응 정도를 Annexin V와 PI을 이용한 유세포분석의 결과로 분석하였다. 각막실질세포는 세 약제 모두에서 노출 시간에 따른 세포자멸사 비율이 증가하였며, 사이클로스포린이 마이토마이신C 및 덱사메타존에 비해 세포 자멸사 발현율이 떨어졌으나 유의한 차이는 없었다.

이상의 3가지 약제에서 대조군보다 유의한 세포증식 억제력을 보였으나 약제 간에 유의한 차이는 보이지 않았으며, 세포외 기질의 PIP 및 Laminin 생성양, LDH 역가도 유의한 차이를 보이지 않았다. 마이토마이신C 및 덱사메타존이 사이클로스포린보다 각막혼탁을 줄이는 데 효과적이며, 사이클로스포린의 각막혼탁에 대한 효과를 높이기 위해서는 0.05% 이상의 고농도가 필요할 것으로 생각되므로 이에 대한 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

1) Salomao MQ, Wilson SE. Corneal molecular and cellular biology update for the refractive surgeon. J Refract Surg 2009;25:459-66.
2) Nishida T, Yasumoto K, Otori T, Desaki J. The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1988;29:1887-90.
3) Bergman RH, Spigelman AV. The role of fibroblast inhibitors on corneal healing following photorefractive keratectomy with 193-nanometer excimer laser in rabbits. Ophthalmic Surg 1994;25:170-4.
4) Gartry DS, Muir MG, Lohmann CP, Marshall J. The effect of topical corticosteroids on refractive outcome and corneal haze after photorefractive keratectomy: A prospective, randomized, double blind trial. Arch Ophthalmol 1992;110:944-52.
5) de Benito-Llopis L, Teus MA, Sánchez-Pina JM. Comparison between LASEK with mitomycin C and LASIK for the correction of myopia of -7.00 to -13.75 D. J Refract Surg 2008;24:516-23.
6) Carones F, Vigo L, Scandola E, Vacchini L. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. J Cataract Refract Surg 2002;28:2088-95.
7) Ursea R, Purcell TL, Tan BU, et al. The effect of cyclosporine A (Restasis) on recovery of visual acuity following LASIK. J Refract Surg 2008;24:473-6.
8) Tani E, Katakami C, Negi A. Effects of various eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits. Jpn J Ophthalmol 2002;46:488-95.
9) Sher NA, Chen V, Bowers RA, et al. The use of the 193 nm excimer laser for myopic photorefractive keratectomy in sighted eyes. A multicenter study. Arch Ophthalmol 1991;109:1525-30.
10) Carones F, Brancato R, Venturi E, et al. Efficacy of corticosteroids in reversing regression after myopic photorefractive keratectomy. Refract Corneal Surg 1993;9:S52-6.
11) Obrart DP, Lohmann CP, Klonos G, et al. The effects of topical corticosteroids and plasmin inhibitors on refractive outcome, haze and visual performance after photorefractive keratectomy; A prospective, randomized observer-masked study. Ophthalmology 1994;101:1565-74.
12) Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. Ophthalmology 2000;107:967-74.
13) BenEzra D, Maftzir G. Ocular penetration of cyclosporin A: the rabbit eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:1362-6.
14) Lee JE, Shin WB, Lee JS. Effect of cyclosporine A 0.05% on human corneal epithelial cells. J Korean Ophthalmol Soc 2007;48:1399-409.
15) Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman S. The immunomodulatory effect of topical cyclosporine A in atopic keratoconjunctivitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:392-9.
16) Soya K, Obata H, Amano S, et al. Effects of topical corticosteroids on subepithelial haze after excimer laser corneal surgery-objective and quantitative method for evaluationg haze. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 1997;101:152-7.
17) Furukawa H, Nakayasu K, Gotoh T, et al. Effect of topical tranilast and corticosteroids on subepithelial haze after photorefractive keratectomy in rabbits. J Refract Surg 1997;13:s457-8.
18) Argento C, Cosentino MJ, Ganly M. Comparison of laser epithelial keratomileusis with and without the use of mitomycin C. J Refract Surg 2006;22:782-6.
19) Okamoto S, Sakai T, Iwaki Y, et al. Effects of tranilast on cultured rabbit corneal keratocytes and corneal haze after photorefractive

keratectomy. Jpn J Ophthalmol 1999;43:355-62.
20) Lai YH, Wang HZ, Lin CP, Chang SJ. Mitomycin C alters corneal stromal wound healing and corneal haze in rabbits after argon-fluoride excimer laser photorefractive keratectomy. J Ocul Pharmacol Ther 2004;20:129-38.
21) Lee JE, Lee JS. Inhibitory effect of mitomycin C(MMC) on the proliferation of human corneal keratocyte. J Korean Ophthalmol Soc 2002;43:2519-26.
22) Netto MV, Mohan RR, Sinha S, et al. Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, and long-term keratocyte density in rabbits. J Refract Surg 2006;22:562-74.
23) Lee JE, Lee SU, Kim JH, Lee JS. Effect of dexamethasone and diclofenac on the proliferation of human corneal keratocytes. J Korean Ophthalmol Soc 2005;46:133-43.
24) Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. J Invest Dermatol 1989;92:605-10.

=ABSTRACT=

Effect of Mitomycin C, Dexamethasone, and Cyclosporine A 0.05% on the Proliferation of Human Corneal Keratocytes

Jong Hoon Shin, MD[1], Soo Jin Kim, MD[1], Ji Eun Lee, MD, PhD[2], Jong Soo Lee, MD, PhD[1]

Department of Ophthalmology, Pusan National University College of Medicine[1], Busan, Korea
Department of Ophthalmology, Pusan National University Yangsan Hospital[2], Busan, Korea

Purpose: To investigate the biologic effect of mitomycin C, dexamethasone and cyclosporine A 0.05% on cultured human keratocytes in vitro.
Methods: Human corneal keratocytes were exposed to a concentration of mitomycin C (0.05%), dexamethasone (0.05%) and cyclosporine A (0.05%) for a period of 3, 5, and 10 minutes. MTT-based colorimetric assay was performed to assess the metabolic activity of cellular proliferation and the concentration of type I procollagen COOH-terminal peptide (PIP) and laminin were measured. Cell damage was determined by using the lactate dehydrogenase (LDH) assay. Apoptotic response was evaluated utilizing flow cytometric analysis with Annexin V and propiodium iodide.
Results: The inhibitory effect of cellular proliferation and cytotoxicity in cultured human keratocytes showed a time-dependent response in all drugs. The production of PIP and laminin showed a time-dependent response in cultured cells. Apoptosis was observed in flow cytometry after being treated with mitomycin C, dexamethasone and cyclosporine A. Cyclosporin A resulted in less apoptosis of keratocytes than mitomycin C and dexamethasone.
Conclusions: The apoptotic response of mitomycin C, dexamethasone and cyclosporine A is associated with the inhibitory effect of human corneal keratocyte proliferation. To decrease corneal opacity, mitomycin C and dexamethasone were more effective than cyclosporine A in the present study. Additionally, a high concentration of cyclosporine A greater than 0.05% is necessary to lower corneal opacity.
J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(10):1215-1221

Key Words: Cyclosporine, Dexamethasone, Keratocyte, Mitomycin C

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