

말초혈액단핵구와 화학적으로 손상된 각막세포의 혼합반응에 대한 시스테아민의 효과

Effect of Cysteamine on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells-Chemically Injured Keratocytes Reaction

이영복¹ · 현준영^{2,3} · 위원량² · 정태영⁴ · 정의상⁵ · 이가영¹ · 신영주¹

Young Bok Lee, MD¹, Joon Young Hyon, MD, PhD^{2,3}, Won Ryang Wee, MD, PhD²,
Tae Young Chung, MD, PhD⁴, Eui Sang Chung, MD, PhD⁵, Ka Young Yi, MD, PhD¹, Young Joo Shin, MD, PhD¹

한림대학교 의과대학 한림대학교 강남성심병원 안과학교실¹, 서울대학교 의과대학 안과학교실²,
서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 안과학교실³, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 안과학교실⁴, 대전 이안과병원⁵

Department of Ophthalmology, Hallym University Kangnam Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Seoul National University College of Medicine², Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine³, Seongnam, Korea

Department of Ophthalmology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine⁴, Seoul, Korea

Rhee's Eye Hospital⁵, Daejeon, Korea

Purpose: To investigate the effect of cysteamine on mixed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)-chemically injured keratocytes reaction (mixed lymphocyte-keratocyte reaction; MLKR).

Methods: PBMC stimulation assay was performed after keratocytes were chemically injured with 0.05 N NaOH for 60 seconds. MLKR was treated with various concentrations of cysteamine (0-10 mM). Intracellular reactive oxygen species (ROS) formation was measured using the oxidation-sensitive fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Proliferation rate of PBMCs stimulated by NaOH-treated keratocytes and secretion profiles of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), transforming growth factor-beta1 (TGF-β1), interleukin-6 (IL-6), and macrophage migration inhibitory factor (MIF) were determined using the bromodeoxyuridine proliferation assay and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

Results: Proliferation rate of PBMCs was suppressed by cysteamine in a dose-dependent manner ($p = 0.019$). Fluorescence of DCF-DA decreased depending on cysteamine concentration ($p < 0.001$). MMP-9, IL-6 and TGF-β1 levels were suppressed by cysteamine in a dose-dependent manner ($p < 0.05$), whereas MIF levels increased with cysteamine concentration of 0.5-10 mM ($p = 0.008$).

Conclusions: These study results indicate that cysteamine induced the ROS-mediated inhibition of inflammatory cytokine release and proliferation of PBMCs stimulated by chemically injured keratocytes. Thus, cysteamine can be used in the treatment of chemical corneal burns.

J Korean Ophthalmol Soc 2015;56(10):1511-1519

Key Words: Cysteamine, Macrophage migration inhibitory factor, Mixed peripheral lymphocyte-keratocyte reaction, Reactive oxygen species, Transforming growth factor-beta1

■ Received: 2015. 2. 27. ■ Revised: 2015. 5. 30.

■ Accepted: 2015. 8. 14.

■ Address reprint requests to Young Joo Shin, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Hallym University Kangnam
Sacred Heart Hospital, #1 Singil-ro, Yeongdeungpo-gu, Seoul
07441, Korea
Tel: 82-2-829-5193, Fax: 82-2-848-4638
E-mail: schinn@hanmail.net

각막의 화학적 화상은 손상 정도가 각막의 재생피화를 방해하고 신생혈관과 각막혼탁을 일으킬 정도로 심한 경우에 실명을 유발할 수 있는 질환이다. 알칼리성 물질은 안구 조직을 깊숙이 침투하고 각막과 안구 내 조직을 손상시킨다.¹ 기본적인 재생 과정과 궤양형성 과정은 광범위하게 연

구되고 있으며,¹⁴ 양막이식을 포함하는 수술적 치료가 발전하고 있다.¹⁵ 그럼에도 불구하고, 알칼리 물질에 의한 손상을 최소화하는 새로운 치료 방법의 개발이 필요하며 다양한 물질들이 각막의 화학적 화상의 예후를 향상시키기 위해 연구되고 있다.^{6,7} 각막의 화학적 화상에 대한 치료제로 연구되는 물질은 lactoferrin, Na-hyaluronan 등이 있다.^{6,7} 이러한 물질은 화상 후 재생에 있어 염증매개물질의 발현을 억제함으로써 과도한 염증 반응을 조절하는 역할을 한다.^{6,7} 이처럼 각막 재생의 촉진뿐만 아니라 염증의 조절이 보다는 결과를 얻기 위해 반드시 선행되어야 할 점이라고 여러 연구에서 보고된 바가 있다.¹⁸ 최근에 산화스트레스가 각막의 화학적 화상에 있어 중요한 역할을 한다고 보고되었다.⁹ 활성산소물질은 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, O_2^-), 히드록시 라디칼($\bullet OH$), 과산화수소(H_2O_2)를 포함하며, 반응성이 강한 물질이다. 적정량의 활성산소물질은 세포의 항상성 유지에 있어 중요한 기능을 담당한다. 하지만 과도한 활성산소물질은 세포사, 노화, 질병의 발생에 관여한다.⁹ 활성산소물질은 화학적 손상 이후 발생하는 염증 단계보다 선행하며, 혈관표피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 인터류킨(interleukin, IL), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 등의 염증 매개물질의 생성을 유발한다.⁹ 이러한 반응은 외인성 항산화물질에 의해 회복될 수 있는데, Kubota et al⁹은 등장성의 수소용액이 활성산소물질의 감소를 통해 알칼리 화상으로 인한 각막의 신생혈관을 억제하였다고 보고하였다. 수소용액은 히드록시 라디칼($\bullet OH$)을 H_2O_2 로 전환시키는 역할을 한다.⁹ 쥐를 이용한 동물실험모델을 통해 밝혀진 기존의 연구는 알칼리 화상의 치료제로써 황산화물질의 사용 가능성을 제시하였다.⁹ 시스테아민은 시스틴증의 치료에 사용되며, cystine을 감소시키는 세포질의 구성물질이다.^{10,11} 이 물질은 방사선 노출에 의한 자가세포사를 감소시키고, 자유라디칼을 제거시키며, glutathione의 양을 증가시킴으로써 glutathione의 산화환원 반응을 회복시킨다고 알려져 있다.^{11,12} 따라서 시스테아민은 항산화물질로 작용하여 활성산소물질을 감소시키고, 과도한 면역반응을 억제하여 각막의 화학적 손상의 치료제로 사용될 수 있다.

각막세포는 각막기질을 구성하는 기본단위이다.¹³ 각막세포는 화학적 화상, 감염과 같은 각막 기질의 손상 후 회복과정에 있어 중요한 역할을 한다.¹³ 각막내피세포와 달리, 각막세포들은 각막의 감염과 손상 중에 변화하며 방어기능을 지닌 대식세포의 기능을 가지고 있다고 보고되었다.¹³ 형질전환성장인자-베타1 (transforming growth factor-beta1: TGF- β 1)과 같은 자극에 반응하여, 각막세포는 각막의 섬유화 반응과 반흔 형성에 있어 중심적인 역할을 하

는 근섬유아세포로 전환되어 분화한다.¹⁴ 이에 본 연구에서는 말초혈액단핵구와 화학적으로 손상된 각막세포의 혼합 반응에 대한 시스테아민의 효과와 이를 매개하는 활성산소물질의 역할을 알아보고자 한다.

대상과 방법

이 연구는 Helsinki 선언에 따라 수행되었고 한림대학교 의료원 임상시험연구윤리위원회가 검토하고 승인하였다 (2011-02-16). 각막은 모든 각막조직의 보관 및 배양을 허가 받은 Lion eye bank (USA)에서 구매하였다. 각막세포는 전층 각막이식술 후 폐기된 각공막고리에서 얻었다. 이 조직들은 배양될 때까지 OptisolTM-GS (Bausch and Lomb Inc., Rochester, NY, USA)에서 4°C에 보관되었다.

대상

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)/F12와 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640은 Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Ficoll-Hypaque, 시스테아민, mitomycin C, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), phytohemagglutinin (PHA)는 Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Bromodeoxyuridine (BrdU) proliferation assay는 Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 사람의 인터류킨-6 (interleukin-6), 대식세포이동저해인자(macrophage migration inhibitory factor, MIF), 형질전환성장인자-베타1 (transforming growth factor-beta1, TGF β 1), 기질분해효소-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)를 측정하기 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 사람의 각막세포는 전층각막이식술 후 폐기된 corneal-scleral rings에서 얻었다. 말초혈액은 건강한 자원자를 대상으로 전완부 정맥에서 50 mL 주사기로 얻은 후 바로 헤파린으로 처리된 용기에 넣어 섞었다.

사람 각막세포의 배양

테스메막과 상피는 겹자와 안과용 칼로 제거되었고 기질은 층판으로 분리하였다. 중간기질과 후부기질이 24-well plates에서 배양되었다.^{15,16} 각막기질은 4등분으로 나누었으며 하룻밤 동안 37°C의 DMEM에서 2.0 mg/mL 콜라겐 분해효소(Roche, Basel, Switzerland)로 분해하였다. 각각의 세포들은 DMEM으로 처리한 후 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA)이 첨가되어 있는 DMEM/F12에서 배양되었다.¹⁷ 이 세포들

은 4×10^4 cells/cm²로 배양되었다.

말초혈액단핵구의 분리

헤파린이 처리된 신선한 전혈(10 IU heparin/mL)이 phosphate buffered saline (PBS) 용액과 1:2 비율로 희석되었다. 말초혈액단핵구를 Ficoll-Hypaque 방법을 통하여 원심분리를 시행하여 얻었다. 그 다음, 세포들은 배양되기 전에 PBS로 세척되었다. 말초혈액단핵구는 1×10^6 cells/well의 밀도로 5% (vol/vol) fetal calf serum이 첨가된 RPMI 배지에서 37°C, 24시간 동안 배양되었다. 말초혈액단핵구의 생존 능력은 트리판블루염색배제로 3분 이내에 측정하였고 생존력은 지속적으로 98% 이상이었다. 이후 세포들은 RPMI-1640 (Invitrogen-Life Technologies, Grand Island, NY, USA)로 현탁하였다.

말초혈액단핵구와 손상된 각막세포의 혼합반응

말초혈액단핵구 자극검사는 기존에 기술된 방법으로 면역반응성을 알아보기 위해 시행하였다.^{18,19} 이 연구에서 0.05 N NaOH를 처리한 각막세포(5×10^5 /mL)가 자극제로 사용되었다. 간단하게 말하자면, 각막세포가 5% CO₂-배양기에서 각막세포의 증식을 막기 위하여 25 µg/mL mitomycin C로 처리한 후 30분 동안 배양되었다.²⁰ 잔류된 mitomycin C는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함유한 RPMI-1640으로 3회에 걸쳐 세척해 제거하였다. 각막세포는 0.05 N NaOH로 60초 동안 처리하였다. 잔류된 0.05 N NaOH는 10% FBS를 함유한 RPMI-1640으로 3회에 걸쳐 세척해 제거하였다. 반응세포(1×10^6 cells/well)와 자극세포는 96-well plates에서 200 µL의 RPMI-1640에서 함께 배양되었다. 각각의 plates는 0-10 mM 시스테아민을 이용하여 48시간 동안 배양하였고, 말초혈액단핵구 증식 정도는 상품화된 bromodeoxyuridine (BrdU) proliferation assay kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)로 측정되었다. 1×10^6 말초혈액단핵구/mL 농도의 세포현탁액 중 100 µL가 둥근 바닥 모양의 96-well plates 중 6 wells에 첨가되었다. 본 연구에서는 림프구의 반응을 보기 위하여 suspension cell을 이용하였기 때문에 round bottom 96 well을 사용하였다. 자극되지 않은 말초혈액단핵구는 음성 대조군으로 사용되었고, phytohemagglutinin (PHA, 5 µg/mL, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) 처리한 말초혈액단핵구는 양성 대조군으로 사용되었다. 두 실험 모두 4회에 걸쳐 실행되었다. 반응의 광학밀도는 450 nm 파장에서 ELISA 판독기로 측정되었다. 결과들은 평균과 표준편차로 표현하였다. 말초혈액단핵구세포의 증식 속도는 음성 대조군과 양성 대조군 배지 사이에 증가된 세포 수의 분율로 계산되었다.

세포 내 활성산소물질의 측정

세포 내 활성산소물질의 형성은 산화반응에 민감한 형광탐침자와 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich, D6665, St. Louis, MO, USA)로 측정되었다. 이는 활성산소물질을 매개로 DCF-DA가 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)으로 산화되는 것을 이용하였다. Mixed lymphocyte-keratocyte reaction (MLKR)은 0-10 mM 시스테아민과 함께 48시간 동안 배양된 후 10분 동안 1,400 rpm의 속도로 원심분리되었다. 원심분리 후 상층액은 제거하였고 가라앉은 세포현탁액은 PBS로 세척하였다. 세포현탁액은 10분 동안 1,400 rpm의 속도로 원심분리를 재시행하였다. 그 후에 DCF-DA (10 µM) 200 µL가 첨가되고 세포들은 37°C 암실에서 30분간 배양되었다. 이 세포들은 그 후 PBS로 세척하였다. 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성은 이전에 언급한 DCF-DA microplate assay 방법으로 측정되었다.²¹ 저자들은 ROS 생성을 측정하기 위해 495 nm의 여기파장, 530 nm의 방사파장을 이용하여 형광광도를 측정하는 spectrofluorometer (SFM 25, Kontron Instruments, Basel, Switzerland)를 사용하였다. 각각의 시스테아민의 농도에 다섯 개의 well이 사용되었다. DCF 형광의 상대적인 강도는 blank의 형광강도를 뺀 후에 PHA-자극군의 형광세기를 100%로 설정하여 상대적 강도로 계산하였다.

효소결합면역흡착검사(ELISA)

10분 동안 2,000 rpm으로 원심분리를 시행한 후 상층액을 얻었으며, 사이토카인의 농도를 측정하기 전까지 -70°C에서 냉동보관을 하였다. 말초혈액단핵구 배양배지의 인터류킨-6, 대식세포이동저해인자, 형질전환성장인자-베타1, 기질분해효소-9 농도는 제조사의 프로토콜에 따라 상품화된 인간 인터류킨-6, 대식세포이동저해인자, 형질전환성장인자-베타1, 기질분해효소-9 ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA kits의 검출 농도 한계는 ~15 pg/mL이다. 간단히 말하자면, anti-human 기질분해효소-9, 형질전환성장인자-베타1, 대식세포이동저해인자, 인터류킨-6 항체가 각각의 96-well microtiter plates에 추가되었고 실온에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음 날, 각각의 well은 세척완충액으로 세척하였다. 모든 well은 1% 소혈청알부민을 포함하는 blocking buffer (pH 7.4)로 채웠고, 실온에서 1시간 유지하였다. 적절한 다중클론 항체로 코팅된 96-wells microtiter plate에 사람기질분해효소-9, 형질전환성장인자-베타1, 대식세포이동저해인자, 인터류킨-6의 표준 희석액 100 µL를 추가하였다. 각각의 plate는 밀봉된 상태로 실온에서 2시간 동

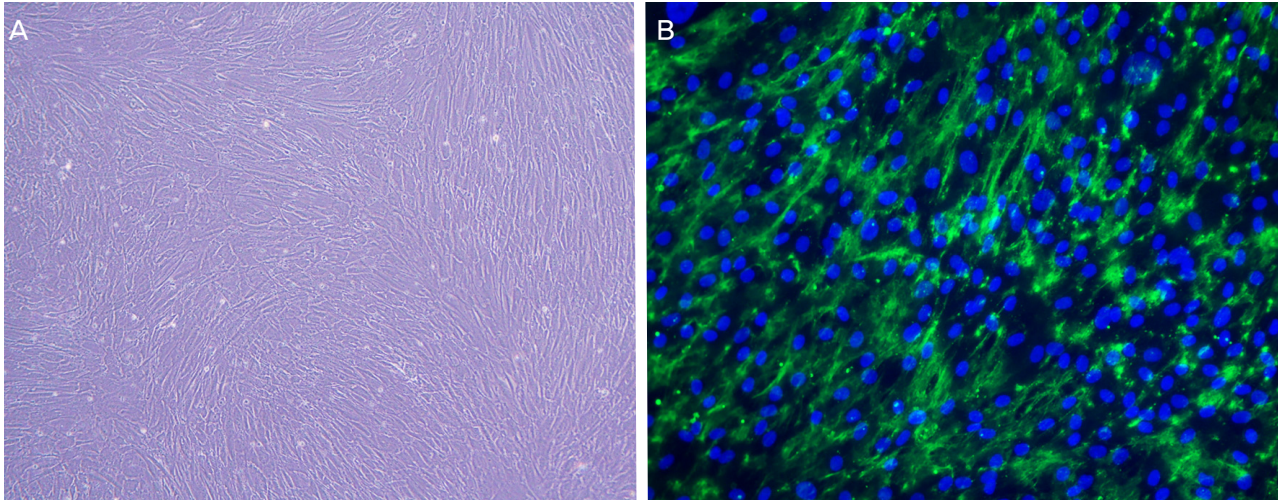


Figure 1. Inverted phase-contrast image and immunofluorescent vimentin staining of human keratocytes. (A) Keratocytes were observed growing parallel to the etched lines. Magnification, $\times 200$. (B) Immunofluorescence with anti-vimentin antibody, a general marker of keratocyte, revealed the morphology. The nuclei were stained using Hoechst 33342 (blue). Magnification, $\times 400$.

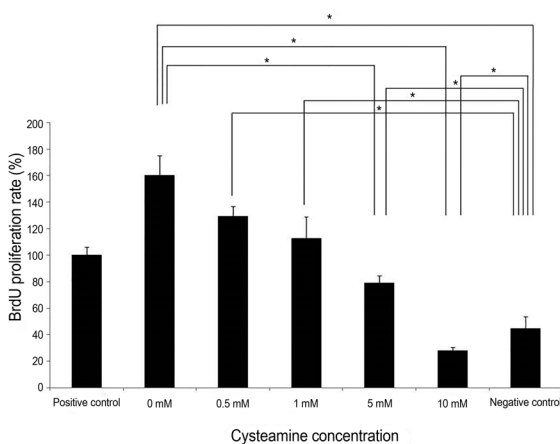


Figure 2. Peripheral blood monocular cell (PBMC) stimulation test. NaOH-treated human keratocytes served as the stimulators. Cysteamine suppressed the PBMC proliferation in a dose-dependent manner ($p = 0.019$, Kruskal-Wallis test). PBMC proliferation was suppressed with ≥ 5 mM of cysteamine ($p = 0.034$ and 0.021 , respectively, Mann-Whitney U -test). PBMC proliferation with 0.5 mM of cysteamine was higher than that of negative control ($p = 0.008$ for all, Mann-Whitney U -test), whereas it was lower than that of negative control in 10 mM of cysteamine ($p = 0.008$). BrdU = bromodeoxyuridine. *Statistically significant by Mann-Whitney U -test.

안 배양되었다. 배양 후, plates를 4회에 걸쳐 세척하였고, horseradish peroxidase에 결합한 goat anti-human 기질분해 효소-9, 형질전환성장인자-베타1, 대식세포이동저해인자, 인터류킨-6항체 $100 \mu\text{L}$ 가 각각의 well에 추가되었고, 이후에 실온에서 2시간 동안 배양되었다. 그리고 난 후 염색 시약(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine [TMB]) $100 \mu\text{L}$ 를

파란색으로 염색하기 위해 plates에 20분 동안 사용하였고 이후 $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ $50 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응을 멈추었다. 흡광도는 570 nm 파장을 reference로 하여 450 nm 에서 자동 흡광 측정기를 이용하여 측정하였다.

결 과

사람각막세포의 배양

배양된 각막세포는 새겨진 선에 평행하게 자라는 것이 관찰되었다(Fig. 1A). 각막세포의 표지자로 잘 알려진 anti-vimentin 항체의 면역형광검사는 세포의 형태를 나타내었다 (Fig. 1B). 세포의 핵은 Hoechst 33342로 염색되었다.

말초혈액단핵구 자극 검사

NaOH로 처리된 사람각막세포가 자극세포로 작용하였다. NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM 시스테인 농도에서 음성 대조군에 비해 말초혈액단핵구의 증식이 통계적으로 유의하게 증가하였다($p=0.008$, Mann-Whitney U -test). 시스테인이 용량-의존적으로 말초혈액단핵구의 증식을 억제하였다($p=0.019$, Kruskal-Wallis test; Fig. 2). 말초혈액단핵구 증식은 5 mM 이상의 시스테인에서 억제되었다($p=0.034$, and 0.021 , Mann-Whitney U -test). 시스테인 0.5 – 5 mM 농도에서 말초혈액단핵구 증식은 음성 대조군에 비해 유의하게 높았고($p=0.008$ for all, Mann-Whitney U -test), 10 mM 농도에서는 음성 대조군에 비해 유의하게 낮았다($p=0.008$).

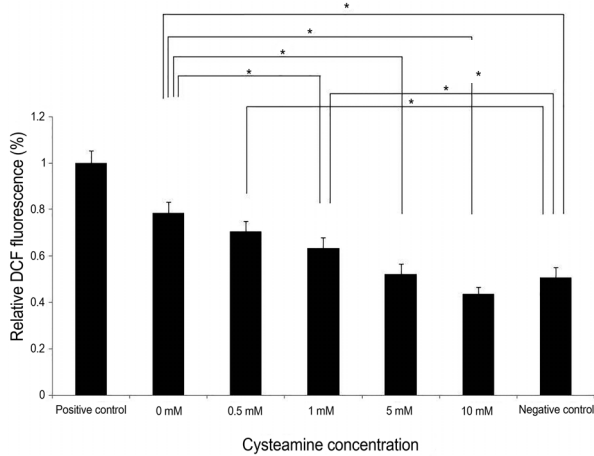


Figure 3. Relative 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence. Intracellular ROS levels measured by relative DCF fluorescence decreased by 0-10 mM cysteamine in a dose-dependent manner ($p < 0.001$; Kruskal-Wallis test). Cysteamine concentration of ≥ 1 mM significantly lowered the intracellular ROS levels ($p = 0.014$, 0.014 and 0.014 , respectively; Mann-Whitney U -test). Intracellular ROS levels with 0-1 mM of cysteamine was higher than that of negative control ($p = 0.016$, 0.008 , and 0.008 , respectively, Mann-Whitney U -test). However, there was no significant difference of intracellular ROS level between 5-10 mM of cysteamine and negative control. ROS = reactive oxygen species; DCF = 2',7'-dichlorofluorescein. *Statistically significant by Mann-Whitney U -test.

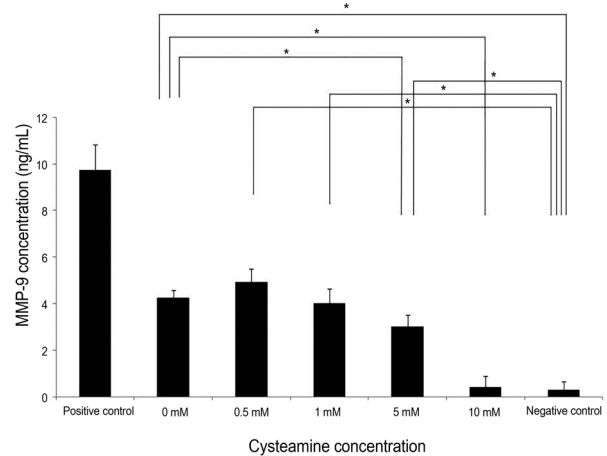


Figure 4. MMP-9 levels measured by ELISA. MMP-9 levels decreased in a dose-dependent manner by 0-10 mM cysteamine ($p = 0.001$; Kruskal-Wallis test). Cysteamine concentration of ≥ 5 mM significantly lowered the MMP-9 levels ($p = 0.016$, and 0.009 , respectively; Mann-Whitney U -test). MMP-9 levels with 0-5 mM of cysteamine was higher compared with negative control ($p = 0.016$, 0.016 , 0.008 , and 0.008 , respectively, Mann-Whitney U -test). However, there was no significant difference of intracellular ROS level between 10 mM of cysteamine and negative control. MMP-9 = matrix metalloproteinase-9; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; ROS = reactive oxygen species. *Statistically significant by Mann-Whitney U -test.

세포 내 활성산소물질

NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM 시스테인 농도에서 DCF 형광이 음성 대조군보다는 통계적으로 유의하게 크게 관찰되었다($p=0.016$, Mann-Whitney U -test). 시스테인은 용량-의존적으로 DCF 형광을 감소시켰다($p<0.001$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 3). 1 mM 이상의 시스테인이 통계적으로 유의하게 세포 내 ROS 양을 감소시켰다($p=0.014$, 0.014 , 0.014 , Mann-Whitney U -test). 시스테인 0.5-1 mM 농도에서 DCF 형광은 음성 대조군에 비해 유의하게 높았고($p=0.008$ for both, Mann-Whitney U -test), 5 mM 농도에서는 음성 대조군과 차이를 보이지 않았다. 시스테인 10 mM 농도에서 DCF 형광은 음성 대조군보다 낮았지만, 유의한 차이는 아니었다($p=0.056$).

활성화된 말초혈액단핵구의 염증성 사이토카인 분비

NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM 시스테인 농도에서 기질분해효소-9는 음성 대조군보다는 통계적으로 유의하게 증가하였다($p=0.016$, Mann-Whitney U -test). 1 mM 이상의 시스테인을 첨가하였을 때, 증가된 기질분해효소-9의 수치는 감소되었다($p=0.001$, Kruskal-Wallis test; Fig. 4). 특히, 5 mM 이상에

서 용량-의존적으로 시스테인이 기질분해효소-9 수치를 통계적으로 유의하게 감소시켰다($p=0.016$, 0.009 , Mann-Whitney U -test). 시스테인 0.5-5 mM 농도에서 기질분해효소-9는 음성 대조군에 비해 유의하게 높았고($p=0.016$, 0.008 , and 0.008 , respectively, Mann-Whitney U -test), 시스테인 10 mM 농도에서는 음성 대조군과 차이를 보이지 않았다. NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM 시스테인 농도에서 인터류킨-6는 음성 대조군보다는 통계적으로 유의하게 증가하였다($p=0.016$, Mann-Whitney U -test). 다양한 농도의 시스테인을 첨가하였을 때, 용량-의존적으로 증가된 인터류킨-6 수치가 감소되었다($p=0.003$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 5). 특히 1, 5, 10 mM에서 용량-의존적으로 인터류킨-6 수치를 통계적으로 유의하게 감소시켰다($p=0.043$, 0.021 , 0.021 , Mann-Whitney U -test). 시스테인 0.5 mM 농도에서 인터류킨-6는 음성 대조군에 비해 유의하게 높았지만($p=0.032$, Mann-Whitney U -test), 1 mM 농도에서는 유의미한 차이를 보이지는 않았다. 하지만 시스테인 5, 10 mM 농도에서 인터류킨-6는 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 작았다($p=0.032$, and 0.016 , Mann-Whitney U -test). NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM

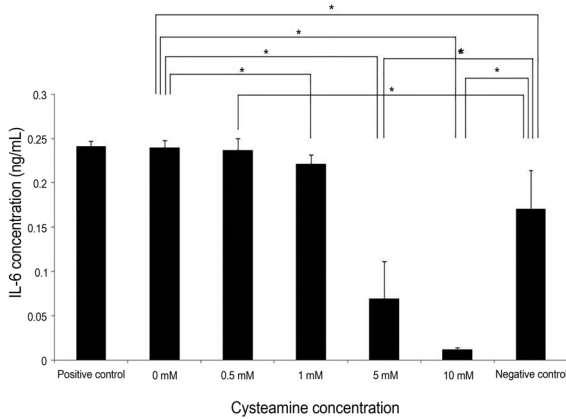


Figure 5. IL-6 levels measured by ELISA. Cysteamine decreased IL-6 levels in a dose-dependent manner ($p = 0.003$; Kruskal-Wallis test). Cysteamine concentration of ≥ 1 mM significantly lowered the IL-6 levels ($p = 0.043, 0.021$, and 0.021 , respectively; Mann-Whitney *U*-test). IL-6 levels with 0-0.5 mM of cysteamine was higher than that of negative control ($p = 0.016$, and 0.032 , respectively, Mann-Whitney *U*-test), whereas IL-6 levels with cysteamine concentration of ≥ 5 mM were lower than that of negative control ($p = 0.032$, and 0.016 , respectively; Mann-Whitney *U*-test). IL-6 = interleukin-6; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. *Statistically significant by Mann-Whitney *U*-test.

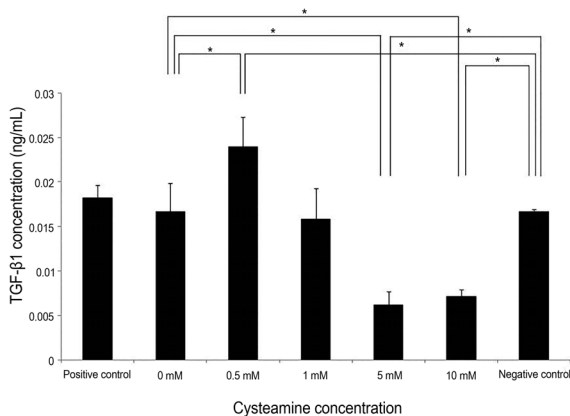


Figure 6. TGF-β1 levels measured by ELISA. TGF-β1 level was slightly elevated in a low (0.05 mM) cysteamine concentration ($p = 0.016$; Mann-Whitney *U*-test). However, it decreased at high concentrations (5 mM and 10 mM) ($p = 0.009$ and 0.009 ; Mann-Whitney *U*-test). TGF-β1 levels with 0.5 mM of cysteamine was higher than that of negative control ($p = 0.016$, Mann-Whitney *U*-test), whereas TGF-β1 levels with cysteamine concentration of ≥ 5 mM were lower than that of negative control ($p = 0.016$ for both). TGF-β1 = transforming growth factor-beta 1; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. *Statistically significant by Mann-Whitney *U*-test.

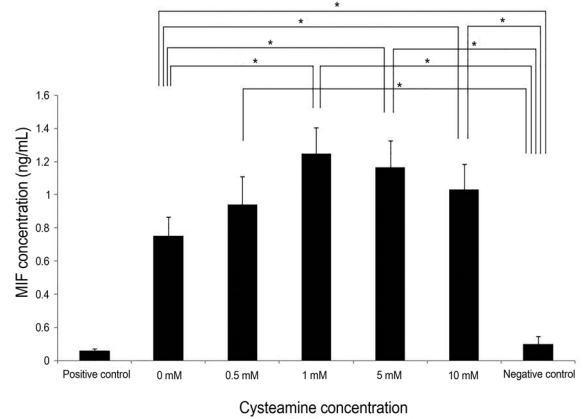


Figure 7. MIF levels measured by ELISA. Cysteamine increased MIF levels at high concentrations (≥ 1 mM) ($p = 0.014, 0.014$, and 0.027 , respectively; Mann-Whitney *U*-test). MIF levels with 0-10 mM of cysteamine was higher than that of negative control ($p = 0.016, 0.008, 0.008$, and 0.008 , respectively). MIF = macrophage migration inhibitory factor; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. *Statistically significant by Mann-Whitney *U*-test.

시스테인 농도에서 음성대조군 사이에 형질전환성장인자-베타1은 유의한 차이를 보이지 않았다. 시스테인이 용량-의존적으로 형질전환성장인자-베타1 수치를 감소시켰다($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 6). 시스테인은 5, 10 mM에서 형질전환성장인자-베타1 농도를 감소시켰다($p = 0.009, 0.009$, Mann-Whitney *U*-test) (Fig. 6). 하지만 0.5 mM의 시스테인이 첨가된 군에서 형질전환성장인자-베타1 농도는 상승하였다($p = 0.016$, Mann-Whitney *U*-test). 시스테인 0.5 mM 농도에서 형질전환성장인자-베타1은 음성 대조군에 비해 유의하게 높았지만($p = 0.016$, Mann-Whitney *U*-test), 1 mM 농도에서는 유의미한 차이를 보이지는 않았다. 하지만 시스테인 5, 10 mM 농도에서 형질전환성장인자-베타1은 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 작았다($p = 0.016$ for both, Mann-Whitney *U*-test). NaOH로 처리한 사람각막세포와 말초혈액단핵구 혼합군은 0 mM 시스테인 농도에서 대식세포이동저해인자는 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다($p = 0.016$, Mann-Whitney *U*-test). 앞서 기술된 염증매개물질과는 달리, 다양한 농도의 시스테인은 대식세포이동저해인자의 수치를 증가시켰는데($p = 0.008$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 7), 특히 1 mM 이상의 시스테인은 대식세포이동저해인자의 수치를 통계적으로 유의하게 증가시켰다($p = 0.014, 0.014$, and 0.027 , Mann-Whitney *U*-test). 또한 모든 농도의 시스테인에서 대식세포이동저해인자는 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 컸다($p = 0.008$ for all).

고 찰

알칼리 화학화상은 각막조직의 심각한 손상을 일으키고 현저한 염증세포의 침윤, 반흔조직의 과형성, 재발성 각막미란, 궤양, 간질부종, 신생혈관형성을 야기한다.²² 염증의 조절은 화학적 각막화상의 합병증을 억제함에 있어 중요하다.²²⁻²⁴ 본 연구에서 혈액에서 분리된 말초혈액단핵구는 화학적으로 손상된 각막세포로부터 자극을 받았다. 각막세포는 각막기질의 가장 기본세포이고 각막의 재생, 유지를 담당한다.^{17,25} 알칼리성 물질은 세포막의 용해와 세포 괴사를 유발하여 염증을 일으킨다. 게다가 각막세포는 정상 환경에서 상대적으로 비활성이고, 정적임에 반해 화학적 각막손상에서 탐식작용과 콜라겐, 염증매개물, 사이토카인의 분비 등의 기능이 활성화된다.^{1,26} 각막손상 상태에서 각막세포가 이동하고 단핵구가 섬유모세포로 전환된다는 보고가 있다.^{1,27} 즉 손상된 각막세포는 화학적 각막화상 연구에서 염증을 유발하는 핵심세포를 의미한다.

시스테인은 용량-의존적으로 세포 내 활성산소물질 형성의 감소를 통해서(Fig. 3) 화학적으로 손상된 각막세포의 자극을 받은 말초혈액단핵구의 증식을 억제하였다(Fig. 2). 활성산소물질은 고농도에서는 그 자체만으로 세포손상을 유발하여 세포사를 일으키지만 저농도에서는 조직손상, 감염 등에 대한 면역 및 염증 반응의 중요한 2차 신호물질로 알려져 있으며 상처의 회복에도 관여한다.²⁸ 따라서 활성산소물질의 조절을 통해 염증 반응과 상처의 회복을 적절하게 유지할 수 있다. 세포 내의 산화스트레스에 민감한 전사인자로, 대표적으로 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)가 있다. Nrf2는 산화물질에 대한 방어작용을 매개하는 중요한 전사인자로, NAD(P)H와 glutathione의 생성을 통해 활성산소물질을 제거한다.²⁹ 또한 산화 스트레스는 중요한 신호전달 경로들과 histone modifications를 조절하는 것으로 알려져 있다.²³ 시스테아민은 항산화제일 뿐 아니라¹⁰ 활성산소(reactive oxygen species)를 제거시키고, glutathione을 증가시키는 역할을 한다고 보고되었다.^{11,30} 따라서 시스테아민은 활성산소물질 억제를 통해서 말초혈액단핵구 증식을 감소시킬 것이다. 또 시스테아민은 용량-의존적으로 인터류킨-6, 형질전환성장인자-베타1, 기질분해효소-9와 같은 염증성 사이토카인의 생산을 억제한다(Fig. 4, 5, 6). 흥미롭게도, 형질전환성장인자-베타1만 작은 농도의 시스테아민(0.5 mM)에서 유의하게 상승하였다. 형질전환성장인자-베타1은 각막 화학화상에서 상처의 회복과 흉터를 조절한다고 알려져 있다.³¹ 형질전환성장인자-베타1은 각막 상피세포, 기질세포의 이동을 촉진하고 각막 기질세포

의 근섬유모세포로 전환되어 분화가 일어나는데, 결과적으로 각막상피와 기질의 재생을 도와주게 된다.^{24,31,32} 하지만 과도하게 발현된 형질전환성장인자-베타1은 각막손상 이후에 각막기질에 근섬유모세포가 축적됨으로써 각막의 혼탁을 유발하게 되는데, 이는 근섬유모세포가 변형된 crystalline을 생성하고 각막 기질세포보다 덜 투명하기 때문이다.³³ 또한 형질전환성장인자-베타1은 기질분해효소-9, 인터류킨-6, monocyte/macrophage chemotactic protein-1을 포함한 다른 사이토카인의 발현을 유발하는 능력을 가지고 있다.^{24,32,34} 인터류킨-6는 염증성 사이토카인으로 알칼리 각막화상에서 증가된다고 보고되었다.⁷ 기질분해효소-9는 단백분해 효소(proteolytic enzyme)로 병적인 안구 상태나 화학적 각막손상 후 상승한다고 알려져 있다.^{3,34} 게다가, 기질분해효소-9는 세포외 기질의 분해나 재형성에 참여한다고 보고되었다.³⁵

흥미롭게도, 본 연구에서 시스테아민의 농도가 높을 때 (≥ 1 mM) 대식세포이동저해인자 수치의 증가가 관찰되었다. 대식세포이동저해인자는 innate 면역의 조절이나 염증 유발에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{36,37} 비록 대식세포이동저해인자가 말초혈액단핵구에 의해서 분비되기도 하지만, 대식세포이동저해인자는 가벼운 각막화상에서 각막 기질세포에 의해 표현되기도 한다.^{2,37} 우리 연구에서 각막세포는 0.05 N NaOH에 의해서 직접적으로 손상되었다. 대식세포이동저해인자는 말초혈액단핵구와 함께 화학적 손상을 입은 각막세포에 의해서 분비된 것으로 생각된다. 본 연구에서 시스테아민이 대식세포이동저해인자의 발현을 억제하지 못했다. 다른 염증성 사이토카인을 조절하는 대식세포이동저해인자의 수치증가는 염증을 유발하는 사이토카인의 감소에 따른 반동증가로 생각되는데 그 이유는 대식세포이동저해인자는 innate 면역을 조절하는 기능을 하기 때문이다. 시스테아민과 대식세포이동저해인자 사이의 관계를 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

기존 연구에서 배양된 각막내피세포에서 높은 농도의 시스테아민은 세포독성을 보였다는 보고가 있다.³⁸ 본 연구에서는 각막세포에 대한 시스테아민의 독성을 조사하지는 않았는데 본 연구는 시스테아민이 NaOH로 손상된 각막세포에 대한 말초혈액단핵구의 염증반응을 억제할 수 있는가에 대해 주안점을 둔 연구로 향후 시스테아민의 농도에 따른 각막세포에 대한 독성의 연구가 필요할 것으로 생각된다. 흥미롭게도 본 연구에서 고농도의 시스테아민은 말초혈액단핵구의 증식과 대식세포이동저해인자와 기질분해효소-9를 제외한 인터류킨-6와 형질전환성장인자-베타1의 염증성 사이토카인의 분비를 음성 대조군보

다도 감소시켰는데 이는 고농도의 시스테아민이 정상적으로 자극되지 않은 말초혈액단핵구에서도 세포 독성이 있을 가능성을 시사한다.³⁸

각막 화학화상 후 말초혈액단핵구의 사이토카인 방출을 연구하기 위해 본 연구에서 화학적으로 손상된 각막 기질세포를 사용하였다. 화학적 손상은 각막 기질세포의 괴사를 유발하게 되고 이는 더 심한 각막의 염증을 유발한다.^{1,8} 각막기질의 염증은 신생혈관과 섬유화를 일으키는데, 이는 각막이식수술이 필요한 정도의 심한 시각 장애를 일으킨다.^{1,8} 각막기질 손상이 발생하면 각막세포는 대식세포와 같이 변화한다고 보고되었다.¹³ 반면, 새로운 신생혈관은 각막 내피세포와 테스메막에서 형성되지 않는다고 알려져 있다.³⁹ 이전의 연구와는 달리 우리는 기질 분해효소-9와 대식세포이동저해인자 등 더 많은 사이토카인의 발현에 대해 알아보았는데, 이는 화학적 각막화상 연구에서 발현되며 중요한 역할을 한다고 보고되었다.^{2,3} 본 연구에서 시스테아민은 활성산소물질의 감소를 통해 말초혈액단핵구의 증식과 여러 가지 염증 매개물질의 분비를 억제하였고, 이를 통해서 각막 화학화상의 치료제로 시스테아민의 사용 가능성을 제기하였다. 더 나아가 시스테아민의 생체 내 사용을 위한 적절한 농도를 알기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 비록 시스테아민은 대식세포이동저해인자 수치를 증가시키지만 세포 내 활성산소물질의 감소를 통해 화학적 손상을 입은 각막세포에 의해 자극을 받은 말초혈액단핵구의 증식과 염증성 사이토카인의 분비를 억제한다. 활성산소물질을 매개로 시스테아민이 손상된 각막세포로부터 자극된 말초혈액단핵구에서 염증성 사이토카인의 분비를 억제한다는 점을 고려해 볼 때 각막 화학화상에서 치료에 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- 1) Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997;41:275-313.
- 2) Oh SY, Choi JS, Kim EJ, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in ocular surface disease pathogenesis after chemical burn in the murine eye. *Mol Vis* 2010;16:2402-11.
- 3) Shi W, Liu J, Li M, et al. Expression of MMP, HPSE, and FAP in stroma promoted corneal neovascularization induced by different etiological factors. *Curr Eye Res* 2010;35:967-77.
- 4) Planck SR, Rich LF, Ansel JC, et al. Trauma and alkali burns induce distinct patterns of cytokine gene expression in the rat cornea. *Ocul Immunol Inflamm* 1997;5:95-100.
- 5) Gicquel JJ. Management of ocular surface chemical burns. *Br J Ophthalmol* 2011;95:159-61.
- 6) Chung JH, Kim HJ, Fagerholmb P, Cho BC. Effect of topically applied Na-hyaluronan on experimental corneal alkali wound healing. *Korean J Ophthalmol* 1996;10:68-75.
- 7) Pattamatta U, Willcox M, Stapleton F, Garrett Q. Bovine lactoferrin promotes corneal wound healing and suppresses IL-1 expression in alkali wounded mouse cornea. *Curr Eye Res* 2013;38:1110-7.
- 8) Dohlman CH, Cade F, Pfister R. Chemical burns to the eye: paradigm shifts in treatment. *Cornea* 2011;30:613-4.
- 9) Kubota M, Shimmura S, Kubota S, et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:427-33.
- 10) Kessler A, Biasibetti M, da Silva Melo DA, et al. Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats. *Neurochem Res* 2008;33:737-44.
- 11) Wilmer MJ, Kluijtmans LA, van der Velden TJ, et al. Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:643-51.
- 12) Choi YM, Park CG, Lee HS, Hur WJ. The effects of cysteamine on the radiation-induced apoptosis. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2000;18:214-19.
- 13) Chakravarti S, Wu F, Vij N, et al. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3475-84.
- 14) Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, et al. Proteoglycan expression during transforming growth factor beta-induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem* 2001;276:44173-8.
- 15) Bourcier T, Borderie V, Forgez P, et al. In vitro effects of dexamethasone on human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1061-70.
- 16) Borderie VM, Lopez M, Lombet A, et al. Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1511-19.
- 17) Musselmann K, Kane BP, Hassell JR. Isolation of a putative keratocyte activating factor from the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2003;77:273-9.
- 18) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 19) Pathak S, Goldofsky E, Vivas EX, et al. IL-1 β is overexpressed and aberrantly regulated in corticosteroid nonresponders with autoimmune inner ear disease. *J Immunol* 2011;186:1870-9.
- 20) Yang L, Hou Y. Different characters of spleen OX-62 positive dendritic cells between Fischer and Lewis rats. *Cell Mol Immunol* 2006;3:145-50.
- 21) Shin YJ, Kim JH, Seo JM, et al. Protective effect of clusterin on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2009;15:2789-95.
- 22) Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol* 1997;41:275-313.
- 23) Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006;28:219-42.
- 24) Saika S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea* 2004;23(8 Suppl):S25-30.
- 25) Jester JV, Barry PA, Lind GJ, et al. Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:730-43.
- 26) Katakami C, Fujisawa K, Sahori A, et al. Localization of collagen

- (I) and collagenase mRNA by in situ hybridization during corneal wound healing after epikeratophakia or alkali-burn. Jpn J Ophthalmol 1992;36:10-22.
- 27) Chakravarti S, Wu F, Vij N, et al. Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45:3475-84.
- 28) Bryan N, Ahswin H, Smart N, et al. Reactive oxygen species (ROS)-a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. Eur Cell Mater 2012;24:249-65.
- 29) Kovac S, Anzelova PR, Holmström KM, et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. Biochim Biophys Acta 2015;1850:794-801.
- 30) Misik V, Miyoshi N, Riesz P. Effects of cysteamine and cystamine on the sonochemical accumulation of hydrogen peroxide- implications for their mechanisms of action in ultrasound-exposed cells. Free Radic Biol Med 1999;26:961-7.
- 31) Chen M, Matsuda H, Wang L, et al. Pretranscriptional regulation of Tgf-beta1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. Mol Ther 2010;18:519-27.
- 32) Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Expression of Smad7 in mouse eyes accelerates healing of corneal tissue after exposure to alkali. Am J Pathol 2005;166:1405-18.
- 33) Zieske JD, Hutcheon AE, Guo X, et al. TGF-beta receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1465-71.
- 34) Sambursky R, O'Brien TP. MMP-9 and the perioperative management of LASIK surgery. Curr Opin Ophthalmol 2011;22:294-303.
- 35) Chang JH, Han KY, Azar DT. Wound healing fibroblasts modulate corneal angiogenic privilege: interplay of basic fibroblast growth factor and matrix metalloproteinases in corneal angiogenesis. Jpn J Ophthalmol 2010;54:199-205.
- 36) Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol 2003;3:791-800.
- 37) Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000;279: R1043-49.
- 38) Shin YJ, Seo JM, Chung TY, et al. Effect of cysteamine on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells. Curr Eye Res 2011;36:910-7.
- 39) Waring GO 3rd, Rodrigues MM. Patterns of pathologic response in the cornea. Surv Ophthalmol 1987;31:262-6.

= 국문초록 =

말초혈액단핵구와 화학적으로 손상된 각막세포의 혼합반응에 대한 시스테아민의 효과

목적: 말초혈액단핵구와 화학적으로 손상된 각막세포의 혼합반응에 대한 시스테아민의 효과를 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 사람각막간질세포를 0.05 N NaOH로 60초간 처리하여 화학적으로 손상시킨 후 말초혈액단핵구자극 검사를 시행하였다. 혼합 말초혈액단핵구-각막세포반응은 이후 다양한 농도의 시스테아민(0-10 mM)으로 처리되었다. 세포 내 활성산소물질 형성 정도는 산화에 민감한 형광탐침자인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용하여 측정되었다. NaOH로 처리된 각막세포에 의해 촉진된 말초혈액단핵구의 증식 속도와 염증성 사이토카인 분비는 각각 bromodeoxyuridine 증식분석검사와 효소결합 면역흡수분 석법으로 측정하였다.

결과: 말초혈액단핵구 증식은 시스테아민의 농도에 비례하여 억제되었다($p=0.019$). DCF-DA 형광은 시스테아민 농도에 비례하여 감소 하였다($p<0.001$). 시스테아민의 농도에 비례하여 기질분해효소-9 (matrix metalloprotease-9, MMP-9), 인터류킨-6 (interleukin-6, IL-6), 형질전환성장인자-베타1 (transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)은 억제되었고($p<0.05$), 대식세포이동저해인자(macrophage migration inhibitory factor, MIF)는 증가하였다($p=0.008$).

결론: 시스테아민이 활성산소물질의 억제를 통하여 화학적으로 손상된 각막세포에 의해 유발된 말초혈액단핵구의 증식과 염증 사이 토카인의 분비를 억제하였다. 따라서 시스테아민이 화학적 각막손상 환자에서 치료제로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

(대한안과학회지 2015;56(10):1511-1519)