

눈물 내 단백질 분석을 위한 눈물 수집 방법의 효용성 비교

Comparison of the Effectiveness between Sampling Methods for Protein Analysis of Tear Fluids

이철희¹ · 여아름¹ · 김태임^{1,2} · 서경률^{1,2} · 김응권^{1,2} · 이형근^{1,2}

Chul Hee Lee, MD¹, Areum Yeo, MS¹, Tae Im Kim, MD, PhD^{1,2}, Kyoung Yul Seo, MD, PhD^{1,2},
Eung Kweon Kim, MD, PhD^{1,2}, Hyung Keun Lee, MD^{1,2}

연세대학교 의과대학 안과학교실 시기능개발연구소¹, 연세대학교 의과대학 안과학교실 각막이상증연구소²

*The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine¹, Seoul, Korea
Corneal Dystrophy Research Institute, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine², Seoul, Korea*

Purpose: Although various sampling methods of tears from conjunctival sac have been reported, no previous study compared their effectiveness or efficiency based on protein extraction. By comparing the compliance, volume and protein concentration of each tear sampling method, we searched for the most efficient tear collection method.

Methods: Resting tear samples of 14 eyes of normal subjects were collected using Schirmer paper, capillary tube, cellulose acetate rod and 3 different ophthalmic sponges made of different materials and density (MeroCel[®], KeraCel[®] and Weck-Cel[®]). After centrifugation of the collected tear samples, the tear volume and protein concentration were measured for each method. Additionally, the compliance of each tear sampling method was analyzed by numerically representing the amount of discomfort experienced during resting tear collection.

Results: The average volume retrieved by each tear sampling method was $9.0 \pm 1.1 \mu\text{L}$ with no significant differences between groups. The average concentration of protein retrieved by each tear sampling method was $5.3 \pm 1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. MeroCel[®] retrieved $7.6 \pm 0.61 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, which was significantly higher than other sampling methods ($p < 0.05$). The compliance of MeroCel[®] and the capillary tube were the highest, while KeraCel[®] showed the lowest compliance.

Conclusions: MeroCel[®] retrieved the highest amount of protein and showed high compliance and may be the most effective and easily applicable tear sampling method in clinical settings.

J Korean Ophthalmol Soc 2015;56(11):1677-1683

Key Words: Capillary tube, Ophthalmic sponge, Protein analysis, Tear fluid, Tear sampling method

■ Received: 2015. 2. 12. ■ Revised: 2015. 7. 7.

■ Accepted: 2015. 9. 4.

■ Address reprint requests to **Hyung Keun Lee, MD**
Department of Ophthalmology, Gangnam Severance Hospital,
#211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 06273, Korea
Tel: 82-2-2019-3440, Fax: 82-2-3463-1049
E-mail: shadik@yuhs.ac

* This study was presented as a narration at the 112th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2014.

* This study was partially supported by a grant of the Korean Health Technology R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HI13C0055).

건성안 연구에서 눈물의 단백질 조성에 대한 분석은 건성안의 병태생리 및 새로운 치료법의 표적 물질을 밝히는 데 있어 중요하다고 알려져 있다. 눈물층은 각막 표면을 유지하는 데 중요한 역할을 하며, 각막 표면을 균일하게 할 뿐만 아니라 안구 표면의 노폐물이나 이물을 물리적으로 세척하며 무혈관조직인 각막에 영양분을 공급하는 기능을 한다. 또한 여러 병원체의 안구 내 침입으로부터 안구를 보호하는 역할을 한다. 이처럼 다양한 역할을 하는 눈물층은 다양한 단백질 및 지질로 구성되어 있다.¹ 외안부는 구조적으로 연구용 검체를 얻기 쉬운 장점이 있으며² 단백질체학

© 2015 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

및 지질체학 연구에 적합하기 때문에 휴지기 눈물 수집을 통한 다양한 연구가 진행되고 있다.³ 최근에 단백질체학 기술의 발전으로 정상인의 눈물에서 400가지 이상의 단백질이 검출되었으며, 눈물의 단백질 연구는 다양한 질환의 병태생리 이해에 큰 기여를 하고 있다.⁴ 이 같은 연구는 특히 건성안 환자들을 대상으로 활발히 진행되고 있으며 건성안 군에서 수집한 휴지기 눈물에서 S100A6, annexin A1 (ANXA1), annexin A11 (ANXA11), Cystatin-S (CST4), Phospholipase A2-activating protein (PLAA)과 같이 세포자멸사, 염증 및 감염과 관련된 단백질이 유의하게 증가한 것이 보고된 바 있다.⁵ 또한 건성안이 있는 쇼그렌증후군 환자군, 건성안군, 정상인의 눈물을 수집하여 단백질 조성을 분석하였을 때 defensin α 1, clusterin, lactotransferrin과 같은 단백질들이 쇼그렌증후군 환자군에서 유의하게 증가되었음이 알려졌다.⁶ 또 건성안군에서 lactoferrin, lipocalin-1, lipophilin A-C의 발현이 유의하게 저하되어 있으며 혈청 알부민의 발현이 유의하게 증가되어 있었는데 이 같은 연구 역시 휴지기 눈물의 수집 및 분석을 통해 이루어졌다.⁷ 굴절교정레이저각막절제술 전과 후의 눈물 단백질 조성을 비교한 연구에도 휴지기 눈물의 수집 및 분석이 이용되었다.⁸ 위 사례들과 같이 눈물의 단백질 조성에 대한 분석은 다양한 각막질환의 병태생리 이해에 도움이 되고 있으며 안구 표면 질환의 조기 진단에 진단적 활용 가능성이 제기되고 있다.⁹ 그러나 눈물층 분석의 중요성이 강조되는 반면에 눈물 수집 방법은 아직 표준화되지 않아 임상적 적용에 어려움이 있다.¹⁰

현재까지 휴지기 눈물을 수집하는 여러 가지 방법이 알려져 있으며, 대표적으로 쉬르머 종이(Schirmer paper)¹¹, 모세관(capillary tube)¹², 셀룰로스 막대(cellulose rod)¹³, 안과용 스펀지가 있다.¹⁴ 상기 눈물 수집 도구들은 각각 다른 재질로 제작되어 흡수되는 눈물의 양, 단백질의 양 및 종류가 다를 수 있으며, 흡수된 눈물이 분리되는 과정에서 재질에 따라 분리되는 눈물의 양, 단백질의 양 및 종류 또한 차이가 있을 것으로 예측된다. 쉬르머 종이와 모세관의 단백질 분리 능력을 비교한 연구에 따르면¹² 안구표면에 존재한다고 알려진 친수성 표면활성단백질(Surfactant protein, SP)인 SP-A와 SP-D, 소수성인 SP-B와 C를 모두 효과적으로 분리하였고, 분리된 단백질의 농도는 각 방법 간에 유의한 차이가 없었다.¹² 안과용 스펀지 3종류의 사이토카인(cytokine) 분리 능력을 비교한 다른 연구에 따르면 폴리비닐알코올(Polyvinyl alcohol) 재질인 메로셀(Merocel[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA) 스펀지가 폴리비닐알코올 재질의 프로-오프타(PRO-OPHTA[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA)와 셀룰로스

(cellulose) 재질인 웨셀(Weck-Cel[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA)보다 유의하게 더 많은 양의 사이토카인을 분리할 수 있었다고 보고된 바 있다.¹⁴ 현재까지 알려진 눈물 수집 방법들을 종합적으로 비교 분석한 연구는 없으며, 표준화된 눈물 수집 방법이 없어 임상적 응용에 어려움이 있었다.

본 연구에서는 쉬르머 종이, 모세관, 셀룰로스 막대, 안과용 스펀지 세 가지 종류인 메로셀(Merocel[®]), 케라셀(KeraCel[®]) 그리고 웨셀(Weck-Cel[®])을 이용한 휴지기 눈물 수집 방법을 비교해 비침습적으로 휴지기 눈물의 양과 단백질 조성을 비교할 수 있는 가장 효율적인 방법을 찾고자 하였다.

대상과 방법

대상

2014년 5월부터 2014년 10월까지 본원에 내원한, 건성안이 없는 정상인의 14안을 대상으로 진행하였다. 국제 건성안 워크숍(International Dry Eye Workshop)에서 2007년에 제정한 건성안의 정의를 참고하였으며, 이물감, 건조감, 시야흐림 등의 증상을 동반하며 눈물막 파괴시간이 10초 미만, 플루오레세인 염색으로 점상각막염이 있는 경우로 정의하였다.¹⁵ 콘택트렌즈 사용력, 백내장, 녹내장, 각막 혹은 망막 질환이 있는 경우는 연구대상에서 제외하였으며 각막수술, 안구 내 수술의 기왕력, 영구적 또는 일시적 눈물점마개를 시행한 경우, 눈물관 질환이 있는 경우는 본 연구에서 제외하였다.

눈물 수집 기구 선정

눈물 수집 도구로는 쉬르머 종이(Schirmer paper; Eagle Vision[®], Memphis, TN, USA), 모세관(capillary tube; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen, Germany), 셀룰로스 막대(cellulose rod), 안과용 스펀지의 3가지 종류인 메로셀(Merocel[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA), 케라셀(KeraCel[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA), 웨셀(Weck-cel[®]; Beaver-Visitec International Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 안과용 스펀지는 100가지 이상이 시중에 유통되고 있으며 그 종류, 크기, 모양, 재질 등이 다양하며, 본 연구에서는 국내에서 취급 가능한 안과용 스펀지 중 재질이 다른 3가지인 폴리비닐알코올 재질인 메로셀(Merocel[®]), 고밀도 폴리비닐알코올 재질인 케라셀(KeraCel[®]), 셀룰로스 재질인 웨셀(Weck-cel[®])을 사용하였다.

눈물 수집 및 단백질 분리 방법

눈물을 수집하는 방법은 다음과 같았다. 자극감을 줄이기 위하여 양안에 점안마취제를 한 방울 점안하고 5초 이상 기다린 후 50 μ L 식염수를 가측 결막낭에 떨어뜨렸다. 그 후 같은 위치에서 눈물 수집 도구를 이용해 눈물을 수집했다(Fig. 1). 눈물 수집을 할 때 기구가 눈을 자극할 수 있고 이로 인해 수집되는 눈물의 양 및 단백질 구성의 변화가 나타날 수 있기 때문에 각 기구 간 최소 3일 간격을 두고 눈물을 수집하였다.¹⁶

수집된 눈물을 분석하기 위한 원심분리 방법은 다음과 같다. 눈물을 충분히 흡수시킨 검체를 아래쪽에 구멍이 뚫린 0.2 mL 튜브(Eppendorf reaction tube; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)에 넣은 후 0.2 mL 튜브를 반으로 잘린 파이펫 끝에 고정시켰다. 파이펫 끝에 고정된 검체를 1.5 mL 튜브(Eppendorf reaction tube; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) 내에 고정된 후 파라핀 필름으로 뚜껑 주변을 밀봉하였다. 완성된 1.5 mL 튜브는 섭씨 4도에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리시켰다(Fig. 2). 분리된 눈물은 1.5 mL 튜브 아래쪽으로 모이게 되며 잘 분리된 황색의 눈물시료를 관찰할 수 있었다.

다음으로 원심 분리된 눈물의 양을 분석하였다. 1.5 mL 튜브 아래쪽에 모인 눈물시료를 마이크로파이펫으로 옮겨 수집된 눈물의 양을 측정하여 비교하였다. 각 샘플의 부피 평균을 눈물 수집 도구별로 산출하였으며 그 값을 서로 비교하였다.

분리된 눈물에서 검출되는 단백질의 정량을 분석하였다. 전기영동법을 이용하여 정량분석을 시행하였으며 이 과정은 다음과 같다: 분리된 눈물 시료를 10% SDS PAGE gel 40 V에서 40분, 120 V에서 3시간 진행한 후 1시간 동안 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색하였다. 염색된 샘플을 탈색시킨 후 분리된 단백질의 정량을 전기영동을 통해 분석하였고, 각 도구별 결과값을 비교하였다.

0.5% 소혈청알부민을 이용해 재료에 흡수된 후 분리되는 단백질 정량

각 눈물 수집 도구별로 흡수 및 분리 과정 중 소실되는 단백질의 정도에 대한 객관적인 평가를 시행하기 위해 단백질 농도가 이미 알려진 소혈청알부민(Bovine serum albumin)을 이용하였다. 0.5% 소혈청알부민을 충분히 흡수시킨 후 위에서 언급된 눈물 분리 과정과 동일한 방법으로 원심분리를 진행하였으며 같은 방법으로 전기영동 분석을 진행하였다. 각 샘플의 분리된 단백질 정량의 평균을 눈물 수집 도구별로 산출하였으며 그 값을 서로 비교하였다.

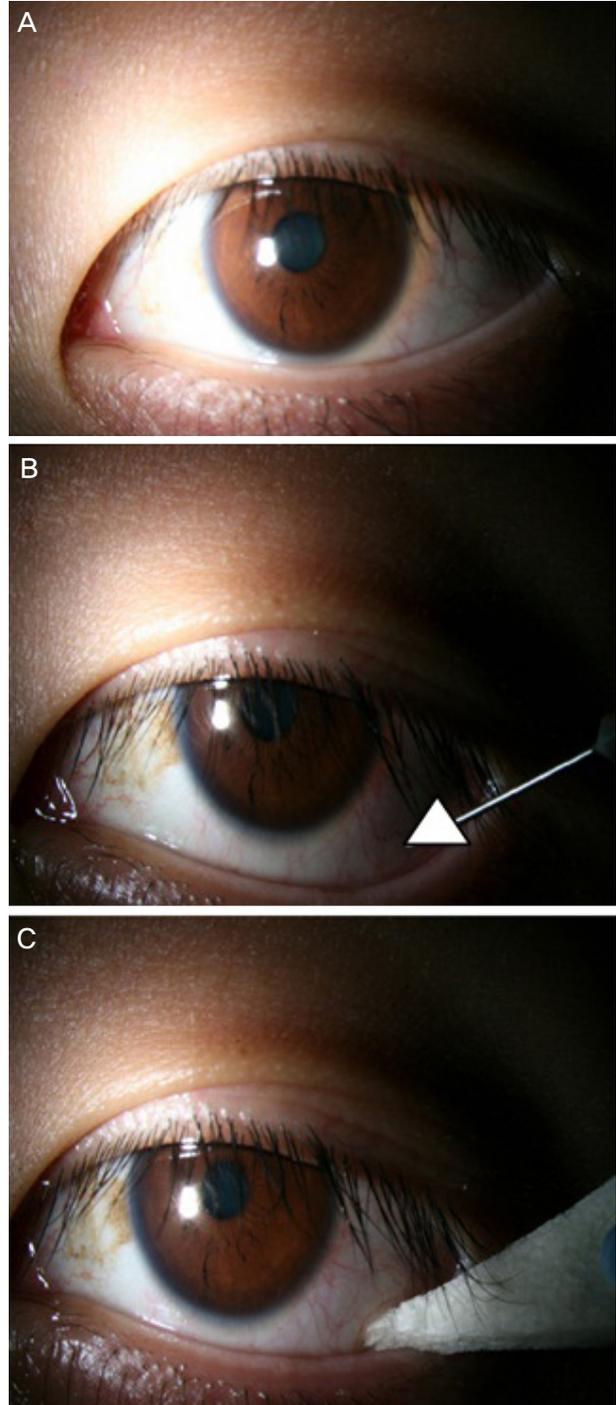


Figure 1. Schematic diagram of the protocol for tear collection by Meroceal® ophthalmic sponge. (A) One drop of topical anesthesia was applied on both eyes. (B) After five seconds, 50 microliters of normal saline was dropped at the lateral conjunctival sac (white arrow). (C) Tear fluid was collected at the lateral conjunctival sac immediately after applying normal saline. There was at least three day interval between each method of tear film collection.

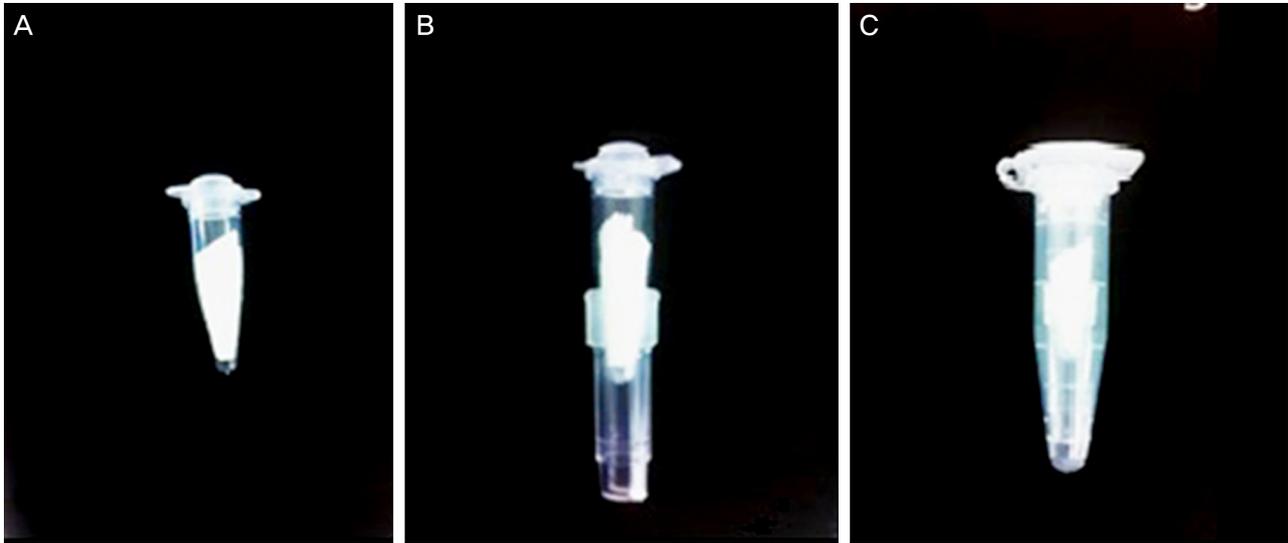


Figure 2. Centrifuging method for collected tear samples. (A) Tear fluid containing samples were fixed in a pin-holed 0.2 mL eppendorf tube. (B) The 0.2 mL eppendorf tube containing tear sample was fixed in a half-cut pipette tip. (C) The half-cut pipette tip was fixed in a 1.5 mL eppendorf tube. Paraffin taping was done to prevent loss of tear fluid samples. After, that the sample was centrifuged at 13,000 rpm, 4°C for 5 minutes.

Table 1. Pain scoring during tear sampling

	CR	Sch	SpM	SpW	SpV	CT
Average pain score	2.6	1.8	1.5	1.8	3.0	1.6

Pain score grading; 1: No discomfort during the procedure, 2: Moderate discomfort during the procedure, 3: Severe discomfort during the procedure. CR = cellulose acetate rod; Sch = Schirmer; SpM = Meroce1®; SpW = Weck-Cel®; SpV = KeraCel®; CT = capillary tube.

눈물 수집 기구의 불편감

각 눈물 수집 방법의 임상적 응용 가능성을 평가하기 위해 눈물 수집 과정 중에 대상안에서 느끼는 불편감을 점수화하여 평가하도록 했다. 1점은 불편감이 전혀 없는 상태, 2점은 불편감이 있으나 견딜 수 있는 정도, 3점은 불편감이 심하여 견디기 어려운 정도로 평가하도록 하였고 각 도구별 점수의 평균을 구하여 비교하였다(Table 1).

통계

통계 분석은 SPSS 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 사용하였으며 유의확률 $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

분리된 눈물의 부피

셀룰로스 막대에서 평균 $10.4 \pm 1.2 \mu\text{L}$ 로 가장 많은 양의 눈물이 측정되었다. 쉬르머종이는 평균 $10.2 \pm 1.3 \mu\text{L}$, 모세관은 $9.1 \pm 1.4 \mu\text{L}$, 웨셀은 $8.6 \pm 1.9 \mu\text{L}$, 케라셀은 $8.3 \pm 1.8 \mu\text{L}$, 메로셀은 $7.6 \pm 0.6 \mu\text{L}$ 가 측정되었다. 각 눈물 수집 방법으로 원심분리된 눈물 부피의 전체 평균은 $9.0 \pm 1.1 \mu\text{L}$ 였으며 각

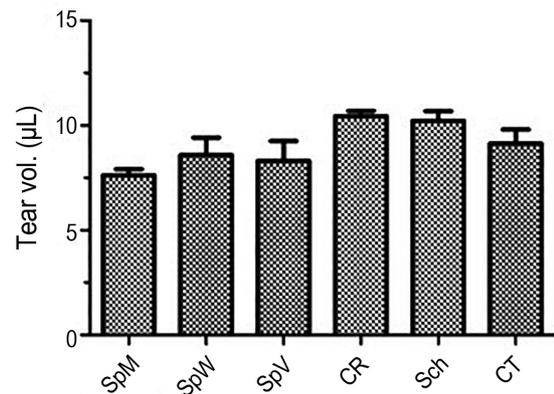


Figure 3. Comparison of volume of extracted tear fluid. There was no significant difference between the volume of extracted tear fluids of each samples. SpM = Meroce1®; SpW = Weck-Cel®; SpV = KeraCel®; CR = cellulose acetate rod; Sch = Schirmer; CT = capillary tube; vol. = volume.

군 간 측정된 눈물의 부피는 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

분리된 눈물의 단백질 정량

각 눈물 수집 방법으로 분리된 단백질의 정량을 비교했을 때 평균적으로 $5.3 \pm 1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 단백질이 분리되었으며 메로셀에서 $7.6 \pm 0.61 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 다른 군들에 비해 유의

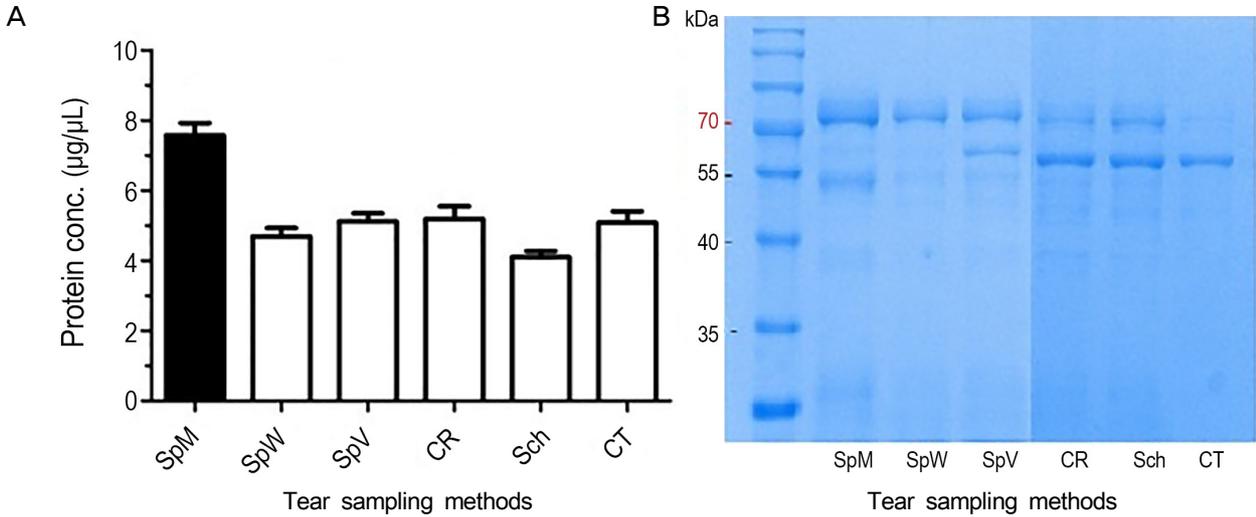


Figure 4. Comparison of protein concentration of extracted tear fluid by electrophoresis. (A) Quantitative comparison of protein concentration of extracted tear fluid by electrophoresis. SpM showed significantly higher concentration of protein compared to other methods ($p < 0.05$). (B) Electrophoresis was performed for each tear samples collected by different methods. SpM = MeroCel®; SpW = Weck-Cel®; SpV = KeraCel®; CR = cellulose acetate rod; Sch = Schirmer; CT = capillary tube; conc. = concentration.

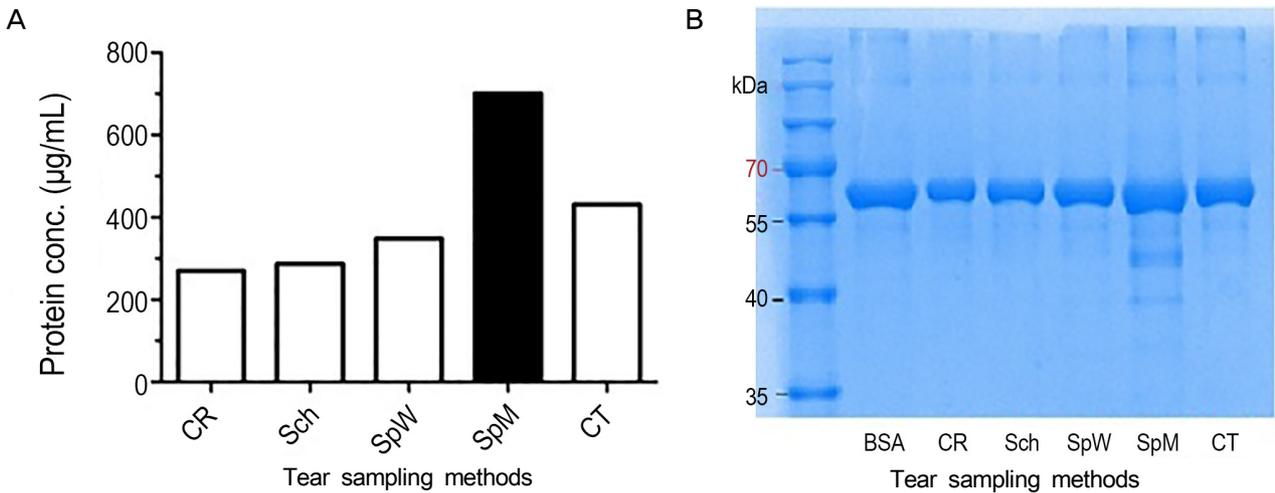


Figure 5. Comparison of protein concentration of 0.5% Bovine serum albumin after collection and extraction. (A) Quantitative comparison of protein concentration of 0.5% Bovine serum albumin after collection and extraction. SpM showed significantly higher concentration of protein concentration compared to other methods ($p < 0.05$). (B) Electrophoresis was performed for each samples collected by different methods. CR = cellulose acetate rod; Sch = Schirmer; SpW = Weck-Cel®; SpM = MeroCel®; CT = capillary tube; conc. = concentration; BSA = bovine serum albumin.

하게 많은 양의 단백질이 분리되었다($p < 0.05$). 쉬르머 종이는 $4.1 \pm 0.31 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 웨셀은 $4.7 \pm 0.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 모세관은 $5.0 \pm 0.76 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 케라셀은 $5.1 \pm 0.64 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 셀룰로스 막대는 $5.2 \pm 0.95 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 단백질을 분리했다(Fig. 4).

0.5% 소혈청알부민을 이용해 재료에 흡수된 후 분리되는 단백질 정량

각 방법으로 0.5% 소혈청알부민을 흡수한 후 분리된 단백질의 정량을 비교했을 때 평균적으로 $407 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 단백질이 분리되었으며 메로셀이 $701 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 다른 군들에 비해 유의

하게 많은 양의 단백질이 분리되었다($p < 0.05$) (Fig. 5).

눈물을 수집하는 과정의 불편감

눈물 수집 과정 중의 불편감을 점수화하였을 때 케라셀 안과용 스펀지가 평균 2.9 ± 0.2 점으로 가장 순응도가 떨어졌으며 셀룰로스 막대가 평균 2.6 ± 0.5 점으로 두 번째로 불편감이 높았다. 가장 불편감이 적었던 눈물 수집 방법은 평균 1.5 ± 0.5 점으로 메로셀 안과용 스펀지였으며 모세관이 평균 1.6 ± 0.5 점으로 두 번째로 불편감이 적었다.

고찰

건성안 연구에서 눈물을 수집하는 방법은 다양하나 아직 표준화된 방법이 없어 임상적 응용에 어려움이 있었다. 본 연구는 다양한 눈물 수집 방법을 비교함으로써 임상적인 사용에 가장 적절한 방법을 찾는 데 그 의의가 있다. 아직까지 휴지기 눈물의 조성에 대해 명확하게 밝혀져 있지 않기 때문에 어떤 눈물 수집 방법을 통하는 것이 본래의 눈물 상태를 대표할 수 있는지에 대해 밝혀내기는 어려운 상태이다. 심지어 눈물의 총 단백질 농도는 눈물을 수집하는 방법, 수집된 눈물의 상태, 단백질 검출 방법에 따라 6 mg/mL에서 11 mg/mL까지 상당히 큰 편차로 보고되었다.^{17,18} 이처럼 휴지기 눈물 분석에는 변수가 많아 어떤 눈물 수집 도구가 우세한지 판단할 때 이러한 변수들을 고려해야 한다.

본 연구에서 메로셀이 가장 많은 양의 단백질을 분리했다는 것을 알 수 있고 이는 기존 연구에서 메로셀이 다른 재질의 안과용 스펀지인 프로-오프타와 웨셀보다 유의하게 더 많은 양의 사이토카인을 분리했던 연구와 통하는 부분이 있다.¹⁴ 메로셀은 또한 불편감이 1.5점으로 가장 낮았으며 다른 눈물 수집 방법에 비해 대상 환자의 순응도가 높을 것으로 예측할 수 있었다. 안과용 스펀지는 눈물 수집용으로 사용하기 편리하며 흡수력이 좋아 충분한 양의 눈물을 빠른 시간 안에 흡수할 수 있는 장점이 있다.¹⁹ 그럼에도 불구하고 안과용 스펀지가 눈물 수집을 위해 임상적으로 널리 사용되지는 않고 있는데, 이는 다른 눈물 수집 방법인 쉬르머종이와 모세관이 비해서 덜 친숙하기 때문으로 생각된다.²⁰ 하지만 본 논문에서 밝혔듯이 안과용 스펀지 중 메로셀이 다른 눈물 수집 도구들에 비해 단백질 분리 능력이 뛰어나고 불편감 점수 또한 가장 낮기 때문에 현재까지 밝혀진 방법들 중에서는 가장 효과적인 눈물 수집 방법으로 생각된다.

메로셀의 재질인 폴리비닐알코올의 특성과 단백질 분리 능력은 긴밀히 연관되어 있는 것으로 보인다. 폴리비닐알코올은 수분에 대한 흡착력이 강한 반면에 단백질에 대한 친화력은 상대적으로 적은 것으로 알려져 있다.²¹ 그에 따라 수분을 흡수하여 부풀어 오르면서도 다른 단백질의 변형을 가져오지 않기 때문에 폴리비닐알코올 재제는 소프트렌즈 제작 시에도 사용되며²¹ 다양한 코팅 및 장벽의 재료로 적합하다고 평가 받고 있다.²² 폴리비닐알코올은 단백질에 대한 친화력이 낮기 때문에 메로셀에 흡수된 수용성 단백질이 다른 눈물 수집 방법에 비해 더 원활하게 분리되었을 것으로 생각된다.

폴리비닐알코올 자체의 배열 또한 단백질 분리에 영향을 끼칠 수 있을 것으로 생각되며, 본 연구에서 이러한 사실을

간접적으로 보여주고 있다. 본 연구에서 고밀도 폴리비닐알코올 재질로 만들어진 케라셀에서 메로셀에 비해 더 적은 양의 단백질이 분리되었는데 이는 폴리비닐알코올의 배열이 더 촘촘해질수록 큰 분자량의 단백질들의 여과율이 저하되었을 가능성이 있다. 눈물 수집 및 단백질 분석에 있어 고밀도의 폴리비닐알코올보다는 저밀도 폴리비닐알코올 재질의 안과용 스펀지가 더 유리함을 본 연구는 간접적으로 보여주고 있다.

본 연구 결과에 따르면 케라셀 안과용 스펀지와 셀룰로스 막대는 불편감 점수가 높아 임상적으로 사용하기 어려울 것으로 보인다. 쉬르머 종이는 임상에서 눈물 수집용 도구로 널리 쓰이고 있고 접근성이 편리하나 마취를 안 한 상태에서는 자극감이 심하기 때문에 단백질의 조성이 변할 가능성이 있다.¹⁶ 모세관의 경우 자극감이 심하지 않고 여과되는 단백질이 없기 때문에 자연 휴지기 눈물 수집에 가장 유리하다고 볼 수 있으나 충분한 양의 눈물을 흡수시키기 위한 시간이 오래 걸려 눈물 분비가 적은 건성안 환자에게 사용하기 부적합할 수 있다.¹⁶ 셀룰로스 재질의 웨셀의 경우 폴리비닐알코올 재질인 메로셀보다 단백질 분리 능력이 떨어진 것으로 나타났다. 셀룰로스는 특성상 수분에 대한 흡착력이 강한 반면에 수분 흡수 후 장력을 잃기 때문에 단백질의 분리가 폴리비닐알코올만큼 원활하지 않았던 것으로 추측된다.²³

현재까지 쓰이고 있는 다양한 눈물 수집 방법의 효과를 비교 분석한 연구는 없었고, 그에 대한 필요성은 여러 번 대두되어 왔다. 모세관이 자연 상태의 눈물과 가장 비슷한 눈물을 모을 수 있을 것으로 보인다는 주장이 있으나 눈물 분비가 적은 건성안 환자에서 사용하기 부적합하다.²⁰ 본 연구에서는 메로셀이 가장 효과적으로 단백질을 분리하면서 눈에 자극감이 없는 방법으로 나타났으며 앞으로 메로셀에서 분리된 단백질이 눈물의 자연 상태의 단백질 조성을 대표할 수 있는지에 대해 알기 위해 분리된 단백질의 스펙트럼에 관한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta* 2006;369:17-28.
- 2) Wu K, Zhang Y. Clinical application of tear proteomics: present and future prospects. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:972-82.
- 3) Lam SM, Tong L, Duan X, et al. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res* 2014;55:289-98.
- 4) de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 2006;7:R72.

- 5) Soria J, Durán JA, Etxebarria J, et al. Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. *J Proteomics* 2013;78:94-112.
- 6) Li B, Sheng M, Li J, et al. Tear proteomic analysis of Sjögren syndrome patients with dry eye syndrome by two-dimensional-nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Sci Rep* 2014;4:5772.
- 7) Versura P, Nanni P, Bavelloni A, et al. Tear proteomics in evaporative dry eye disease. *Eye (Lond)* 2010;24:1396-402.
- 8) Chae JK, Park SP, Choi TH. Comparative analysis of the tear protein expression after photorefractive keratectomy using two-dimensional electrophoresis. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:762-8.
- 9) Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2009;8:4889-905.
- 10) Labbé A, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. Ocular surface investigations in dry eye. *J Fr Ophtalmol* 2007;30:76-97.
- 11) Quah JH, Tong L, Barbier S. Patient acceptability of tear collection in the primary healthcare setting. *Optom Vis Sci* 2014;91:452-8.
- 12) Posa A, Bräuer L, Schicht M, et al. Schirmer strip vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Ann Anat* 2013;195:137-42.
- 13) Esmaeelpour M, Cai J, Watts P, et al. Tear sample collection using cellulose acetate absorbent filters. *Ophthalmic Physiol Opt* 2008;28:577-83.
- 14) Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, et al. Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis* 2012;18:2717-25.
- 15) The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.
- 16) Stuchell RN, Feldman JJ, Farris RL, Mandel ID. The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:374-7.
- 17) Gachon AM, Richard J, Dastugue B. Human tears: normal protein pattern and individual protein determinations in adults. *Curr Eye Res* 1982-1983;2:301-8.
- 18) Ng V, Cho P, To C. Tear proteins of normal young Hong Kong Chinese. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:738-45.
- 19) López-Cisternas J, Castillo-Díaz J, Traipe-Castro L, López-Solís RO. Use of polyurethane minisponges to collect human tear fluid. *Cornea* 2006;25:312-8.
- 20) Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:527-50.
- 21) Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, et al. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5:397-406.
- 22) Alves MH, Jensen BE, Smith AA, Zelikin AN. Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromol Biosci* 2011;11:1293-313.
- 23) Bao CY, Long DR, Vergelati C. Miscibility and dynamical properties of cellulose acetate/plasticizer systems. *Carbohydr Polym* 2015;116:95-102.

= 국문초록 =

눈물 내 단백질 분석을 위한 눈물 수집 방법의 효용성 비교

목적: 결막낭으로부터 눈물을 수집하는 다양한 방법이 보고되었으나, 이들의 효과 및 단백질 수집 효율을 비교한 연구는 없었다. 본 연구는 보고된 다양한 눈물 수집 방법을 환자의 순응도, 눈물의 양, 분리된 단백질 농도의 항목으로 평가하여 비교하고, 가장 효율적인 방법을 찾고자 하였다.

대상과 방법: 정상안 14안을 대상으로 쉬머 종이, 모세관, 셀룰로스 막대, 재질과 밀도가 다른 세 종류의 안과용 스펀지-메로셀(Merocel[®]), 케라셀(KeraCel[®]) 그리고 웨셀(Weck-cel[®])을 이용하여 휴지기 눈물을 수집하였다. 눈물을 흡수시킨 샘플을 원심분리시킨 후 각 방법으로 수집된 눈물의 양과 단백질 농도를 측정하였다. 또한 눈물을 수집하는 대상안에서 느끼는 불편감을 수치화하여 검사의 순응도를 분석하였다.

결과: 각 눈물 수집 방법으로 분리된 눈물 부피는 평균 $9.0 \pm 1.1 \mu\text{L}$ 였으며 각 군 간 유의한 차이가 없었다. 각 눈물 수집 방법으로 분리된 단백질의 정량은 평균 $5.3 \pm 1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 였으며 메로셀에서 $7.6 \pm 0.61 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 다른 군들에 비해 유의하게 많이 정량되었다($p < 0.05$). 순응도는 메로셀과 모세관이 순응도가 높았으며 케라셀이 가장 순응도가 떨어졌다.

결론: 메로셀을 이용하였을 때 가장 많은 양의 단백질을 분리하였으며, 대상안의 순응도가 높아 가장 효용성이 높고 임상적인 활용이 용이한 눈물 수집 방법으로 생각된다.

<대한안과학회지 2015;56(11):1677-1683>
