

갑상선안병증 환자의 일차배양한 안와섬유모세포에 대한 알파-토코트리에놀의 항섬유화 효과

김숙진 · 강행구 · 강성모

인하대학교 의과대학 안과학교실

목적: 갑상선 안병증 환자의 일차배양한 안와 섬유모세포에 대한 알파-토코트리에놀(α -tocotrienol)의 세포증식 억제 및 항섬유화 효과를 확인하고자 한다.

대상과 방법: 갑상선 안병증 환자 5안과 정상 환자 5안의 안와 지방조직을 채취하여 배양한 안와 섬유모세포를 각각 대조군, 알파-토코트리에놀군, 알파-토코페롤(α -tocopherol)군으로 분류하여 MTT assay로 세포 독성, Click-iT™ Assay로 세포 증식을 측정하였다. 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포를 대조군과 알파-토코트리에놀 처리군에서 hydroxyproline assay로 콜라겐 생성을 비교하였다.

결과: 알파-토코트리에놀과 알파-토코페롤은 갑상선 안병증 및 정상환자의 세포에서 150 μ m에 이를 때까지 세포 독성을 나타내지 않았고, 80 μ m과 120 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 세포 증식을 억제하였다. 갑상선 안병증 환자의 세포에서 120 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 콜라겐 생성을 억제하였다.

결론: 세포 독성을 일으키지 않는 농도의 알파-토코트리에놀은 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포에서 세포 증식 억제 및 항섬유화 효과를 나타내었다.

〈대한안과학회지 2012;53(2):323-332〉

갑상선 안병증은 자가면역에 의한 다양한 염증세포가 외안근과 안와조직에 침윤되거나 히알루론산이 안와지방 조직 내와 외안근 근섬유 사이에 축적되어 다양한 임상양상을 보이는 질환이다.¹⁻³ 경미한 증상만 보이는 경우도 있으나 일부에서는 심한 결막 부종, 눈꺼풀 후퇴, 외안근 비대와 그로 인한 복시, 사시, 안구 돌출이 발생할 수 있으며, 압박 시신경병증으로 인한 시력 저하를 초래할 수도 있다. 갑상선 안병증의 증상 및 징후는 제한된 안와 공간 내에서 외안근, 안와 지방조직이 비대되면서 안구 조직이 압박을 받아 발생한다.

갑상선 안병증의 원인으로 유전적 요인, 면역학적 요인, 호르몬, 스트레스, 흡연, 감염 등 많은 원인 인자들이 연구되어 왔다.⁴⁻⁸ 하지만 이러한 연구에도 불구하고 갑상선 안병증의 정확한 병태생리는 아직 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 하지만 일반적으로 갑상선 안병증은 안와 내 자가면

역질환의 일종으로 여겨지고 있으며 안와 내 다양한 세포에 존재하는 TSH (thyroid stimulating hormone) 수용체 (TSH-R)와 여기에 작용하는 TSH 수용체 자극항체(TSH-receptor stimulating antibody)가 중추적인 역할을 하고 있다고 알려져 있다.⁹ 활동성 갑상선 안병증의 경우 T 세포, 대식세포, 비만세포, B 세포, 형질세포 등의 염증 세포가 외안근과 안와조직에 침윤되어 있는 것이 특징인데, 이러한 염증 세포는 사이토카인 및 성장인자(growth factor)를 분비하며 그 영향으로 안와 섬유모세포에서 히알루론산(hyaluronic acid) 등 세포 외 기질이 다량으로 생성되어 외안근과 안와 조직의 부종을 유발한다.¹⁰⁻¹²

인체 내의 결체조직에 광범위하게 분포되어 있는 섬유모세포는, 이전에는 비활동성이며 세포외 기질을 분비하는 구조적 기능만을 가지는 세포로 생각되었다. 그러나 여러 연구들로부터 섬유모세포는 여러 가지 분자 수준의 신호에 반응하고 또한 이를 생성하여 염증과 연관한 골수 기원 세포들의 기능을 조절할 수 있는 능력이 있는 세포임이 보고되어,¹³⁻¹⁷ 현재는 질병의 병태생리학적 기전에서의 그 중심 역할에 대한 관심이 증가되고 있다. 안와 섬유모세포는 다른 부위와 마찬가지로 안와 내 결체조직에 풍부하게 분포되어 있으며 구조적 역할을 담당하는 세포로 알려져 있다. 그러나 여러 보고들에 의하면 안와 섬유모세포는 다른 부위의 섬유모세포와는 다른 특성을 보여, 염증전 신호에 대

■ 접수 일: 2011년 8월 22일 ■ 심사통과일: 2011년 9월 19일
■ 게재허가일: 2012년 1월 19일

■ 책임저자: 강 성 모

인천시 중구 인항로 27
인하대학교병원 안과
Tel: 032-890-2408, Fax: 032-890-2417
E-mail: ksm0724@inha.ac.kr

* 본 논문은 인하대학교의 지원을 받아 연구되었음(40282).

해서 과도한 반응을 나타내고, 지방세포로 분화할 수 있는 특성이 있다.¹⁸ 이러한 안와 섬유모세포가 갑상선 안병증의 병리에서 중심적 역할을 하는 것으로 알려졌다.^{13,16,19,20}

안와 섬유모세포의 증식 억제 및 섬유화 억제는 갑상선 안병증에서의 새로운 치료 방안의 모색 중의 하나로 이 증식 억제 및 섬유화 억제 등에 관해 Imatinib Mesylate, AMN107, Quercetin 등 여러 약물의 *in vitro* 연구가 이루어지고 있다.^{13,21-22}

비타민 E는 항산화 효과 외에도, 신경보호, 항혈전, 항염증, 지질저하, 항동맥경화, 항종양성의 효과를 가지고 있다고 알려져 있다.²³⁻⁴⁴ 이러한 기전은 여러 가지 세포내 신호전달 경로를 통해 이루어진다고 생각되고 있다.³²⁻³⁴ 비타민 E의 다양한 종류 중, 알파-토코페롤(α -tocopherol), 알파-토코페릴 아세테이트(α -tocopheryl acetate) 그리고 알파-토코페릴 썬시네이트(α -tocopheryl succinate), 알파-토코트리에놀(α -tocotrienol)에는 세포 증식 억제 효과와 항섬유화 효과가 있다고 알려져 있다. 안과 영역에서는 이러한 비타민 E가 세포 실험과 동물 실험에서 녹내장 여과 수술이나 증식유리체망막병증의 치료에 관해 많은 연구가 있어 테논낭 섬유아세포나 망막색소상피세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다.³⁵⁻⁴⁴ 그러므로 이러한 비타민 E의 세포 증식 억제 및 항섬유화 효과를 예상하여 볼 수 있으나, 안와 섬유모세포에서는 연구된 바가 없다. 이에 저자들은 이 중, 최근에 연구되어 다른 안과 영역에서 세포 증식 억제 효과와 항섬유화 효과가 있다고 알려진 알파-토코페롤 및 알파-토코트리에놀이 갑상선 안병증 환자에서 일차배양한 안와 섬유모세포의 증식 및 항섬유화 효과를 확인하고자 하였다.

대상과 방법

환자 및 정상안의 지방 조직 채취

2010년 3월부터 5월까지 인하대학교병원 안과 및 신촌세브란스병원 안과에서 안와 감압술을 시행한 갑상선 안병증 환자 5명(5안)을 대상으로 환자 동의를 얻은 후 지방 조직을 채취하고, 2010년 2월부터 4월까지 인하대학교병원 안과에서 눈꺼풀 수술을 시행한 갑상선 안병증을 가지고 있지 않은 정상 환자 5명(5안)의 눈꺼풀 아래 지방 조직을 채취하였다.

안와 섬유모세포의 배양

채취된 지방조직을 잘게 절단 후 37°C에서 Type II collagenase (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에 60분간 처리

하여 전구지방세포(pre-adipocyte)를 얻었다. 이것을 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma Aldrich)으로 2-3회 세척 후 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 배양액은 10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich)과 penicillin (10,000 U/ml), streptomycin (10 mg/ml)을 포함한 항생제를 함유한 media 199 (Sigma Aldrich)를 이용하였다. 섬유모세포가 배양 접시 표면을 덮으면 trypsin (0.25%)/EDTA (0.1%) (Sigma Aldrich)로 처리한 후 계대 배양을 하였다. 실험에는 3-6번째 계대 배양한 세포들이 사용되었으며, 배양액은 3일마다 새로 교환하였다.

알파-토코트리에놀, 알파-토코페롤 처리

계대 배양한 4~5×10⁵의 섬유모세포를 25T flask (Bio-Tek, MA, USA)에서 10% FBS, 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10 mg/ml)이 함유된 media 199에 심은 후 (seeding) 하루 뒤 다시 1% FBS, 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10 mg/ml)이 함유된 media 199에 하루 기아상태에서 배양(starvation) 후 다음과 같이 처리하였다. 알파-토코트리에놀과 알파-토코페롤은 무수에탄올로 처리한 후 빛 차단 상태에서 4°C에서 보관하였다.

(1) 1군(대조군, 아무것도 처리하지 않은 군, 10안): 갑상선 안병증 환자 5안과 정상 환자 5안의 안와 섬유모세포를 1% FBS만 넣은 media 199에 24시간 처리하였다.

(2) 2군(알파-토코트리에놀 처리군, 10안): 갑상선 안병증 환자 5안과 정상 환자 5안의 안와 섬유모세포를 알파-토코트리에놀(α -tocotrienol, RRR- α -tocotrienol, Kuala Lumpur, Malaysia)과 1% FBS가 들어있는 media 199에 24시간 처리하였다(Fig. 1).

(3) 3군(알파-토코페롤 처리군, 10안): 갑상선 안병증 환자 5안과 정상 환자 5안의 안와 섬유모세포를 알파-토코페롤(α -tocopherol, RRR- α -tocopherol, Duesseldorf, Germany)과 1% FBS가 들어있는 media 199에 24시간 처리하였다.

세포 독성의 측정

갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와 섬유모세포에서 대조군, 20,40,60,80,100,120,150 μ m의 알파-토코트리에놀, 20,40,60,80,100,120,150 μ m의 알파-토코페롤 처리 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) Assay를 이용하여 안와 섬유모세포의 세포 독성을 비교하였다. 24

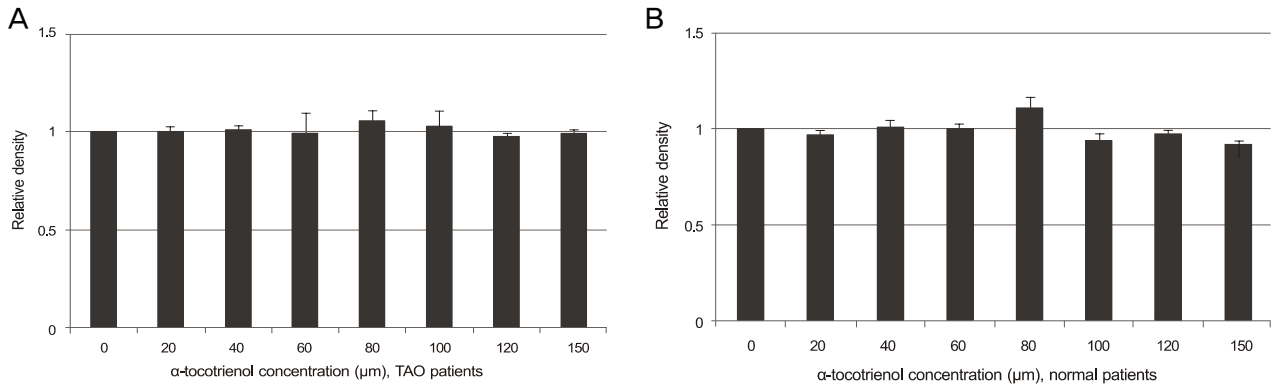


Figure 1. Effect of α -tocotrienol on the viability of orbital fibroblast from TAO (Thyroid associated ophthalmopathy) patients and normal patients. (A) The viability of orbital fibroblasts from TAO patients was not affected by 48 hour incubation with α -tocotrienol concentrations of up to 150 μ m. (B) The viability of orbital fibroblasts from normal patients was not affected by 48 hour incubation with α -tocotrienol concentrations of up to 150 μ m. The cell viability was determined using MTT assay. Results are expressed as mean \pm SD in relative OD units (compared with controls). The experiment was performed 3 times independently.

well microplate (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)에 안와 섬유모세포를 1×10^5 로 희석시켰다. 그리고 48시간 배양 후에 phosphate buffered saline (PBS)를 10 ml를 넣고 2일간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 well에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액(5 mg/ml PBS, Sigma, St Louis, USA) 50 ml를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에서 media를 버린 다음 DMSO (Sigma, USA)를 200 ml씩 넣고 10분 동안 흔들어서 생성된 MTT formazan 결정을 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성의 정도는 대조군과 처리군의 흡광도의 차이로 상대적 비율로 나타내었다.

세포 증식의 측정

갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와 섬유모세포에서 대조군, 40, 80, 120 μ m의 알파-토코트리에놀, 40, 80, 120 μ m의 알파-토코페롤 처리 후, 2일 증식 이후, Click-iT™ Assay (Invitrogen, Carlsbad, California)를 이용하여 각 군에서 안와 섬유모세포의 증식을 비교하였다. Click-iT™ EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay는 티미딘 (thymidine) 유사체인 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)을 새로 합성된 DNA에 접합시킨 후 azide dye를 이용하여 이를 인식하여 세포의 증식을 측정하는 방법으로 배양된 세포에 EdU를 첨가 후 flow cytometry를 이용하여 분석한다. 10 μ m의 EdU를 첨가한 후 37°C에서 2일간 처리한 후 trypsin (0.25%)/EDTA (0.1%)를 사용하여 세포를 추출

하고 1% Bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich)/Phosphate buffered saline (PBS, Gibco BRL, NY, USA)를 이용하여 세척하였다. 이 중 100 ml를 채취하여 paraformaldehyde (fixative)를 첨가 후 15분간 실온에서 두고 다시 세척 후 Triton X-100 용액에 넣어 빛이 닿지 않게 실온에서 30분간 처리하였다. 이렇게 고정된 세포에 Click-iT™ reaction mixture (azide dye, CuSO₄, reaction buffer)를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 1% BSA in PBS로 세척하고 Facscalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 세포 증식 정도를 평가하였다. 각각의 군에 대해 300 particles/초의 속도로 30,000개의 세포를 측정하였다.

콜라겐(collagen) 생성의 측정

갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포에서 대조군, 40, 80, 120 μ m의 알파-토코트리에놀 처리 후, Hydroxyproline assay (Nanjing Jiancheng Biochemical Institute, Nanjing City, P.R. China)를 이용하여 총 콜라겐 생성을 측정하였다. Six well microplate (Falcon, Lincoln Park, NJ, U.S.A.)에 안와 섬유모세포를 1×10^6 cells/well로 희석시키고 48시간 배양하였다. 알파-토코트리에놀을 처리 후 48시간 배양한 후, hydroxyproline level을 측정하여 상대적 비율로 나타내었다.

결과 분석 및 통계 처리

실험 결과는 3회 이상의 독립된 실험 후 평균 \pm 표준편차의 형태로 표시하였다. 통계분석은 SPSS version 14.0

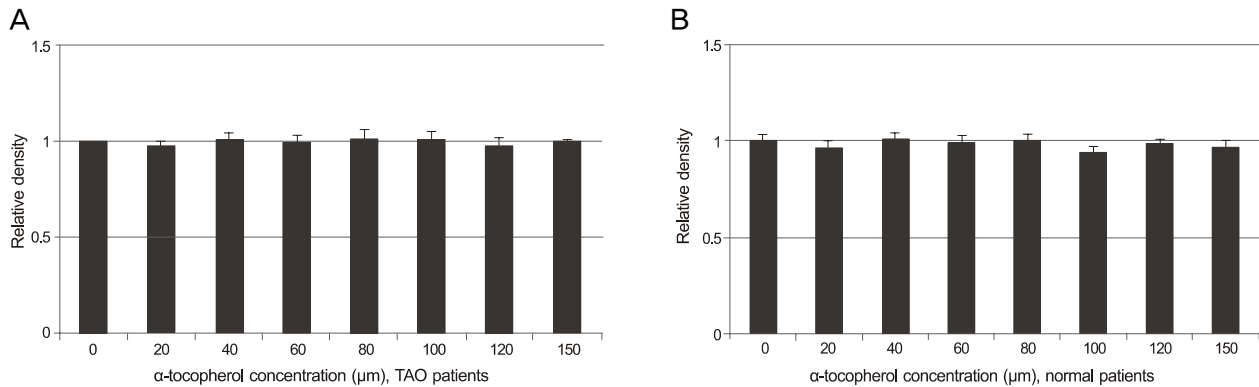


Figure 2. Effect of α -tocopherol on the viability of orbital fibroblast from TAO patients and normal patients. (A) The viability of orbital fibroblasts from TAO patients was not affected by 48 hour incubation with α -tocopherol concentrations of up to 150 μ m. (B) The viability of orbital fibroblasts from normal patients was not affected by 48 hour incubation with α -tocopherol concentrations of up to 150 μ m. The cell viability was determined using MTT assay. Results are expressed as mean \pm SD in relative OD units (compared with controls). The experiment was performed 3 times independently.

(SPSS, Inc., IL, USA)의 Mann-Whitney 검정을 이용하여 각 군별로 유의한 차이가 있는지 비교하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 안와 섬유모세포의 증식은 Facsclibur flow cytometer의 결과 그래프에서 전체 세포에 대한 EdU 처리 후 새로 증식된 세포(우측 M2, M3 영역)의 비율(%)을 대조군과 비교하였다.

결 과

세포 독성의 측정

MTT assay를 통하여 안와 섬유모세포의 세포 독성을 측정하였다. 알파-토코트리에놀을 처리하였을 시 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와 섬유모세포에서 48시간 배양하였을 때 150 μ m에 이를 때까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). 알파-토코페롤을 처리하였을 시 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와 섬유모세포에서 48시간 배양하였을 때 150 μ m에 이를 때까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2).

세포 증식의 측정

Click-iT™ Assay를 통하여 안와 섬유모세포의 증식을 측정하였다. M2 영역은 증식된 전체 세포를 나타내고, M3 영역은 증식된 세포 중 peak 부위를 반영한다. M2 영역 및 M3영역으로 비교하였을 때 40 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 대조군과 비교하였을 때 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와섬유모세포의 증식에 영향을 미치지 않았다. M2 영역으로 비교해보았을 때, 80 μ m과 120 μ m 농도의

알파-토코트리에놀은 대조군과 비교하였을 때 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와섬유모세포의 증식을 통계학적으로 유의하게 억제하였다($p < 0.05$). M3 영역 또한, 80 μ m과 120 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 대조군과 비교하였을 때 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와섬유모세포의 증식을 통계학적으로 유의하게 억제하였다($p < 0.05$) (Fig. 3, 4, 5).

M2 및 M3 영역에서 40 μ m, 80 μ m 그리고 120 μ m 농도의 알파-토코페롤은 갑상선 안병증 환자 및 정상 환자의 안와 섬유모세포의 증식에 영향을 주지 않았다(Fig. 6).

콜라겐 생성의 측정

Hydroxyproline assay를 이용하여 총 콜라겐 생성을 측정하였다. 40 μ m, 80 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포에서 대조군에 비교하여 $96.8 \pm 5.5\%$, $88.8 \pm 11.4\%$ 로 콜라겐 생성을 억제하였으나 통계학적으로 유의하지 못하였다($p=0.233$, $p=0.059$). 120 μ m 농도의 알파-토코트리에놀은 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포에서 대조군에 비교하여 $82.8 \pm 2.28\%$ 로 콜라겐 생성을 통계학적으로 유의하게 억제하였다($p=0.005$) (Fig. 7).

고 찰

갑상선 안병증은 그레이브스병 환자의 약 25-50%에서 발생하며 3-5%는 심한 침윤성 안병증의 형태로 심한 통증과 염증과 더불어 복시 및 시력 저하가 발생하게 된다.² 심한 갑상선 안병증은 치료가 매우 어렵고, 어떤 치료를 해도

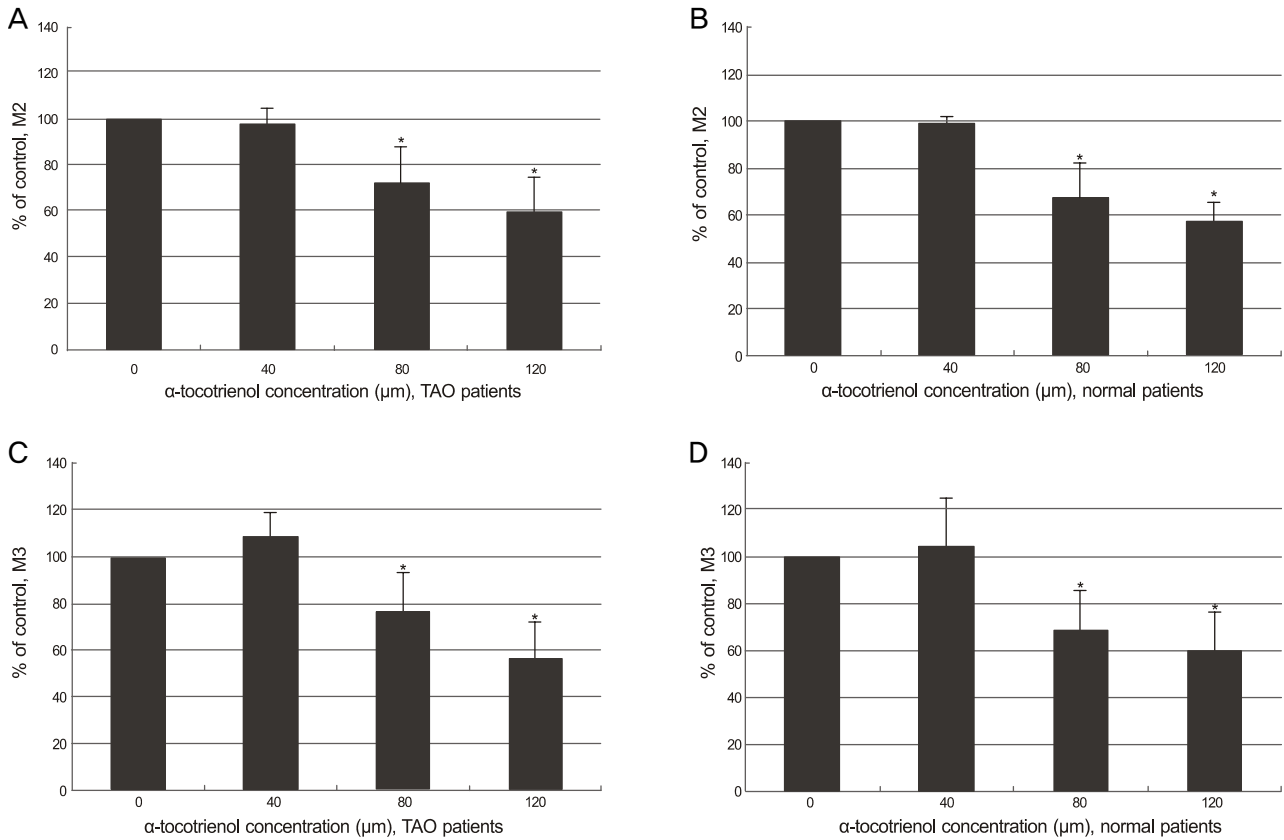


Figure 3. Effect of α -tocotrienol on the proliferation of orbital fibroblast from TAO patients and normal patients. M2 shows total newly proliferation cells and M3 shows peak of newly proliferated cells. (A) The total newly proliferation of orbital fibroblasts (M2) from TAO patients was inhibited with α -tocotrienol at 80 μ m and 120 μ m. (B) The total newly proliferation of orbital fibroblasts (M2) from normal patients was inhibited with α -tocotrienol at 80 μ m and 120 μ m. (C) The peak of newly proliferation of orbital fibroblasts (M3) from TAO patients was inhibited with α -tocotrienol at 80 μ m and 120 μ m. (D) The peak of newly proliferation of orbital fibroblasts (M3) from normal patients was inhibited with α -tocotrienol at 80 μ m and 120 μ m. The cell proliferation was determined using Click-iTTM assay. Results are expressed as mean \pm SD (compared with controls). The experiment was performed 3 times independently. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference within group (* p < 0.05).

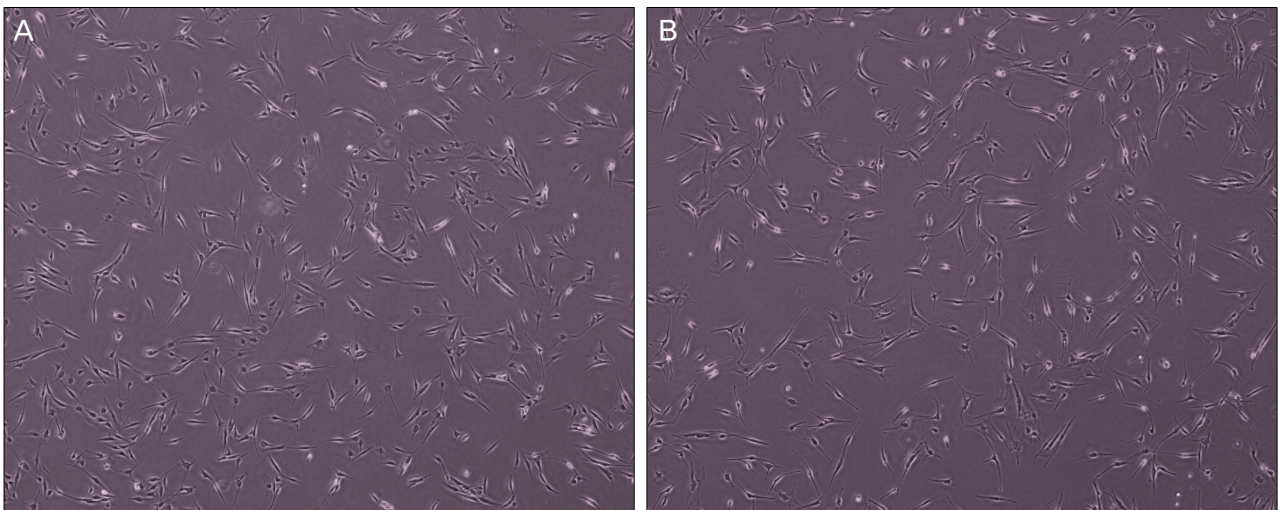


Figure 4. Effect of α -tocotrienol on the proliferation of orbital fibroblast from TAO patients. The proliferation of orbital fibroblasts from TAO patients was significantly inhibited with α -tocotrienol at 120 μ m. (A) Orbital fibroblasts from TAO patients (control). (B) Orbital fibroblasts 2 days after 120 μ m α -tocotrienol treatment from TAO patients.

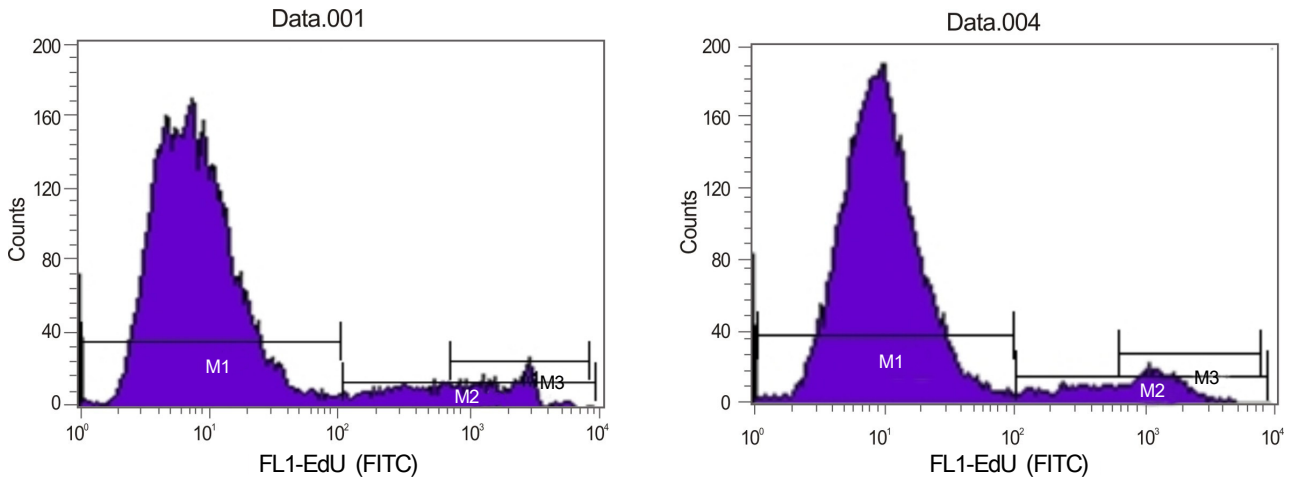


Figure 5. M2 shows total newly proliferation cells and M3 shows peak of newly proliferated cells. The total newly proliferation of orbital fibroblasts (M2) from TAO patients was inhibited with α -tocotrienol at 120 μ m. The peak of newly proliferation of orbital fibroblasts (M3) from TAO patients was inhibited with α -tocotrienol at 120 μ m. The cell proliferation was determined using Click-iTTM assay. (A) Result of Facscalibur flow cytometer in from TAO patients (control). (B) Result of Facscalibur flow cytometer 2 days after 120 μ m α -tocotrienol treatment from TAO patients.

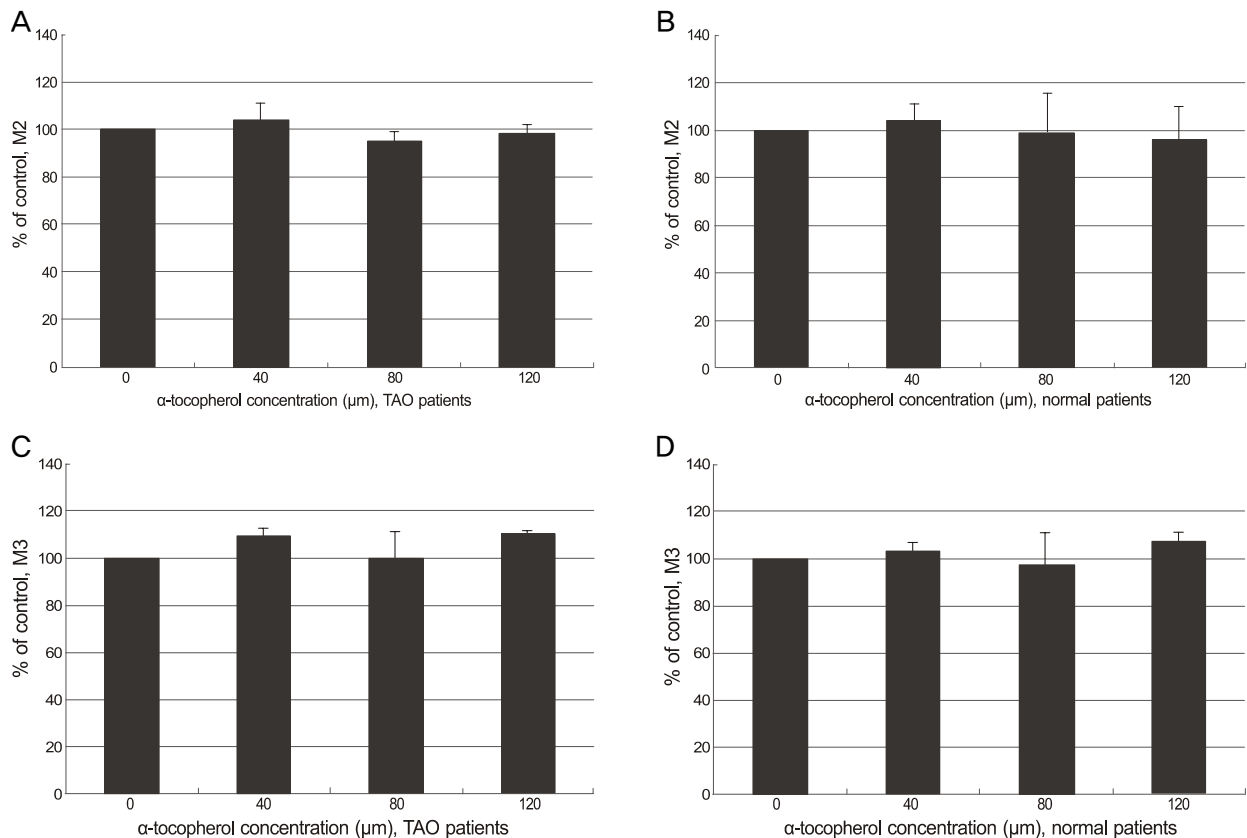


Figure 6. Effect of α -tocopherol on the proliferation of orbital fibroblast from TAO patients and normal patients. M2 shows total newly proliferation cells and M3 shows peak of newly proliferated cells. Various dose of α -tocopherol was not affected on the proliferation of orbital fibroblast from TAO patients and normal patients. The cell proliferation was determined using Click-iTTM assay. Results are expressed as mean \pm SD (compared with controls). The experiment was performed three times independently.

약 1/3은 치료가 만족스럽지 못하다. 진행 단계는 급성의 염증기와 만성기의 섬유화기로 진행되며, 염증기의 경우 비선

택적 면역억제제인 스테로이드가 현재 유일한 치료이나, 스테로이드 치료에 반응이 없는 경우도 있으며 전신투여로

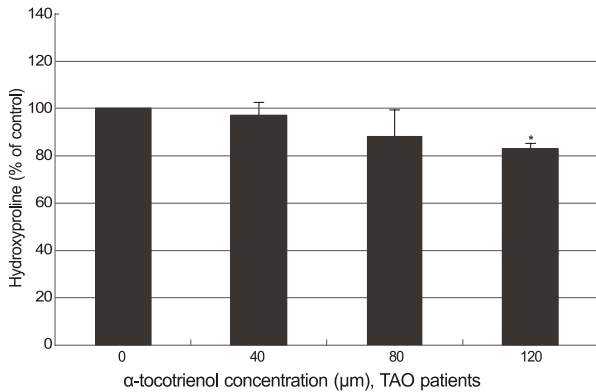


Figure 7. Effect of α -tocotrienol on the collagen production of orbital fibroblast from TAO patients. The total collagen production of orbital fibroblasts from TAO patients was inhibited with α -tocotrienol at 120 μ m. The hydroxyproline level was determined using hydroxyproline assay. Results are expressed as mean \pm SD (compared with controls). The experiment was performed 3 times independently. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference within group (* $p < 0.05$).

인해 체중증가, 위궤양, 혈압이나 당뇨의 악화, 얼굴모양의 변형, 쿠싱증후군, 골다공증, 감염의 위험 증가 등 부작용이 생길 수 있다. 이에 갑상선 안병증의 치료에 대해 눈주위 트리암시놀론 주사, 안와 압박술 등 국내외의 여러 치료에 관한 보고가 있었다.⁴⁵⁻⁴⁹

갑상선 안병증은 병리기전이 매우 복잡적이고 다양하기 때문에 대부분의 병리적 경로를 차단하면서 부작용이 적은 약물을 개발하는 것이 중요하다. 갑상샘자극호르몬 수용체 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)와 인슐린 유사 성장인자-1 수용체(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)에 대한 자가항체가 안와 섬유모세포 표면의 TSHR, IGF-1R에 작용하여 안와 섬유모세포를 활성화시킨다는 사실은 잘 알려져 있다.^{30,50,51} 또 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 등이 안와 섬유모세포에서 염증 반응에 필요한 사이토카인 분비를 자극하며^{52,53} 안와 섬유모세포 자체도 표면에 CD40을 발현하여 T 세포 표면의 CD154와의 반응을 통해 세포 간 상호 작용을 증진시키는 역할을 한다.^{13,16,19,20} 이처럼 갑상선 안병증에서의 안와 섬유모세포의 역할이 중요하기 때문에 안와 섬유모세포에 영향을 주는 여러 자극 요인들을 이해해야 보다 근본적인 치료법에 접근할 수 있다.

이에 본 연구에서는 알파-토코트리에놀의 안와 섬유모세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 티미딘 (thymidine) 유사체인 EdU를 새로 합성된 DNA에 접합시킨 후 azide dye를 이용하여 이를 인식하여 세포의 증식을 측정하는 새로운 방법인 Click-iT™ Assay를 이용하였다. 또한, 항섬유화 효과를 판단하기 위하여 hydroxyproline assay

를 통해 총 콜라겐 생성을 측정하였다.⁵⁴⁻⁵⁶ Hydroxyproline은 콜라겐 대사 시 안정화에 작용하며 콜라겐 대사의 지표로 사용된다. 이러한 콜라겐을 포함하는 세포 외 기질(extracellular matrix) 물질의 과도한 축적으로 인해, 조직의 과성장, 반흔으로 정의되는 섬유화는 갑상선 안병증의 주요한 병리기전 중의 하나이다. 그러므로, 안와 섬유모세포의 증식 억제와 섬유화 억제는 갑상선 안병증의 치료 기전의 주요한 부분중의 하나이다. 기존의 연구에서 Kim et al²²은 갑상선 안병증 환자에서 배양한 안와섬유모세포에서 pirfenidone을 처리하여 TIMP-1의 발현 억제 및 cytokine과의 영향을 연구하였으며, hydroxyproline assay를 통해 pirfenidone이 항섬유화 효과를 나타냄을 발표하였다. 또한 van Steensel et al⁵⁷은 tyrosine kinase inhibitors인 imatinib mesylate와 nilotinib (AMN 107)이 PDGF-BB 수용체에 관여하여 안와 섬유모세포의 증식을 억제하고 히알루론산 생성이 억제됨을 발표하였다. 이러한 tyrosine kinase inhibitors는 bleomycin이 관여한 폐섬유화증, 피부의 섬유화 등에서 항섬유화 효과를 나타냄이 알려져 있다.^{56,58,59}

본 연구에서 사용한 토코트리에놀과 토코페롤은 비타민 E의 일종으로, 두 종류의 화합물에 각각 알파, 베타, 감마, 델타($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) 네 가지 동족체가 있어 모두 8종류의 이성질체가 존재하고 있다. 토코트리에놀은 토코페롤과 같은 고리에 메틸 구조(methyl structure)를 가지고 있지만, 소수성 결사슬(hydrophobic side chain)에 세 이중 결합(double bonds)이 존재하고 있다. 토코트리에놀은 기존의 연구에서 다양한 생리활성 효과 면에서 토코페롤보다 40-60배 강한 것으로 알려져 있다.²⁵ 이에 알파-토코페롤과 알파-토코트리에놀 두 가지에 대해 연구를 결정하였다. 또한 Sylvester et al⁴⁴에 의하면 알파-토코트리에놀의 세포 증식 억제효과는 protein kinase C를 매개로 한다고 발표하였다. 또한 토코트리에놀이 토코페롤보다 일반적으로 EGF (epidermal growth factor) 및 protein kinase C에 의지하는 정상 mammary epithelial cell growth를 더 효과적으로 억제한다고 발표하였다. 안과 영역에서는 Meyenberg et al²⁴이 녹내장 여과 수술에서의 효용을 입증하기 위해 테논하 섬유아세포에서 세포실험을 실시하였는데, 세포 독성이 일어나지 않는 농도에서 알파-토코트리에놀이 세포증식을 억제하였다. Tappeiner et al²³은 토코트리에놀의 여러가지 형식인 알파-토코트리에놀, 감마-토코트리에놀, 델타-토코트리에놀에서 농도에 비례하여 테논하 섬유아세포의 증식이 억제되었음을 발표하였다. 또한 콜라겐 합성은 80 μ m 농도의 알파-토코트리에놀에서 62.4% 정도 억제됨을 확인하였다.

알파-토코트리에놀의 직접적인 세포증식억제 및 콜라겐

합성 억제 효과 외에 항산화 효과가 증식 억제에 관여하였을 가능성 또한 생각해 볼 수 있는데, Bartalena et al⁶⁰은 갑상선 안병증에서 활성산소(free radical) 등의 산화 스트레스가 안와 섬유모세포의 증식에 관여한다고 발표하였는데 그 근거가 있다. 그 외에도 산화스트레스와 안와섬유모세포 또는 안와 지방세포에서의 연관성에 대한 많은 연구가 있었다.^{61,62} 이에 널리 알려진 알파-토코페롤의 항산화 효과가 산화 스트레스를 줄여 안와 섬유모세포의 증식이 억제되었을 측면도 생각해 볼 수 있겠다.

스테로이드 치료는 급성기의 염증 완화에 많은 도움을 주나 만성기로 접어들수록 섬유화가 발생하게 되면 임상적 효과가 제한적이다. 그러므로 MTT assay를 통해 세포 독성이 관찰되지 않는 농도의 알파-토코트리에놀은 안와 섬유모세포에서 항섬유화를 일으켜 갑상선 안병증의 만성기에 효과를 가질 수 있을 것이다.

본 연구는 알파-토코트리에놀을 안와 섬유모세포에 적용한 최초의 연구이며 정상안 및 갑상선 안병증안에서 배양된 안와 섬유모세포의 세포 증식 억제 및 갑상선 안병증안에서 배양된 항섬유화 작용을 입증하였기 때문에 의미가 있다 하겠다. 그러나 콜라겐 생성량이 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유모세포에서 더 중요하다고 판단되어, 정상안에서의 콜라겐 생성량 및 알파-토코트리에놀의 항섬유화 효과에 대한 실험을 시행하지 않았는데, 추가 실험을 두 경우를 비교함으로써 더 의미 있는 결론을 얻을 수 있을 것이다. 추후 히알루론산(hyaluronan) 생성, 염증 관련 사이토카인과의 연관성, 자세한 기전 등에 대한 추가 연구가 필요할 것이라 생각되며 Dexamethasone 등 스테로이드 제제와의 비교 연구 또한 의미가 있을 것으로 생각된다. 또한 알파-토코트리에놀의 다른 비타민 E 형인 베타-토코트리에놀, 감마-토코트리에놀, 델타-토코트리에놀 등에 대해서도 추가 연구가 의미가 있을 것이라 생각된다. 본 연구를 통해 알파-토코트리에놀은 갑상선 안병증 환자에서 일차 배양한 안와 섬유모세포의 변화를 일으켜, 추후 항섬유화 약제로서 갑상선 안병증 환자의 새로운 치료 방안이 될 수 있으리라 생각한다.

참고 문헌

- 1) Garrity JA, Bahn RS. Pathogenesis of graves ophthalmopathy: implications for prediction, prevention, and treatment. *Am J Ophthalmol* 2006;142:147-53.
- 2) Bartley GB. The epidemiologic characteristics and clinical course of ophthalmopathy associated with autoimmune thyroid disease in Olmsted County, Minnesota. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994;92:477-588.
- 3) Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2010;362:726-38.
- 4) Bahn RS, Heufelder AE. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *J Engl J Med* 1993;329:1468-75.
- 5) Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid* 1998;8:727-34.
- 6) Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 1994;15:788-830.
- 7) Hägg E, Asplund K. Is endocrine ophthalmopathy related to smoking? *Br Med J* 1987;295:634-5.
- 8) Tomer Y, Davies TF. Infection, thyroid disease, and autoimmunity. *Endocr Rev* 1993;14:107-20.
- 9) Bahn RS, Dutton CM, Natt N, et al. Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:998-1002.
- 10) Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA, Cheavens M. Stimulation of glycosaminoglycan accumulation by interferon gamma in cultured human retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1169-71.
- 11) Smith TJ, Wang HS, Evans CH. Leukoregulin is a potent inducer of hyaluronan synthesis in cultured human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 1995;268:C382-8.
- 12) Smith TJ, Hoa N. Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-1 receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5076-80.
- 13) van Steensel L, Dik WA. The orbital fibroblast: a key player and target for therapy in graves' ophthalmopathy. *Orbit* 2010;29:202-6.
- 14) Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151:317-22.
- 15) Fries KM, Blieden T, Looney RJ, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:283-92.
- 16) Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol* 1998;274:C707-14.
- 17) Powers CJ, MeLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:165-97.
- 18) Smith TJ, Koumas L, Gagnon A, et al. Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:385-92.
- 19) Hwang CJ, Afifiyan N, Sand D, et al. Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2262-8.
- 20) Lehmann GM, Feldon SE, Smith TJ, Phipps RP. Immune mechanisms in thyroid eye disease. *Thyroid* 2008;18:959-65.
- 21) Lisi S, Botta R, Lemmi M, et al. Quercetin decreases proliferation of orbital fibroblasts and their release of hyaluronic acid. *J Endocrinol Invest* 2011;34:521-7.
- 22) Kim H, Choi YH, Park SJ, et al. Antifibrotic effect of Pirfenidone on orbital fibroblasts of patients with thyroid-associated ophthalmopathy by decreasing TIMP-1 and collagen levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3061-6.
- 23) Tappeiner C, Meyenberg A, Goldblum D, et al. Antifibrotic effects of tocotrienols on human Tenon's fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:65-71.

- 24) Meyenberg A, Goldblum D, Zingg JM, et al. Tocotrienol inhibits proliferation of human Tenon's fibroblasts in vitro: a comparative study with vitamin E forms and mitomycin C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:1263-71.
- 25) Mishima K, Tanaka T, Pu F, et al. Vitamin E isoforms alpha-tocotrienol and gamma-tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neurosci Lett* 2003;337:56-60.
- 26) Unchern S, Laoharuangpanya N, Phumala N, et al. The effects of vitamin E on platelet activity in beta-thalassemia patients. *Br J Haematol* 2003;123:738-44.
- 27) Jiang Q, Ames BN. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* 2003;17:816-22.
- 28) Qureshi AA, Sami SA, Salser WA, Khan FA. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. *Atherosclerosis* 2002;161:199-207.
- 29) Tomeo AC, Geller M, Watkins TR, et al. Antioxidant effects of tocotrienols in patients with hyperlipidemia and carotid stenosis. *Lipids* 1995;30:1179-83.
- 30) Malafa MP, Fokum FD, Mowlavi A, et al. Vitamin E inhibits melanoma growth in mice. *Surgery* 2002;131:85-91.
- 31) Nesaretnam K, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids* 1995;30:1139-43.
- 32) Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266:6188-94.
- 33) Kline K, Yu W, Sanders BG. Vitamin E: mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. *J Nutr* 2001;131:161-3.
- 34) Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli GM, et al. d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12190-4.
- 35) Haas AL, Boscoboinik D, Mojon DS, et al. Vitamin E inhibits proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Ophthalmic Res* 1996;28:171-5.
- 36) Haas AL, Boscoboinik DO, Bohnke M. Inhibition of Tenon fibroblast proliferation. Comparison between tocopherol and mitomycin-C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(Suppl):877S.
- 37) Larrosa JM, Veloso AA Jr, Leong FL, Refojo MF. Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR. *Curr Eye Res* 1997;16:1030-5.
- 38) Larrosa JM, Polo V, Ramirez T, et al. Alpha-tocopherol derivatives and wound healing in an experimental model of filtering surgery. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000;31:131-5.
- 39) Mojon D, Boscoboinik D, Haas A, et al. Vitamin E inhibits retinal pigment epithelium cell proliferation in vitro. *Ophthalmic Res* 1994;26:304-9.
- 40) Pinilla I, Larrosa JM, Polo V, Honrubia FM. Alpha-tocopherol derivatives in an experimental model of filtering surgery. *Ophthalmic Res* 1999;31:4400-5.
- 41) Pinilla I, Piazuelo E, Jiménez P, et al. Inhibitory effect of alpha-tocopherol succinate on fibroblast wound healing. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000;75:383-8.
- 42) Sakamoto T, Hinton DR, Kimura H, et al. Vitamin E succinate inhibits proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells in vitro: therapeutic implication for proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:186-92.
- 43) Sakamoto T, Oshima Y, Ishibashi T, Inomata H. Inhibitory effect of Vitamin E succinate on the proliferation of cultured bovine choroidal endothelial cells. *J Jpn Ophthalmol Soc* 1996;100:777-82.
- 44) Sylvester PW, McIntyre BS, Gapor A, Briski DP. Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation. *Cell Prolif* 2001;34:347-57.
- 45) Kim JE, Park JW, Cho JK, Yoon KC. Therapeutic effects of periorbital injection of triamcinolone acetonide in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2011;52:788-93.
- 46) Kim JH, Lee TS. A study of factors related to the course of Graves' ophthalmopathy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2011;52:255-60.
- 47) Jung BY, Kim YD. The results of periorbital injections of triamcinolone for thyroid orbitopathy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2007;48:1163-9.
- 48) Lee JH, Lee SY, Yoon JS. Risk factors associated with the severity of thyroid-associated orbitopathy in Korean patients. *Korean J Ophthalmol* 2010;24:267-73.
- 49) Chu YK, Kim SJ, Lee SY. Surgical treatment modalities of thyroid ophthalmopathy. *Korean J Ophthalmol* 2001;15:128-32.
- 50) Tsui S, Naik V, Hoa N, et al. Evidence for an association between thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor 1 receptors: a tale of two antigens implicated in Graves' disease. *J Immunol* 2008;181:4397-405.
- 51) Pritchard J, Han R, Horst N, et al. Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *J Immunol* 2003;170:6348-54.
- 52) Gianoukakis AG, Khadavi N, Smith TJ. Cytokines, Graves' disease, and thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 2008;18:953-8.
- 53) Smith TJ. Unique properties of orbital connective tissue underlie its involvement in Graves' disease. *Minerva Endocrinol* 2003;28:213-22.
- 54) Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
- 55) Pihlajaniemi T, Myllylä R, Kivirikko KI. Prol 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *J Hepatol* 1991;13 Suppl 3:S2-7.
- 56) Yao HW, Zhu JP, Zhao MH, Lu Y. Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration* 2006;73:236-42.
- 57) van Steensel L, Paridaens D, Schrijver B, et al. Imatinib mesylate and AMN107 inhibit PDGF-signaling in orbital fibroblasts: a potential treatment for graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3091-8.
- 58) Distler JH, Jüngel A, Huber LC, et al. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 2007;56:311-22.
- 59) Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, et al. Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J* 2008;22:2214-22.
- 60) Bartalena L, Tanda ML, Piantanida E, Lai A. Oxidative stress and Graves' ophthalmopathy: in vitro studies and therapeutic implications. *Biofactors* 2003;19:155-63.
- 61) Burch HB, Lahiri S, Bahn RS, Barnes S. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves'

ophthalmopathy. Exp Eye Res 1997;65:311-6.
62) Hondur A, Konuk O, Dincel AS, et al. Oxidative stress and anti-

oxidant activity in orbital fibroadipose tissue in Graves' ophthalmopathy. Curr Eye Res 2008;33:421-7.

=ABSTRACT=

The Antifibrotic Effects of α -Tocotrienols in Primary Cultured Orbital Fibroblasts from Thyroid-Associated Ophthalmopathy Patients

Suk Jin Kim, MD, Haeng Ku Kang, MD, Sung Mo Kang, MD

Department of Ophthalmology, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Purpose: To evaluate the antiproliferative and antifibrotic effects of α -tocotrienols in primary cultured orbital fibroblasts from thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) patients.

Methods: Orbital fibroblasts were cultured (5 eyes from TAO patients, 5 eyes from normal patients) and classified into a control group, α -tocotrienol group and α -tocopherol group. The cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The proliferation of orbital fibroblasts was measured using the Click-iT™ assay. The collagen production of the control and α -tocotrienol groups was measured using a hydroxyproline assay.

Results: The α -tocotrienol and α -tocopherol groups showed no cytotoxicity up to 150 μ m in orbital fibroblasts from TAO and normal patients. The proliferation of orbital fibroblasts from TAO and normal patients was significantly inhibited with α -tocotrienol at 80 μ m and 120 μ m. The collagen production of orbital fibroblasts from TAO patients was significantly inhibited with α -tocotrienol at 120 μ m.

Conclusions: The results from the present study indicate that non-toxic concentrations of α -tocotrienol have significant antiproliferative and antifibrotic effects on orbital fibroblasts from TAO patients.

J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(2):323-332

Key Words: α -tocopherol, α -tocotrienol, Fibrosis, Orbital fibroblast, Thyroid-associated ophthalmopathy

Address reprint requests to **Sung Mo Kang, MD**
Department of Ophthalmology, Inha University Hospital
#27 Inhang-ro, Jung-gu, Incheon 400-711, Korea
Tel: 82-32-890-2408, Fax: 82-32-890-2417, E-mail: ksm0724@inha.ac.kr