

저농도에 따른 사이클로스포린의 인체 각막상피세포에 미치는 영향

이상준¹ · 김수진² · 이종수¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 메리놀병원 안과²

목적: 농도에 따른 사이클로스포린이 인체의 각막상피세포에 미치는 영향에 관하여 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인체 각막상피세포를 배양하여 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%) 농도의 사이클로스포린에 각각 5분, 10분간 접촉시킨 후 MTT 분석법으로 세포 증식 억제 정도와 LDH 분석법으로 세포의 손상 정도를 측정하였다. PIP와 Laminin으로 각막상피세포의 세포 외 기질 양을 농도별로 비교, 측정하였다. 또한, 각막상피세포에서 분비되는 TNF- α 및 IL-1을 측정하여 분비되는 사이토카인의 양도 비교하고자 하였다.

결과: MTT 분석법 상 사이클로스포린의 농도와 접촉시간에 따른 유의한 차이가 없었다($p>0.05$). LDH의 수치는 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 증가하였으나($p<0.017$), 노출시간에 따른 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 사이클로스포린의 농도가 0.01% 이상에서는 각막상피세포에서 생성되는 세포 외 기질인 PIP나 laminin 생성에 대한 억제효과가 대조군에 비해 유의하게 나타났지만($p<0.028$, $p<0.031$), 농도가 0.01% 이하이거나 노출시간을 다르게 하여도 대조군과 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1의 각막상피세포에서의 생성억제는 농도와 노출시간에 차이가 없었다($p>0.05$).

결론: 각막상피세포에서 사이클로스포린을 사용할 경우 세포 외 기질인 PIP나 laminin 생성을 억제하거나 세포증식을 억제하기 위해서는 최소한 0.01% 농도의 노출이 필요하며, 저농도 사이클로스포린이 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-1에 미치는 영향력은 미비하였다. <대한안과학회지 2011;52(11):1344-1350>

사이클로스포린(cyclosporin A, CsA)은 고형 장기이식 후 거부반응을 막기 위해 1983년 처음으로 소개된 이후,¹ 안과 영역에서는 포도막염, 베체트병, bird shot retinopathy와 같은 질환의 치료에 전신적 투여가 소개되었다.²⁻⁴ 그러나 전신적으로 투여할 경우 신독성이나 고혈압, gingival hyperplasia, 기회감염의 증가와 같은 심각한 합병증이 발생할 수 있고,⁵ 치료농도를 유지하기 위해서는 안조직의 투과성을 고려해야 하기 때문에 안 질환에서의 사용은 매우 제한적이다.⁶

따라서, 사이클로스포린을 국소적으로 점안할 경우 안표면 조직에서 유효 농도에 도달하기 쉽고 전신적 사용의 독성을 피할 수 있어, 점차 안과영역에서 치료영역이 확대되면서 각막이식 후 뿐만 아니라, 봄철각결막염, 과사성 공막염 등에서도 사용되어 왔다.⁷⁻¹⁰ 최근에는 0.05% 사이클로스포린(Restasis®, Allergan, Irvine, CA, USA)이 제품화되

어 Food and Drug Administration (FDA) 공인을 받고, 심한 안구건조증 환자에서 주관적, 객관적 호전을 보고한 이후 안건조증을 포함한 건성각결막염의 치료 등에 점차 사용이 늘고 있다.¹¹

그러나, 면역억제제인 사이클로스포린 점안액의 임상적 사용범위가 확대되어 가고, 장기간 사용을 권유함에도 불구하고 안표면에 존재하는 세포, 특히 각막상피세포에 미치는 영향에 관하여 알려진 연구는 드물다. 이에 저자는 배양된 인체 각막상피세포를 대상으로 사이클로스포린의 농도와 접촉시간에 따른 세포증식력 및 세포의 손상 정도를 알아보고자 하였다. 또한, 각막상피세포의 기능적인 평가를 위해 각막상피세포에서 생성되고 분비되는 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP) 및 Laminin과 같은 세포 외 기질과 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 Interleukin (IL)-1 같은 사이토카인의 분비에 미치는 영향에 대해서도 알아보고자 하였다.

■ 접수 일: 2010년 12월 13일 ■ 심사통과일: 2011년 8월 5일
■ 게재허가일: 2011년 9월 27일

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

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 담구어 37°C 배양기에 1시간 처리하여 각막상피세포를 분리한 다음 5분간 1000분당 회전수(revolutions per minute, rpm)에서 원심분리하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning, NY, USA)로 옮겨 95% air-5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에서 일차배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Rockville, NY, USA), 20 ng/ml epidermal growth factor (Gibco BRL, Rockville, NY, USA), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL, Rockville, NY, USA) 및 100 ug/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)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, Rockville, NY, USA)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 부유 시킨 다음, 96 well plate에 200 μl 씩 심은 후 37°C, 5% CO_2 -95%의 배양기에서 다시 배양시켰는데, 배지에서 각막상피세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 4-5일 정도 배양시켰다.

MTT 분석법을 사용한 세포증식 억제력 측정

사이클로스포린(CsA, Sigma, St. Louis, USA)을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%)로 하고, 5분, 10분간 각막상피세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 DPBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어주었다. 약물처리 후 18-24 시간 정도 배양한 다음 세포의 증식 억제 정도를 측정하였다. 약제의 효능을 비교하기 위해 대조군으로 각각 농도의 사이클로스포린을 만드는데 필요한 농도의 알코올을 혼합한 DMEM을 사용하여 상기의 동일한 방법으로 세포를 배양시켜 억제력을 비교하였다. 세포의 대사능력을 측정하기 위해 calorimetric assay 및 MTT solution (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 세포 내에 존재하는 formazan 화합물의 흡광도를 측정하여 비교 분석하였다. MTT solution은 노란색

의 tetrazolium salt가 세포 내의 미토콘드리아에서 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용하여 세포내 형성된 formazan 화합물의 정도를 흡광도를 사용하여 생존하는 세포율(%)을 측정하는 방법이다.

흡광도 측정을 위해 5 mg의 MTT 용액을 PBS 1 ml에 희석하여 0.2 μl 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 reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

이러한 과정들을 3회 반복하여 각 농도와 노출 시간별로 측정된 흡광도의 평균을 구하여 각 세포의 생존율을 구하였는데, 세포생존율은 각 칸의 흡광도 수치를 대조군 칸의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 세포의 생존율(%)=각 칸의 흡광도/대조군 칸의 흡광도 $\times 100$ 으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩을 시도하여 각 군과의 통계학적인 유의성을 비교 관찰하였다.

젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 세포손상의 측정

사이클로스포린을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%)로 하고, 5분, 10분간 각막상피세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물 처리 후 24시간 정도 배양한 다음 세포의 손상 정도를 측정하였다. 대조군으로는 DMEM 를 사용하였고, 세포질에서 유리된 LDH 양을 37°C온도의 암순응 상태에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였는데, 490 nm의 파장에서 각 농도의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다.

세포 외 기질인 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. 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%)의 사이클로스포린을 5분, 10분간 접촉시킨 후 상층액을 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 신선한 DMEM

배지를 첨가하여 24시간 배양한 뒤 배지를 채취하여 -80°C 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°C 에 보관하였다. 각 배양배지와 세포추출물의 PIP, Laminin의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 추출하였다.

염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL-1의 측정

위와 동일한 방법으로 세포를 배양하고 농도별, 시간별로 접촉시킨 후 각 배양배지와 세포추출물의 TNF- α 와 IL-1의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 추출하였다.

통계처리

통계는 SPSS 14.0에서 Wilcoxon signed rank 검사를 이용하였으며, p 값이 0.05 이하인 경우를 유의하다고 하였다.

결 과

세포 증식력 및 세포의 손상 측정

사이클로스포린의 세포증식 억제력을 측정하기 위해 대조군으로 DMEM 배지를 이용하여 각막상피세포의 세포 대사능력을 측정한 결과, 사이클로스포린에 접촉시킨 경우 1 $\mu\text{g/ml}$ (0.0001%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (0.001%), 100 $\mu\text{g/ml}$

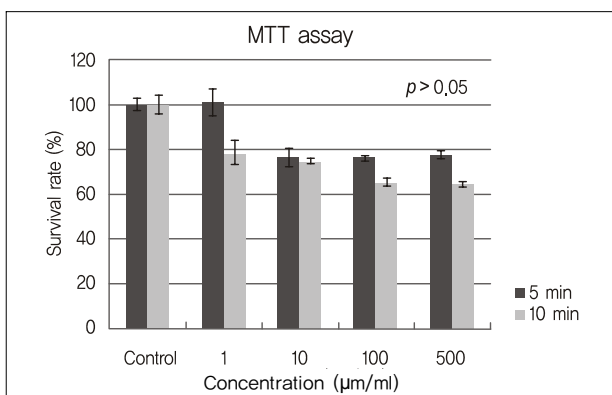


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in corneal epithelial cell exposed in 1 $\mu\text{g/ml}$ (0.0001%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (0.001%), 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.01%), 500 $\mu\text{g/ml}$ (0.05%) cyclosporine by a scanning spectrometer (ELISA reader). Cellular viabilities were not significantly different in proportion to concentration increase. As exposure time lengthened, cell viabilities were not significantly different ($p > 0.05$).

(0.01%), 500 $\mu\text{g/ml}$ (0.05%)의 모든 농도 및 접촉시간에서 대조군에 비해 유의한 차이나 나타나지 않았다($p > 0.05$, Fig. 1). LDH 활성도는 모든 농도에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나($p < 0.017$), 사이클로스포린 농도 및 노출시간에 따른 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$, Fig. 2).

세포 외 기질 PIP와 Laminin의 측정

사이클로스포린에 접촉한 경우 세포 외 기질인 PIP 생성량은 대조군에 비해 농도가 높은 0.01%, 0.05%에서는 유의한 감소를 보이는($p < 0.028$) 반면, 농도가 낮은 0.0001%,

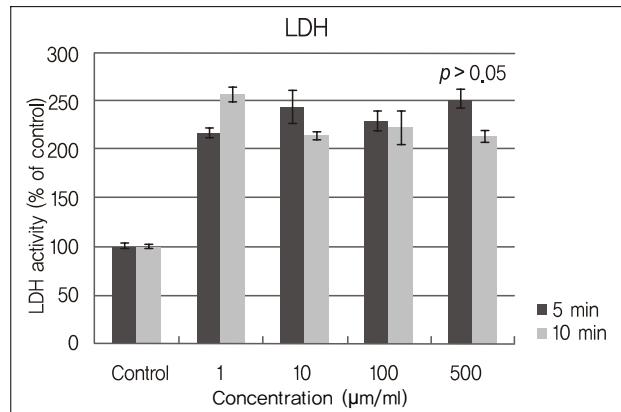


Figure 2. LDH titers of cultured corneal epithelial cells exposed in cyclosporine. LDH titer significantly increased in all cases when exposed to 1 $\mu\text{g/ml}$ (0.0001%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (0.001%), 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.01%), 500 $\mu\text{g/ml}$ (0.05%) cyclosporine ($p < 0.017$) compared with the control group, but there were no significant differences according to exposure time within the concentrations ($p > 0.05$).

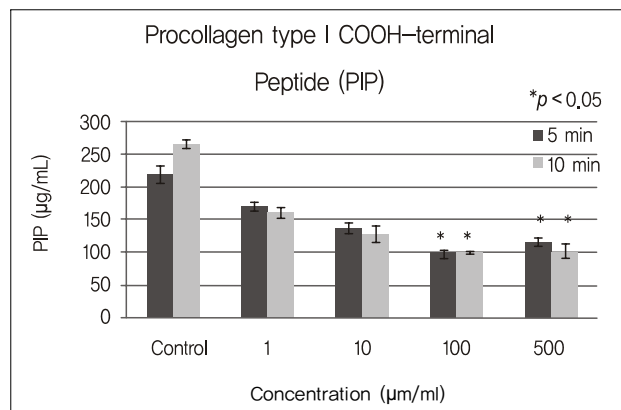


Figure 3. PIP level of cultured corneal epithelial cells exposed to cyclosporine. In contrast to the control group, there were significant differences between the high concentration (100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$) group and control group ($p < 0.028$) (*), but there were no significant differences between the low concentration (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$) group and the control group ($p > 0.05$).

0.001%에서는 유의한 차이가 보이지 않았다($p>0.05$). 또한 약제의 노출시간에 따른 차이는 없었다($p>0.05$, Fig 3). Laminin의 생성도 농도 0.01% 이상에는 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다($p<0.031$). 그러나 사이클로스포린의 노출시간에 따른 생성량의 억제효과는 차이가 없었다($p>0.05$, Fig. 4).

3. 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-1 생성 억제력 비교

각막상피세포에서 분비되는 TNF- α 는 농도에 따른 억제 효과가 나타나지 않았다($p>0.05$, Fig. 5). IL-1의 경우에도 농도에 따라 차이가 없었다. 노출시간에 따른 염증성 사이토카인의 TNF- α 와 IL-1 생성에 관한 차이는 없었다($p>0.05$, Fig. 6).

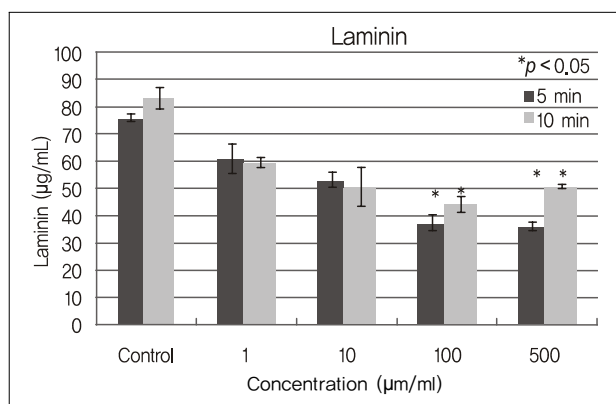


Figure 4. Laminin levels of cultured corneal epithelial cells exposed to cyclosporin. Laminin levels were suppressed compared to the control group. There were significant differences between the high concentration (100 ug/ml, 500 ug/ml) group and control group ($p < 0.028$) (*), however, there were no significant differences between the low concentration (1 ug/ml, 10 ug/ml) group and the control group ($p > 0.05$).

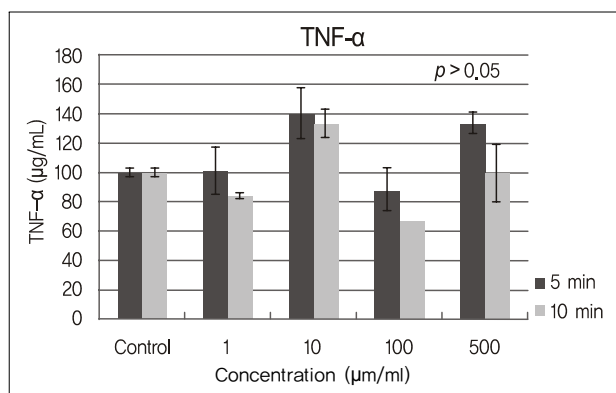


Figure 5. TNF- α levels of cultured corneal epithelial cells exposed to cyclosporin. TNF- α levels did not show any changes according to exposing time or different concentrations ($p > 0.05$).

고 찰

사이클로스포린은 Tolypocladium에서 추출한 hydrophobic, cyclic undecapeptide 물질로서 cyclophilin으로 알려진 세포내 펩타이드에 결합하여, 안표면 조직에서 면역 매개 염증반응의 주된 사이토카인인 IL-2의 생성을 억제시키고, 감소된 IL-2는 helper T 세포의 비활성화를 초래시켜 눈물샘의 림프구 침윤을 줄이고 눈물 생성을 호전시키는 것으로 알려져 있다.^{12,13} 안과적 영역에서는 각막이식 후 면역억제를 통한 거부반응 조절을 위해 사용되기 시작하였으며, 현재는 건성 각결막염에서 눈물분비를 증가시키기 위해 사용된다. 또한 알러지성 결막염, 타이거슨 각막염, 마이봄샘 기능부전, 무륜각막결양, 상윤부각결막염, 라식과 관련된 건성안, 헤르페스성 각막염 등의 다양한 염증성 및 비염증성 질환에서 사이클로스포린 점안액의 사용이 시도되고 있다.^{7-10,14,15}

국소적으로 점안할 경우 전신 부작용의 위험이 적고, 항염증약물인 스테로이드에 비하여 안압상승, 수정체 혼탁 등의 부작용이 없는 장점이 있으나, 직접 약제에 노출되는 각막상피세포에는 독성 효과를 나타낼 수 있다. 가토와 개를 대상으로 시행한 연구에서 사이클로스포린 점안 시 각막실질은 약물 투과의 방어벽 역할을 하여 안내 조직으로는 거의 투과하지 못하였다. 하지만 각막 상피에 고농도로 머물러 있어, 각막조직에서의 반감기는 약 40시간에 달하였고,^{16,17} 안표면 질환의 치료 시 반복적으로 장기간 점안하는 경우가 많으므로 사이클로스포린이 각막상피세포에 미치는 영향에 대한 연구가 중요하다고 할 수 있다. Lee et al¹⁸에 의하면 사이클로스포린 0.05%에 10분 이상 접촉시킨 경우 각막상피세포에 독성 효과를 나타내었으나, 사이클로스포린의 농도에 따른 각막상피세포에 미치는 영향에 관해서는

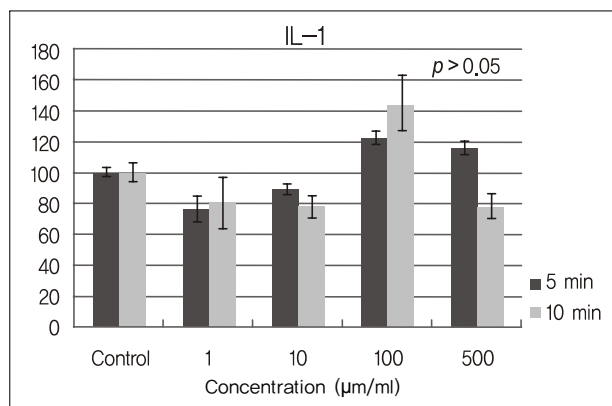


Figure 6. IL-1 levels of cultured corneal epithelial cells after expose to cyclosporin. IL-1 levels did not show any changes according to exposing time or different concentrations ($p > 0.05$).

알려진 바가 거의 없다. 이에 저자들은 사이클로스포린의 농도 및 노출 시간에 따른 세포 증식 억제력 및 독성의 반응을 살펴보고, 세포 외 기질인 collagen, laminin의 생성 억제효과 및 TNF- α 와 IL-1과 같은 염증성 사이토카인의 생성량을 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 낮은 농도의 사이클로스포린 점안액의 안정성을 알아보기 위해 배양된 인체 각막상피세포를 대상으로 사이클로스포린의 농도를 각각 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%)로 조절하고 노출 시간을 5분과 10분으로 나누어서 각막상피세포에 미치는 영향력을 알아보고자 하였다. 약제의 노출시간이 7일 이내의 장시간에 따른 실험결과¹⁹에 비해, 본 연구에서는 저농도의 사이클로스포린을 기준으로 약제 노출시간을 10분 이내로 하여 사이클로스포린이 각막상피세포에 미치는 영향을 살펴보았는데, 이는 결막낭으로 유입되는 눈물의 속도가 약 1 um/min이고, 생리학적 전환속도가 10-15%/min로 10분이면 결막낭의 누액이 모두 대체되어²⁰ 단시간에 결막낭을 통한 약제의 영향력은 10분으로도 충분할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에 따르면 사이클로스포린 점안액의 농도가 증가될수록 대조군에 비해 각막상피세포의 증식이 억제되는 경향이 관찰되지 않았고, LDH 활성도는 대조군에 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였으나 접촉시간에 따른 유의한 차이는 없었다. 사이클로스포린의 점안액이 각막에 미치는 독성 효과에 대한 이전 연구들을 살펴보면, 인체 혹은 가토의 종류나 각막세포의 종류, 노출되는 점안액의 농도에 따라서 다양한 차이를 보였다. Garweg et al¹⁹은 사이클로스포린 농도에 따른 배양된 인체 각막내피세포의 독성 효과를 세포 증식력 및 생존율로 나타내었는데, 7일간의 약제 접촉기간 후 사이클로스포린 5 ug/ml (0.0005%)에서는 세포증식의 억제를 보이지 않다가 50 ug/ml (0.005%) 농도에서는 80% 이상의 세포증식이 억제되어 대조군에 비해 유의한 생존율의 감소를 보인다고 하였다. 또한 배양된 인체 각막내피세포를 이용한 연구에서 사이클로스포린 1000 ug/ml (0.0001%)의 농도로 7일간 접촉한 후 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 정상적인 핵의 형태를 유지하였고, 세포질 내에서는 어떤 퇴행성 공포 변화도 발견되지 않았으며, 대조군과 유사하게 정상적인 형태를 유지하면서 정상적인 세포분열이 관찰되었다고 보고하였다.²¹ 배양된 각막실질세포를 대상으로 한 연구에서는 사이클로스포린 100-250 ug/ml (0.01-0.025%) 농도로 노출하였을 때 약제에 의한 세포의 독성은 관찰할 수 없었으며, 단지 배양된 각막실질세포에서 DNA 합성이 10-15% 정도로 감소되는 현상이 관찰되었다고 보고하였다.²² 본 연구에서는 1 ug/ml (0.0001%),

10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), 500 ug/ml (0.05%) 농도의 사이클로스포린에 노출된 인체의 각막상피세포는 대조군에 비해 세포 증식력의 유의한 차이는 보이지 않았고, LDH 수치에서는 0.0001% 농도에서도 대조군에 비해 유의한 세포의 손상을 보였다. MTT상에서 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않는 것은 낮은 농도의 사이클로스포린이 10분 정도 노출될 경우, 초기에는 세포에 직접적인 손상은 가하지만 시간이 경과하면서 각막상피세포가 왕성하게 증식 혹은 분화가 일어나기에 시간이 지날수록 각막상피세포의 대사력 차이는 적어진다고 생각된다. 하지만, 임상적으로 사용할 수 있는 약제의 농도와 노출시간의 적용을 위해서는 생체 내에서의 장시간 사이클로스포린에 접촉되어 나타나는 세포의 영향에 관한 실험연구도 필요하다.

세포 외 기질은 조직을 지지하면서 모세혈관과 세포사이의 조직액의 이동에 중계역할을 할 뿐 아니라 조직의 분화 과정에도 중요한 역할을 한다. 그중 교원질 섬유는 반흔조직에서 주로 장력을 유지하는 역할을 하기에 결막이나 각막의 창상조직 회복에 매우 중요한 역할을 한다.²³ 이런 세포 외 기질은 각막의 실질세포나 결막 섬유아세포에서 주로 생성이 되고 관찰되지만 각막상피세포의 바닥복합체에서도 존재하기에 각막상피층의 유지에도 기능적인 작용을 반영할 것으로 생각되어 작용유무에 관한 관찰을 시행하였다. 본 연구에 따르면, 교원질을 구성하는 PIP 생성량은 대조군에 비해 농도가 높은 0.01%, 0.05%에서는 유의한 감소를 보이는($p<0.028$) 반면, 농도가 낮은 0.0001%, 0.001%에서는 유의한 차이가 보이지 않았다($p>0.05$). 그러나 약제를 5분과 10분간 접촉을 시킨 경우에는 두 군간 유의한 차이가 없는 것으로 나타나 농도가 노출시간보다는 중요하게 작용하는 것을 알 수 있었다. Laminin은 세포의 기저막을 형성하는 당단백질 성분으로, 결막의 상피층의 창상회복에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁴ 또한 결막 섬유모세포에서는 이러한 세포 외 기질 생성이 사이클로스포린에 의해 유의하게 감소됨이 보고된 바 있다.²⁵ 본 연구에서도 Laminin 생성 억제는 대조군에 비해 농도가 높은 0.01%, 0.05%에서는 유의한 감소를 보이는($p<0.031$) 반면, 농도가 낮은 0.0001%, 0.001%에서는 유의한 차이가 보이지 않았다($p>0.05$). 따라서, 사이클로스포린 점안액은 세포 외 기질인 PIP나 laminin의 생성에 대한 억제효과가 노출시간보다 농도가 중요하게 생각되고, 각막상피층의 창상 및 술 후 치유 과정에서 영향력을 높이기 위해서는 최소한 농도가 0.01% 이상이 되어야 할 것으로 생각된다.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 Interleukin (IL)-1은 염증과 면역반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 사이

토키아인으로 여러 질병의 병리과정에서 증폭되며, 상처와 질병에 대한 인체의 반응과 회복의 주요한 인자로 작용한다.²⁶ 인체 각막상피에서는 세포 외 결체조직의 제거와 재형성을 담당하는 Matrix metalloproteinase (MMP)를 상향 조절하는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인으로 작용한다.^{27,28} Djalilian et al²⁹은 텍사메타존에 노출된 배양된 각막상피세포나 섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 생성이 억제되는 것과 달리, 사이클로스포린은 각막상피세포나 섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 형성에 억제 효과가 없다고 하였고, 이는 사이클로스포린의 면역억제 효과가 일차적으로 면역세포에 매개되기 때문이라고 하였다. 본 연구에서도 사이클로스포린의 농도와 노출 시간에 따라 각막상피세포에서 분비되는 TNF- α 와 IL-1의 양은 대조군에 비해 의미있는 변화를 보이지 않았다. 다만, 염증 상태에서 측정된 값이 아니라 한계가 있어, 추가적으로 다양한 염증성 질환에서 실험이 필요할 것으로 생각한다.

따라서, 각막상피세포를 대상으로 사이클로스포린 점안액을 사용할 경우 세포의 증식억제나 세포 외 기질인 PIP, laminin의 생성을 억제하기 위해서는 0.01% 농도 이상의 농도를 사용해야 하며, 노출시간에는 무관하게 염증성 사이토카인에 미치는 영향력은 미비하다는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Hill JC. Immunosuppression in corneal transplantation. *Eye* 1995;9:247-53.
- Dick AD, Azim M, Forrester JV. Immunosuppressive therapy for chronic uveitis: optimising therapy with steroids and cyclosporine A. *Br J Ophthalmol* 1997;81:1107-12.
- Masuda K, Nakajima A, Urayama A, et al. Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet* 1989;1:1093-6.
- Le Hoang P, Girard B, Deray G, et al. Cyclosporin A in the treatment of birdshot retinochoroidopathy. *Transplant Proc* 1988;20:128-30.
- Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med*. 2000;2:1-23.
- Minguez E, Tiestos MT, Cristobal JA, et al. Intraocular absorption of cyclosporin A eyedrops. *J Fr Ophthalmol* 1992;15:263-7.
- Oh C, Apel AJ, Saville BA, et al. Local efficacy of cyclosporine in corneal transplant therapy. *Curr Eye Res* 1994;13:337-43.
- BenEzra D, Matamoros N, Cohen E. Treatment of severe vernal keratoconjunctivitis with cyclosporine A eyedrops. *Transplant Proc* 1988;20:644-9.
- Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45 suppl.2:S27-39.
- Diaz-Valle D, Benítez del Castillo JM, Castillo A, et al. Immunologic and clinical evaluation of postsurgical necrotizing sclerocorneal ulceration. *Cornea* 1998;17:371-5.
- Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *CsA Phase 3 Study Group. Ophthalmology* 2000;107:631-9.
- Nussenblatt RB, Palestine AG. Cyclosporin: immunology, pharmacology and therapeutic uses. *Surv Ophthalmol* 1986;31:159-69.
- Power WJ, Mullaney P, Farrel M, et al. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjögren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.
- Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol* 2009;54:321-38.
- Tatlipinar S, Akpek EK. Topical ciclosporin in the treatment of ocular surface disorder. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1363-7.
- Wiederholt M, Kössendrup D, Schulz W, Hoffmann F. Pharmacokinetic of topical cyclosporin A in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:519-24.
- Acheampong AA, Shcakleton M, Tang-Liu DD, et al. Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res* 1999;18:91-103.
- Lee LE, Shin WB, Lee JS. Effect of cyclosporine A 0.05% on human corneal epithelial cells. *J Korean Ophthalmol* 2007;48:1399-1409.
- Garweg JG, Wegmann-Burns M, Goldblum D. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:382-9.
- Mauger TF, Craig EL. *Havener's Ocular Pharmacology*, 6th ed. St. Louis: Mosby, 1994;28.
- Singh G, Lindstrom RL, Doughman DJ. Cyclosporin A on human corneal endothelium. *Cornea* 1984;3:272-7.
- BenEzra D, Antebi I, Maftzir G. Differential effect of cyclosporin A on lymphocyte and keratocyte proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:42.
- Tonoe O, Yamanaka O, Okada Y, et al. Collagen biosynthesis and cellular proliferation after filtering surgery in rabbits. *Folia Ophthalmol Jpn* 1995;46:242-5.
- 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.
- Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporine A on human conjunctival fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1512-7.
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sciences* 1996;59:61-83.
- Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2001;73:449-59.
- Bargagna-Mohan P, Strissel KJ, Fini ME. Regulation of gelatinase B production in corneal cells is independent of autocrine IL-1 α . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:784-9.
- Djalilian AR, Nagineni CN, Mahesh SP, et al. Inhibition of inflammatory cytokine production in human corneal cells by dexamethasone, but not cyclosporin. *Cornea* 2006;25:709-14.

=ABSTRACT=

Effects of Low-Dose Cyclosporine on Human Corneal Epithelial Cells

Sang Jun Lee, MD¹, Su Jin Kim, MD², Jong Soo Lee, MD, PhD¹

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

Department of Ophthalmology, Maryknoll Medical Center², Busan, Korea

Purpose: To evaluate the response and cellular changes of cultured human corneal epithelium according to the concentration of topical cyclosporine.

Methods: Human corneal epithelial cells were exposed to cyclosporine A concentrations of 1 ug/ml (0.0001%), 10 ug/ml (0.001%), 100 ug/ml (0.01%), and 500 ug/ml (0.05%) for 5 and 10 minutes. An MTT-based colorimetric assay was performed to assess the metabolic activity of cellular proliferation and a lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay was used to determine cellular toxicity. The modulations of extracellular matrix proteins such as PIP and laminin were evaluated. The levels of pro-inflammatory cytokine, TNF- α , and IL-1 were evaluated by ELISA kits.

Results: The inhibitory effects of human corneal epithelial cellular proliferation did not show a concentration- or exposure time-dependent response. Activity of LDH did not show a statistically significant difference for the different concentrations and exposure times. The inhibitory effects of extracellular matrix proteins such as PIP or laminin synthesized from human corneal epithelial cells were compared with those in the control group and showed a statistically significant difference at a cyclosporine concentration greater than 0.01%. Released TNF- α and IL-1 from human corneal epithelial cells did not show any difference according to concentration or cyclosporine exposure time.

Conclusions: To modulate human corneal epithelial cellular proliferation and the levels of extracellular matrix proteins such as PIP and laminin, a concentration of cyclosporine A greater than 0.01% for longer than 5 minutes of exposure is needed. There were little effects of cyclosporine A on pro-inflammatory cytokine secreted from corneal epithelial cells.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(11):1344-1350

Key Words: Corneal epithelium, Cyclosporine, Toxicity

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