

익상편조직의 섬유모세포에 미치는 사이클로스포린의 영향

이종수¹ · 이승욱² · 이상준¹ · 김나미¹

부산대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 고신대학교 의과대학 안과학교실²

목적: 익상편 조직의 재발 억제를 목적으로 임상에서 이용되는 사이클로스포린이 익상편조직의 세포에 미치는 영향에 관하여 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 수술적 방법으로 절제된 인체 익상편세포를 배양하여 0.1 µg/ml (0.00001%), 1 µg/ml (0.0001%), 10 µg/ml (0.001%), 100 µg/ml (0.01%), 500 µg/ml (0.05%) 농도의 사이클로스포린에 각각 5분, 10분간 접촉시킨 후 MTT 분석법으로 세포 증식 억제 정도와 LDH 분석법으로 세포의 손상정도를 측정하였다. 익상편 세포의 세포 외 기질인 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP)와 Laminin, Matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9의 양을 농도별로 비교, 측정하였다. 또한 익상편세포에서 분비되는 Tumor necrotic factor (TNF)-α 및 Interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-8을 측정하여 분비되는 사이토카인의 양도 비교하고자 하였다.

결과: MTT 분석법상 대조군에 비해 농도와 노출시간에 따른 유의한 증식억제는 관찰되지 않았다($p>0.05$). LDH의 수치는 유의한 차이가 없었으며, 세포 외 기질인 PIP나 laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9 생성억제에 대한 차이도 없었다($p>0.05$). 전염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-1b, IL-6, IL-8의 생성억제도 대조군에 비해 농도와 약제의 노출시간에 따라 의미 있는 차이는 없었다($p>0.05$).

결론: in vitro 상태의 익상편 세포에 대해 농도 0.05% 이하, 노출시간 10분 이하의 사이클로스포린은 세포증식을 억제하거나 세포손상을 심하게 유발하지 않았으며, 세포 외 기질인 PIP나 laminin, MMPs 및 전염증성 사이토카인인 TNF-α, ILs에 미치는 영향력이 미비하였다.

〈대한안과학회지 2012;53(3):466-472〉

익상편은 조직의 재형성, 세포증식, 신생혈관화, 염증 반응을 특징으로 하는 비교적 흔한 안구표면 질환이다.^{1,2} 조직학적 특징으로는 섬유모세포와 혈관세포의 증식 및 비정상 세포 외 물질의 축적과 더불어 염증과 침윤의 세포 반응을 동반한다.³⁻⁶ 최근의 연구에 따르면 T 림프구의 침윤 및 세포간 접착 분자-1 (ICAM-1), HLA-DR 발현이 세포면역과 염증의 주요한 인자라는 사실을 뒷받침해주고 있고,^{7,8} 이 과정에서 Interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-8 및 TNF-α 같은 전염증인자가 관여한다고 알려져 있다. 또한 이런 과정에서 분비되는 사이토카인은 배양된 테논낭의 섬유모세포 증식을 자극하고 배양된 익상편세포에서 MMP의 발현을 유도한다.^{6,9}

사이클로스포린(cyclosporin A, CsA)은 안과 영역에서 포도막염, 베헤트병, 산탄맥락망막증(bird-shot choroidopathy)과 같은 질환의 치료에 전신적 투여가 사용되

었고, 사이클로스포린의 약리학적 효과는 T-helper 세포에 대해 선택적인 억제, IL의 합성 및 분비의 조절, VEGF의 억제로 약효가 나타난다.¹⁰

익상편 조직의 억제를 위해 사용하는 사이클로스포린의 연구내용을 살펴보면, 익상편의 염증 단계에 있어서 0.05% 사이클로스포린의 사용이 염증 반응의 조절 및 주관적 증상의 호전, 수술적 치료의 시기를 연장시키는 효과가 보고되었고,¹¹ 익상편의 수술적 제거 후 보조요법으로 사이클로스포린을 사용하였을 때 유의하게 재발률을 억제한다고 한다.¹²⁻¹⁴ 그러나 아직까지도 사이클로스포린 약제의 농도 및 노출시간에 따른 직접적인 익상편 세포의 억제 및 조직 면역학적인 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 수술적 방법으로 제거된 인체 익상편조직의 섬유모세포를 대상으로 사이클로스포린의 농도와 접촉시간에 따른 세포증식 억제 및 세포의 손상 정도를 알아보고자 하였다. 익상편 세포의 기능적인 평가를 위해 생성되고 분비되는 Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP) 및 Laminin, Matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9와 같은 세포 외 기질과 Tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 Interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-8 같은 사이토카인의 분비에 미치는 영향에 대해서도 알아보고자 하였다.

■ 접수 일: 2011년 9월 5일 ■ 심사통과일: 2011년 10월 20일
■ 게재허가일: 2012년 2월 17일

■ 책임저자: 이종수

부산시 서구 구덕로 179
부산대학교병원 안과
Tel: 051-240-7323, Fax: 051-242-7341
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (A070001).

대상과 방법

세포배양과 처리

수술적 처리로 제거된 40대 환자의 익상편 조직을 2×2 mm 크기로 만든 후 즉시 transfer media에 담아 실험실로 옮긴 후 25 cm² flask에 배양시켰는데, 이 때 배지로는 5.5 mM glucose, 200 µg/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine이 함유되어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)를 사용하였고, 10% 송아지 혈청(FBS: Gibco BRL, Rockville, NY, USA)을 첨가하여 37℃ 온도에서 5% CO₂-95% air의 보육기(Model 5100: NAPCO, USA)에서 배양하였고 3-4 세대째 계대배양세포로 실험하였다. Coulter counter로 세포 수를 측정한 후 96 well plate에 2×10⁴ cells/ml을 200 µl 씩 옮겨 37℃, 5% CO₂-95% air의 보육기에 다시 배양시키는데, 이 때 세포의 수가 너무 뺄뺄할 경우 각 약물에 의한 영향이 미비할 수 있으므로 배지에서 섬유아세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 48-36시간 정도 배양시켰다.

MTT 분석법을 사용한 세포증식 억제력 측정

사이클로스포린(CsA: Sigma, St. Louis, USA)을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 1 µg/ml (0.0001%), 10 µg/ml (0.001%), 100 µg/ml (0.01%), 500 µg/ml (0.05%)로 하고, 5분, 10분간 익상편세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 1회 세척한 다음 배지를 넣어주었다. 약물처리 후 18-24시간 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 노란색의 tetrazoliums salt가 세포 내의 미토콘드리아에서 미토콘드리아 효소에 의해 청색의 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용하여 세포 내 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℃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 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×100으로 나타냈고, 상기의 실험은 각 농도별로 3번씩을 시도하였다.

젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석법을 이용한 세포손상의 측정

사이클로스포린을 99% 알코올 용매에 용해시켜 농도를 0.1 µg/ml (0.0001%), 1 µg/ml (0.0001%), 10 µg/ml (0.001%), 100 µg/ml (0.01%), 500 µg/ml (0.05%)로 하고, 5분, 10분간 익상편세포에 약물을 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지를 넣어 주었다. 약물 처리 후 24시간 정도 배양한 다음 세포의 손상 정도를 측정하였다. 대조군으로는 DMEM을 사용하였고, 세포질에서 유리된 LDH 양을 37℃ 온도의 암순환 상태에서 ELISA reader를 이용하여 측정하였는데, 490 nm의 파장에서 각 농도의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다.

세포 외 기질인 PIP, Laminin 및 MMP의 측정

24 well plate에 well당 1×10⁴ cells/ml을 심은 후 충분히 자랄 때까지 2-4일 정도 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS를 이용하여 세척하였다. 1 µg/ml (0.0001%), 10 µg/ml (0.001%), 100 µg/ml (0.01%), 500 µg/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℃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, Laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 추출하였다.

전염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL의 측정

위와 동일한 방법으로 세포를 배양하고 농도별, 시간별로 접촉시킨 후 각 배양배지와 세포추출물의 TNF- α 와 IL-1b, IL-6, IL-8의 농도는 ELISA kits (Takara, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

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 익상편 조직의 섬유모세

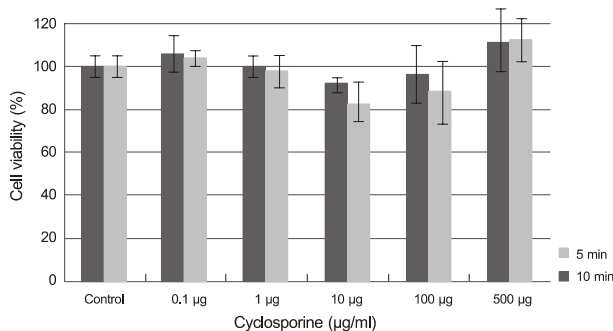


Figure 1. Metabolic activities of cultured human pterygial cells measured with MTT assays by a scanning spectrometer (ELISA reader). There is no significant difference of cellular viabilities between the experimental and control groups with increasing concentration and longer exposure time ($p > 0.05$).

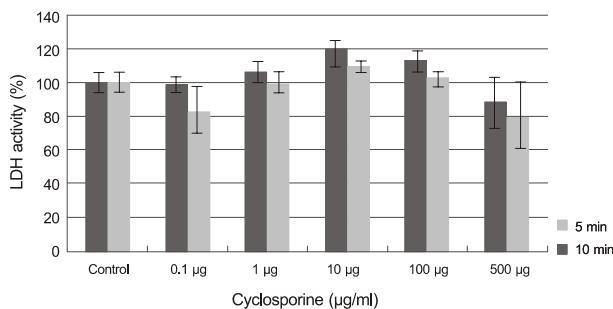


Figure 2. LDH titers of cultured human pterygial cells exposed in cyclosporine. There is no significant difference of LDH activities in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

포의 세포 대사능력을 측정한 결과, 대조군과 실험군과의 유의한 차이가 없었으며, 10 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 세포의 대사력이 감소하기 시작하였으나 각 농도와 접촉 시간에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 1). LDH 활성도는 대조군에 비해 1 µg/ml 이상의 농도에서 높은 수치를 보였으나 농도 및 노출시간과는 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$)(Fig. 2).

세포 외 기질 PIP, Laminin, MMP의 측정

사이클로스포린에 접촉한 경우 세포 외 기질인 PIP 생성량은 대조군에 비해 1 µg/ml 이상의 농도에서 억제효과를 보였으나 모든 농도군에서 유의한 차이가 보이지 않았다. 또한 약제의 노출시간에 따른 변화에서도 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$)(Fig. 3). Laminin의 생성은 대조군에 비해 1 µg/ml 이상의 농도에서 오히려 증가하다가 감소하여 농도 및 노출시간에 따른 억제효과의 차이가 없었다($p > 0.05$)(Fig. 4). MMP-1의 경우는 농도가 증가할수록 오히려 증가하는 양상을 보였고, MMP-2의 경우는 1 µg/ml의 농도에서 억제효과가 크게 나타났으나 유의한 차이는

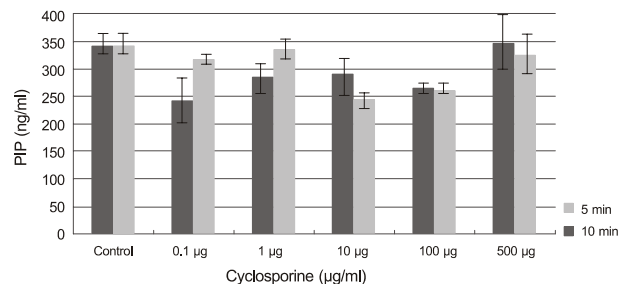


Figure 3. PIP level of cultured human pterygial cells exposed in cyclosporine. There is no significant difference of PIP levels in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

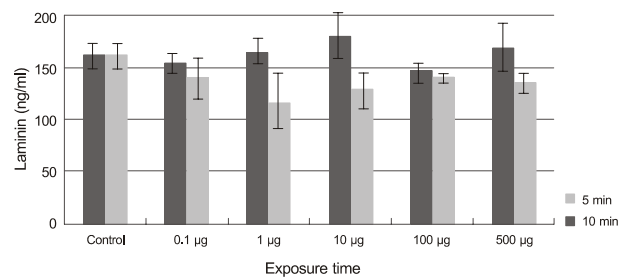


Figure 4. Laminin level of cultured human pterygial cells exposed to cyclosporin. There is no significant difference of laminin levels in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

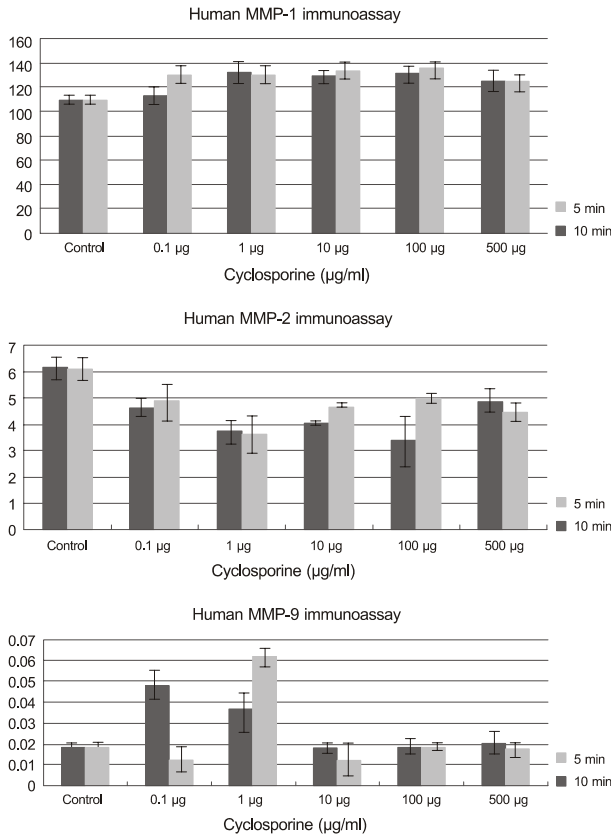


Figure 5. MMP level of cultured human pterygial cells exposed to cyclosporine. There is no significant difference of MMP-1 (upper), MMP-2 (middle), MMP-9 (lower) levels in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

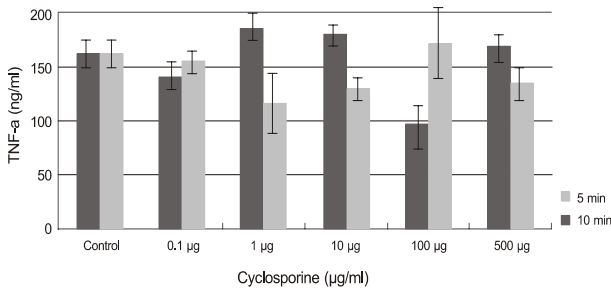


Figure 6. TNF- α level of cultured human pterygial cells exposed to cyclosporine. There is no significant difference of TNF- α levels in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

없었고, MMP-9는 대조군에 비해 농도 및 노출시간에 따른 변화의 차이는 거의 없었다($p > 0.05$)(Fig. 5).

전염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL 생성 억제력 비교

익상편조직의 섬유모세포에서 분비되는 TNF- α 는 농도

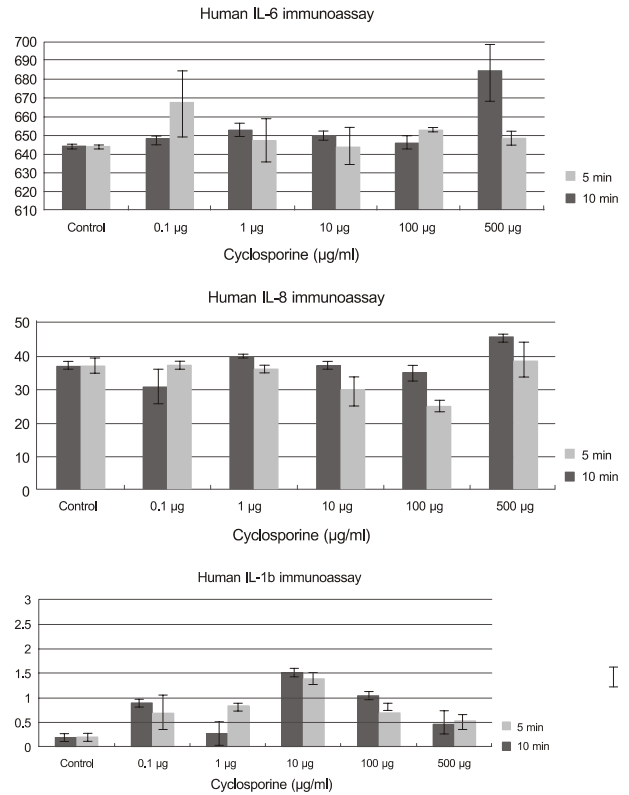


Figure 7. IL level of cultured human pterygial cells exposed to cyclosporine. There is no significant difference of IL-6 (upper), IL-8 (middle), IL-1b (lower) levels in cultured pterygial cells between the experimental and control groups according to concentration and exposure time ($p > 0.05$).

에 따라 결과를 대조군과 비교해 보았을 때 5분에 비해 10분의 노출에서 1 µg/ml 이상의 농도에서 억제효과가 크게 나타났으나 유의한 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$)(Fig. 6). IL-6의 경우 대조군에 비해 생성억제의 유의한 차이는 없었고, IL-8의 경우도 대조군에 비해 점차 감소하는 경향이 있었으나 유의한 차이는 없었다. IL-1b의 경우에도 농도에 따라 차이는 없었다. 그리고, 약제의 접촉시간에 따른 염증성 사이토카인의 TNF- α 와, IL-6, IL-8, IL-1b 생성에 관한 유의한 차이 또한 없었다($p > 0.05$)(Fig. 7).

고 찰

최근의 연구에 따르면, 익상편은 세포의 퇴행성 변화보다는 세포 성장의 장애로 생각되고 있다.^{5,15} 이러한 과정에서 밝혀진 익상편의 조직병리적인 과정과 사이클로스포린의 효과 간에 연관성을 바탕으로 최근에는 염증 단계의 익상편에 대한 치료 및 수술 후의 재발 억제 목적으로 사이클로스포린의 사용에 대한 다양한 연구가 보고되고 있다. 사이클로스포린의 점안액이 익상편에 미치는 영향에 대한 연

구들을 살펴보면, 익상편에 의해 유발된 충혈, 부종, 자극감 등의 증상에 있어서 0.05% 사이클로스포린이 무방부제 인공눈물이나 스테로이드 점안액에 비해 환자의 주관적 증상, OSDI (ocular surface disease index), 눈물막 파괴시간 및 쉬르며 검사에서 유의하게 호전된 결과를 보였고,¹¹ 익상편의 크기에 있어서도 진행하는 것을 늦춘다고 하였다. 또한 수술적으로 익상편을 제거한 후 재발률 차이에 있어서도 bare sclera technique으로 수술만 시행한 군은 익상편 재발률이 44.4%인 반면, 수술 후 0.05% 사이클로스포린을 사용한 군은 재발률이 22.2%로, 술 후 사이클로스포린의 사용이 낮은 재발률을 나타내었다.¹² 또 다른 보고에 의하면 bare sclera technique으로 수술만 시행한 군에서는 익상편의 재발률이 45.2%인 반면, 술 후 0.05% 사이클로스포린을 사용한 군의 재발률은 12.9%로 보고하였다.¹³ 익상편 조직을 제거한 후 자가결막이식술을 시행하면서 술 중 보조 요법으로 0.01% Mitomycin을 사용한 후, 1% 사이클로스포린을 사용한 군에서는 재발률이 7.5%, 사이클로스포린을 사용하지 않은 군에서는 17.5%의 높은 재발률을 보였다고 하였다.¹⁴ 그러나 익상편 제거수술과 더불어 0.05% 사이클로스포린을 사용한 경우 자극감, 충혈 등으로 경미한 부작용이 주로 발생하지만, 수술 후 1% 사이클로스포린을 사용한 군에서 드물게는 공막이 연화되는 합병증이 나타나기도 한다.¹⁴ 이러한 일련의 보고들은 수술적 방법, 대사의 제거의 사용유무, 사이클로스포린 농도의 차이 및 노출시간 등에 따라 달리 결과를 보이지만 익상편의 재발을 억제하는 데 임상적인 효과가 있음을 보고하고 있다.

그러나, 실제적으로 약제의 농도 및 노출시간에 따른 익상편 세포의 억제 효과나 관계된 염증인자 및 세포증식에 연관된 성장인자 등의 억제력에 관한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 농도 및 노출 시간에 따른 사이클로스포린 점안액의 효과를 알아보기 위해서, 사이클로스포린의 농도를 각각 0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.05%로 조절하고 노출 시간을 5분, 10분으로 나누어 배양된 인체의 익상편 조직의 섬유모세포에 대한 세포 증식억제 및 독성을 살펴보았다. 본 실험에서 0.05% 이하 저농도의 사이클로스포린으로 실험한 이유는 공막연화 및 괴사와 같은 합병증의 가능성이 1% 사이클로스포린 농도에서 발생되었기에 그러한 위험성을 낮추면서, 상품화되어 흔히 사용되는 사이클로스포린의 농도가 0.05%이고, 익상편 수술 후 보조요법으로 약제를 사용하여 재발률 감소를 얻었기에 그 이하의 농도에서 임상적 효용성에 대해 알아보고자 하였다. 노출 시간을 5분과 10분으로 설정한 이유는 결막낭으로 유입되는 눈물의 속도가 약 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ 이고, 생리학적 전환속도가 10-15%/min인 점을 감안해 볼 때, 10분이면 결막낭

의 누액이 모두 대체되어 안구가 약제에 노출되기 때문이다.¹⁶ 저자들의 연구에 따르면, MMT의 경우 사이클로스포린 사용 군에서 대조군에 비해 세포의 증식이 억제되는 경향이 유의하지 않았고, LDH 활성도도 대조군에 비해 농도 및 접촉시간에 따른 유의한 차이는 없어 세포의 심한 손상을 유발하지 않는 것으로 나타났다. 이는 *in vivo*와 *in vitro*와의 세포성장에 관한 환경적인 차이가 있음에도 불구하고 사이클로스포린의 약제농도가 익상편 섬유모세포 증식의 억제를 초래할 만큼 약효가 강하지 못하다는 것을 증명하고 있다. 익상편 제거술 후 사용되는 약제의 경우 익상편 조직의 성숙이 안정화되어 있는데 반해, 재생되는 경우는 세포의 미성숙으로 인해 약제 노출에 의한 세포 증식 억제가 크게 작용한다고 생각되며, 이는 저자들의 다른 논문에서도 유사한 결과를 얻었다.¹⁷ 저자들의 실험에 의하면, 0.05% 농도의 마이토마이신C, 텍사메타존, 사이클로스포린에 의한 각막실질세포에서의 세포증식 억제력을 측정하기 위해 세포의 대사능력을 알아본 결과, 세 약제 모두 3분, 5분, 10분의 접촉시간이 길어질수록 대조군에 비해 각막실질세포의 증식이 억제되는 경향을 보였다. 세포의 생존율은 마이토마이신C에서는 각각 52.6%, 46.4%, 41.5%, 텍사메타존은 각각의 노출 시간에서 55.8%, 54.6%, 41.8%, 사이클로스포린은 72.7%, 70.1%, 50.3%로 나타나 실험 대상의 세포가 다르기는 하지만 사이클로스포린의 약제효과가 대조군에 비해 가장 미약하며 본 실험의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.¹⁸ 따라서, 이는 각막실질세포의 세포 생존율보다 훨씬 높은 생존율을 보이는 익상편 섬유모세포의 경우 0.05% 이하 사이클로스포린의 농도에 10분 가량 노출되더라도, *in vitro*상 익상편 조직이 안정화된 상태에서는 섬유모세포의 증식억제에 큰 영향력이 없을 것으로 생각한다.

세포 외 기질은 조직을 지지하면서 모세혈관과 세포 사이의 조직액의 이동에 중계역할을 할 뿐 아니라 조직의 분화과정에도 중요한 역할을 한다. 그중 교원질 섬유는 반흔 조직에서 주로 장력을 유지하는 역할을 하기에 결막이나 각막의 창상조직 회복에 매우 중요한 역할을 한다.¹⁶ 본 연구에 따르면, 교원질을 구성하는 PIP 생성량은 대조군에 비해 유의한 차이가 보이지 않았다($p>0.05$). Laminin은 세포의 기저막을 형성하는 당단백질 성분으로, 결막의 상피층의 창상회복에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 또한 결막하의 섬유모세포에서는 이러한 세포 외기질 생성이 사이클로스포린에 의해 유의하게 감소됨이 보고된 바 있다.²⁰ 본 연구에서는 Laminin 생성 억제는 대조군에 비해 농도 및 노출시간에 따른 유의한 차이가 보이지 않았다($p>0.05$). MMP는 정상적인 생물학적 과정인 배발생, 착상, 기관형성, 신경성장, 배란, 자궁확장, 뼈형성, 상처치유, 혈관신생 및

세포사멸뿐만 아니라 관절염, 암, 심혈관 질환, 신경성 질환, 뇌-혈액관문의 파괴, 피부 및 위궤양, 간경화 등의 다양한 병적인 과정에도 관여한다. 본 연구에서 결막의 염증 및 침윤에서 높게 발현되는 MMP-1, MMP-2, MMP-9에 대한 생성 억제 역시 대조군에 비해 유의한 차이가 보이지 않았다. 따라서, 0.05% 이하의 사이클로스포린 점안액은 익상편세포에서 생성되는 세포 외 기질인 PIP나 laminin, MMP의 생성에 대해 억제 효과도 크지 못하기에 결막이나 테논낭의 창상 및 술 후 치유 과정에서 영향이 비교적 적을 것으로 생각한다.

TNF와 IL은 염증과 면역반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 사이토카인으로서 여러 질병의 병리과정에서 증폭되며, 상처와 질병에 대한 인체의 반응과 회복의 주요한 인자로 작용한다.²¹ 인체 상피에서는 세포 외 결체조직의 제거와 재형성을 담당하는 MMP를 상향 조절하는 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인으로 작용한다.^{22,23} 스테로이드 제제인 텍사메타존에 노출된 배양된 각막상피세포나 섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 생성이 억제되는 것과 달리, 사이클로스포린은 각막상피세포나 섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 형성 억제 효과는 없는 것으로 알려져 있다.^{24,25} 본 연구에서도 사이클로스포린의 농도와 노출 시간에 따라 익상편세포에서 분비되는 TNF- α 와 IL-1b, IL-6, IL-8의 양은 대조군에 비해 의미 있게 억제가 되지 않아서, 상기의 사실을 뒷받침해 주고 있다.

익상편세포를 대상으로 사이클로스포린을 0.05% 이하의 농도로 10분 가량의 노출을 할 때, 세포의 증식억제나 세포 외 기질의 생성 억제 및 염증성 사이토카인에 대한 영향력은 미비하다는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 염증 단계의 익상편에 대한 치료 및 수술 후의 재발 억제 목적으로 사이클로스포린 사용의 필요성에 대해 연구한 보고들과는¹¹⁻¹⁴ 상반된 결과를 보인다. 그러나, 고려해야 할 부분으로는 익상편의 존재 시 임상증상의 지표로 사용된 OSDI 및 눈물막 파괴시간, 쉬르머 검사는 이미 안건조증에서 사이클로스포린의 효과로 검증된 부분이나, 익상편 제거술을 시행한 후 마이토마이신 C의 술 중 부가적인 사용 후에 사이클로스포린의 점안 효과는 마이토마이신의 약제로 심하게 손상된 조직에 추가적으로 사이클로스포린의 약효가 첨부되어 손상을 가하기에 진정한 사이클로스포린의 익상편 조직 억제효과로 간주하기에는 다소 미흡한 부분이 존재한다. 따라서, 임상적으로 많이 사용되는 0.05% 사이클로스포린의 직접적인 익상편조직에 대한 섬유모세포의 억제효과를 알아 보기 위해서는 마이토마이신C의 부가적인 사용이 없는 경우의 임상연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각한다.

따라서 익상편 조직의 재발이나 성장을 억제하기 위해서

는 현재 제품으로 생산되는 0.05% 사이클로스포린의 단독적인 사용은 임상적으로 섬유모세포의 억제효과가 미비하기에, MMC 같은 세포대사억제제 등의 병합사용이나 사이클로스포린 자체의 농도를 높이거나 약제의 노출시간을 길게 하여 적용해 보는 실험적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10:282-8.
- 2) Hill JC, Maske R. Pathogenesis of pterygium. *Eye (Lond)* 1989; 3:218-26.
- 3) Cameron ME. Histology of pterygium: an electron microscopic study. *Br J Ophthalmol* 1983;67:604-8.
- 4) Chan CM, Liu YP, Tan DT. Ocular surface changes in pterygium. *Cornea* 2002;21:38-42.
- 5) Wang JJ, Lai WT, Liou SW. Impression cytology of pterygium. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16:519-28.
- 6) Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:195-228.
- 7) Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Gastaud P, Lapalus P. HLA DR and DQ distribution in normal human ocular structures. *Curr Eye Res* 1988;7:903-11.
- 8) Byun YS, Jeon EJ, Chung SK. Clinical effect of cyclosporine 0.05% eye drops in dry eye syndrome patients. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:1583-8.
- 9) Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3430-7.
- 10) Strong B, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 2005;24:80-5.
- 11) Barry A, Schechter. Cyclosporine may be new treatment option for pterygia; Offers alternative to topical corticosteroids, may reduce or delay need for surgery. *Ophthalmology Times* 2007;6:33-4.
- 12) Turan-Vural E, Torun-Acar B, Kivanc SA, Acar S. The effect of topical 0.05% cyclosporine on recurrence following pterygium surgery. *Clin Ophthalmol* 2011;5:881-5.
- 13) Yalcin Tok O, Burcu Nurozler A, Ergun G, et al. Topical cyclosporine A in the prevention of pterygium recurrence. *Ophthalmologica* 2008;222:391-6.
- 14) Ibáñez M, Eugarríos MF, Calderón DI. Topical cyclosporin A and mitomycin C injection as adjunctive therapy for prevention of primary pterygium recurrence. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2009;40:239-44.
- 15) Song YS, Lee JK, Kim JC. Circulating endothelial progenitor cell and vasculogenic factors in pterygium pathogenesis. *J Korean Ophthalmol Soc* 2006;47:1472-80.
- 16) In: Mauger TF, Craig EL eds. *Havener's Ocular Pharmacology*, 6th ed. St. Louis: Mosby, 1994; chap. 2.
- 17) Shin JH, Kim SJ, Lee JE, Lee JS. Effect of mitomycin C, dexamethasone, and cyclosporin A 0.05% on the proliferation of hu-

- man corneal keratocyte. J Korean Ophthalmol Soc 2011;52:1215-21.
- 18) Lee JS, Oum BS, Lee SH. Mitomycin C influence on inhibition of cellular proliferation and subsequent synthesis of type I collagen and laminin in primary and recurrent pterygia. Ophthalmic Res 2001;33:140-6.
- 19) 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.
- 20) Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, et al. Effects of cyclosporin A on human conjunctival fibroblasts. Arch Ophthalmol 2001;119:1512-7.
- 21) Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ. Interleukin-1 signal transduction. Life Sci 1996;59:61-83.
- 22) Power WJ, Mullaney P, Farrell M, Collum LM. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjögren's syndrome. Cornea 1993;12:507-11.
- 23) Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. Arch Ophthalmol 2000;118:1489-96.
- 24) Oh C, Apel AJ, Saville BA, et al. Local efficacy of cyclosporine in corneal transplant therapy. Curr Eye Res 1994;13:337-43.
- 25) Occleston NL, Alexander RA, Mazure A, et al. Effects of single exposures to antiproliferative agents on ocular fibroblast-mediated collagen contraction. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3681-90.

=ABSTRACT=

Effects of Cyclosporin on Pterygium Fibroblasts

Jong Soo Lee, MD, PhD¹, Seung Wook Lee, MD², Sang Jun Lee, MD¹, Na Mi Kim, MD¹

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

Department of Ophthalmology, Kosin University College of Medicine², Busan, Korea

Purpose: To evaluate the response and cellular damage of cultured human pterygial cells according to the concentration and exposure time of topical cyclosporin.

Methods: Human pterygial cells were exposed to a cyclosporin A concentrations of 0.1 µg/ml (0.0001%), 1 µg/ml (0.0001%), 10 µg/ml (0.001%), 100 µg/ml (0.01%), or 500 µg/ml (0.05%) for 5 or 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 damage. The extra-cellular matrix of PIP, laminin and MMP were evaluated, and the measurement of pro-inflammatory cytokine, TNF-α and IL-1b. IL-6, IL-8 was performed using ELISA kits.

Results: The pterygial cellular inhibitory effect of cyclosporin was similar to that of the control according to the concentration and exposure time ($p > 0.05$). Compared with the control, the level of LDH did not show a statistically significant difference between concentration and exposure time ($p > 0.05$). There was no significant difference of inhibitory effects by PIP, laminin, or MMP between the experimental and control groups ($p > 0.05$). The production of TNF-α and IL from the experimental pterygial cells due to the effect of cyclosporin was not significantly different from that of the control at a longer exposure time or stronger concentration ($p > 0.05$).

Conclusions: The response of pterygial cells to topical cyclosporin A at concentrations less than 0.05% for less than 10 minutes of exposure time showed no prevention of pterygial recurrence. With regard to cellular damage, little effects on inhibition of PIP, laminin, MMP, IL, and TNF-α were observed compared with that of the control.

J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(3):466-472

Key Words: Cyclosporin, IL, LDH, MMP, Pterygium

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

Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital

#179 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 602-739, Korea

Tel: 82-51-240-7323, Fax: 82-51-242-7341, E-mail: jongsool@pusan.ac.kr