

인체 혈청이 배양된 인체 각막상피세포에 미치는 영향

Effects of Human Serum on Human Corneal Epithelial Cells *in Vitro*

박영민^{1,2} · 박재성³ · 이인호⁴ · 이종수⁴

Young Min Park, MD^{1,2}, Jae Sung Park, MD³, In Ho Lee, MD⁴, Jong Soo Lee, MD, PhD⁴

경상대학교 의학전문대학원 안과학교실¹, 창원경상대학교병원 안과², 당감최안과의원³, 부산대학교 의학전문대학원 안과학교실⁴

Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University School of Medicine¹, Jinju, Korea

Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Changwon Hospital², Changwon, Korea

Danggam Choi Eye Clinic³, Busan, Korea

Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine⁴, Yangsan, Korea

Purpose: To investigate the effect of human serum on corneal epithelial cells.

Methods: Changes of corneal epithelial cells were evaluated after 1, 4, 12, and 24 hours (hrs) of exposure to various concentrations of human serum (3, 5, 8, and 16%). Cellular metabolic activity and the extent of cellular damage were measured. Effect of human serum on cell migration was also examined. Concentration of procollagen type-I COOH-terminal peptide (PIP), epidermal growth factor (EGF), and laminin after exposure to human serum was further observed.

Results: In every concentration of human serum, metabolic activity of the corneal epithelial cells temporarily decreased at 4 hrs of exposure and recovered to baseline levels afterward. With the same exposure time, there was no statistically significant difference in metabolic activity between the human serum-exposed group and the control group. Cellular toxicity of human serum exhibited a time- and dose-dependent relationship. Cellular migration was observed after 24 hrs of exposure to 5% concentration of human serum and after 12 hrs of exposure to 8% and 16% concentration of human serum. The PIP, EGF, and laminin titers increased in time- and dose-dependent manners.

Conclusions: Human serum does not decrease the metabolic activity of corneal epithelial cells as the concentration and exposure time increase, but it can induce cytotoxicity. Considering cellular migration, a serum concentration of 5% or higher should be used.

J Korean Ophthalmol Soc 2017;58(12):1333-1340

Keywords: Corneal epithelium, Metabolic activity, Scratch wound assay, Serum, Toxicity

일반적으로 창상의 치유는 손상 조직의 혈류 공급과 연관되는 경우가 많으며, 생리적인 혈관 신생은 세포에 적절한 혈류 공급을 통해 창상 치유에 필요한 영양분을 공급한

다.^{1,2} 정상적인 각막은 혈관이 없는 조직이기에 창상 치유 과정에서 직접적인 혈류 공급을 받지 못하여 눈물과 방수 그리고 윤부 혈관을 통해 영양분을 공급받으며, 혈청 내 인자들은 각막의 대사와 창상 치유에 있어 도움을 주는 것으로 알려져 있다.^{3,4}

각막이 손상을 받으면 각막상피세포는 epidermal growth factor (EGF) 또는 transforming growth factor beta (TGF- β) 등과 같은 성장 인자들의 자극을 통해 창상을 치유한다. 인체 혈청은 각막상피세포의 분화, 성장 및 이동에 필요한 EGF, TGF- β , fibronectin, insulin-like growth factor 1, sub-

■ Received: 2017. 3. 16. ■ Revised: 2017. 6. 27.

■ Accepted: 2017. 11. 29.

■ Address reprint requests to **Jong Soo Lee, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital, #179 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 49241, Korea
Tel: 82-51-240-7321, Fax: 82-51-240-7341
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2017 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.

stance P, 그리고 nerve growth factor와 같은 성분들을 포함한다.^{3,4} 1984년 Fox et al⁵에 의해 안구건조증 환자에서 인체 혈청 점안액의 효과가 발표된 이후, 현재에는 쇼그렌 증후군, 이식편대숙주병, 스티븐스존슨증후군, 반복각막진름, 그리고 지속상피결손 등 다양한 안 표면 질환에서 인체 혈청 점안액이 유용하게 사용되고 있다.^{6,9}

이 연구는 배양된 각막상피세포에 대한 인체 혈청 점안액의 효과와 독성을 알아보고, 인체 혈청 점안액의 농도에 따른 차이를 비교하여 안전하고 효과적인 인체 혈청 점안액의 농도를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

각막상피세포 배양

본 연구의 모든 과정은 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki)에 입각하여 진행되었으며, 부산대학교병원 의학연구소 연구윤리심의위원회의 승인을 받았다. 인체 각막상피세포 일차배양은 각막 이식 시 공여 각막을 사용하고 남은 주변부의 각막 조직을 이용하였다.¹⁰ 조직 배양 후드 내 현미경을 이용하여 각막 조직 중 데스메막, 각막 내피, 그리고 뒤쪽 각막 실질층을 박리하였다. 정상적인 각막 상피와 앞쪽 각막 실질층을 포함한 조직을 Ca^{2+} , Mg^{2+} 가 함유되지 않은 1.2 unit/mL Dispase II (Boehringer, Mannheim, Germany)에 담가 95% air - 5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에 1시간 처리하였다. 이후 5분간 1,000분당 회전수(revolutions per minute, rpm)에서 각막상피세포를 원심분리하였다.

각막상피세포를 분리한 다음 세포 침전물을 부유시켜 세포를 모은 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 ng/mL EGF (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 100 units/mL penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 포함하는 35 mm 크기의 조직 배양 접시(Corning Incorporated, Corning, NY, USA)로 옮겨 95% air - 5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에서 일차 배양하였다. 배양액은 매 2-3일마다 교체하였다. 각막상피세포는 대개 18-21일 이내에 합류(confluent growth)되었다. 합류가 되면 배양 배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Gibco BRL, Rockville, MD, USA)으로 한 번 세척하고 10분간 0.25% trypsin-0.002% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA: Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA)를 처리하여 세포를 배양 접시로부터 분리하였다. 세포가 배양접시에서 완전히 이탈되면 10분간 400 rpm에서 각막상피세포를 원심

분리한 뒤, 상층액은 제거하고 새로운 조직 배양접시에 분리된 세포가 포함된 배양액을 약 1 mL 넣고 신선한 배양액을 약 2 mL 첨가시켜 세포를 다시 배양하였다. 본 실험의 모든 과정에는 2세대(Second-passage) 각막상피세포가 사용되었으며, Coulter counter로 세포 수를 측정하여 배양액에 각막상피 세포 5×10^3 cell/mL가 되도록 부유시킨 다음 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 이후 인체 혈청을 추가하기 전 37°C, 95% air - 5% CO_2 의 배양기에서 1 mL 배양액과 함께 24시간 배양하여 세포가 well의 바닥에 부착할 수 있도록 하였다. 이때 세포 수가 너무 적을 경우 인체 혈청 등 실험 약제에 의한 효과가 저평가될 수 있어, 배지에서 각막상피 세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 4-5일 정도 배양시켰다.

세포의 대사 활성도 분석: MTT Assay

세포의 대사 활성도를 객관적으로 측정하기 위해 colorimetric tetrazolium salt MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 이용한 MTT assay를 시행하였다.¹¹ MTT assay는 대사 능력을 가진 세포 내 미토콘드리아 효소에 의해 노란색의 tetrazolium salt가 formazan 화합물로 바뀌는 원리를 이용한 것으로, 세포의 대사 활성도 정도를 흡광도를 이용하여 측정하는 방식이다.

배양된 각막상피세포를 4×10^3 cells/well의 농도로 96 well plate에 심은 후, 하나의 층을 형성하도록 24시간을 기다렸다. 이후 세포들은 150 mL의 DMEM을 포함한 3, 5, 8, 그리고 16% 인체 혈청에 1, 4, 12, 그리고 24시간 동안 노출하였다. 노출 이후 D-PBS로 2회 세척한 후 24시간 정도 세포 배양기에 넣어 배양한 다음 MTT assay를 실시하였다. 실험군과 동일한 방법으로 각막상피세포를 배양한 후, 인체 혈청에 노출한 실험군과는 달리 대조군에서는 balanced salt solution을 각막상피세포에 노출시킨 후 세포 대사 활성도를 측정하였다.^{12,13}

세포의 흡광도를 측정하기 위해 인체 혈청에 노출된 세포의 배지에 5 mg/mL 농도의 MTT solution을 100 µL 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 동안 정치배양하였다. 이후 D-PBS 용액으로 세척한 뒤 DMSO (Dimethyl sulfoxide: Sigma, St. Louis, MO, USA; Cat. D-5869)를 100 µL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 automatic plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 대사 활성도(%)는 각 well의 흡광도 수치를 대조군 well의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 각 well의 흡광도/대조군 well의 흡광도 $\times 100$ 으로 나타내었다. 이러한 과정들을 3회 반복하

여 각 농도와 노출 시간별로 측정된 흡광도의 평균을 구하여 Kruskal-Wallis test를 이용하여 통계학적으로 분석하였으며 $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다 평가하였다.¹²

세포 독성 분석: 젖산탈수효소(lactate dehydrogenase, LDH) assay

Lactate dehydrogenase assay는 세포질 내 LDH가 세포 외로 누출된 양을 측정하는 방법이다. 세포 배양 배지 내 LDH의 존재는 세포벽의 손상을 대변하며 이를 통해 세포 독성의 정도를 확인할 수 있다. LDH assay를 위해 배양된 각막상피세포를 4×10^3 cells/well의 농도로 96 well plate에 심은 후, 하나의 층을 형성하도록 24시간을 기다렸다. 이후 각막상피세포를 3, 5, 8, 그리고 16% 농도의 인체 혈청에 노출한 뒤 1, 4, 12, 14시간째 LDH 농도를 측정하였다. 각 well의 상층액을 추출하여 세포질에서 유리된 LDH 양을 37°C 온도의 암순응상태에서 CytoTox 96, a nonradioactive cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 대조군으로는 balanced salt solution에 노출된 각막상피세포를 사용하였으며, 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다. 모든 실험군과 대조군은 각각 10개의 배양된 각막상피 세포를 대상으로 실험을 하였으며, 평균 LDH 역가를 산출하여 대조군과의 통계학적인 비교를 하였다. 이러한 과정을 3회 반복하여 각 농도와 노출 시간별로 측정된 평균을 구하여 Kruskal-Wallis test를 이용하여 통계학적으로 분석하였으며 $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다 평가하였다.¹²

Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP), Laminin, 그리고 EGF의 측정

인체 혈청이 창상 치유와 관련된 인자들에 미치는 영향을 알아보기 위해, 창상회복 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포외기질 관련 인자로서 PIP와 laminin,^{14,15} 그리고 성장인자 중 EGF^{16,17}의 변화를 확인하였다. 각 well당 1×10^4 cells/mL의 각막상피세포를 24 well plate에 심은 후 4일 정도 충분히 배양한 다음 배지를 제거하고 D-PBS를 이용하여 세척한 뒤 3, 5, 8, 그리고 16%의 인체 혈청에 1, 4, 12, 그리고 24시간 동안 노출하였다. 이후 상층액을 제거하고 D-PBS로 1회 세척한 후 신선한 DMEM 배지를 첨가하여 24시간 배양한 배지를 채취하여 -80°C에 보관하였다. 세포층은 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.2)가 함유된 PBS 0.5 mL로 추출하여 -80°C에 보관하였다. 각 배양배지와 세포추출물의 PIP, Laminin 및 EGF의 농도는 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits (Takara, Tokyo, Japan)로 시행하였다.

약제에 따른 각막상피세포의 창상 회복 정도 검사:

Scratch-Wound Assay

각막상피세포의 창상 회복에 인체 혈청이 미치는 영향을 알아보기 위해 Scratch-Wound Assay가 시행되었다. 각막상피세포를 24 well plate에 심은 후 배양하여 합류에 도달하면, 5×10^3 cell/well이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500 μ L씩 심어 37°C, 95% air - 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. Subconfluence에 도달한 각막상피세포의 배지에 100 μ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 후 떨어진 세포를 제거하기 위해 상층의 배지를 제거하고, 다양한 농도(3, 5, 8, 그리고 16%)의 인체 혈청 및 대조군에 1, 4, 12, 그리고 24시간 동안 노출시켰다. 대조군으로는 balanced salt solution에 노출된 각막상피세포를 사용하였다. 노출 후 역상 광학 현미경 (inverted-contrast light microscope)으로 세포가 스크래치 모서리 부분으로 자라 들어오는 정도를 촬영하였다. 창상의 크기는 Image J software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)의 ROI manager를 이용하여 측정하였으며, 창상과 각막상피세포의 경계를 명확하게 하기 위해 versatile magic wand tool을 이용하여 각막상피세포의 대비 감도를 높여 창상 부위를 시각화한 뒤 창상 영역의 픽셀 수를 프로그램상의 자동화된 계산 방식을 통해 확인하였다. 창상의 크기 측정은 10회 반복하여 그 평균을 이용하였으며, 측정된 평균은 Kruskal-Wallis test를 이용하여 통계학적으로 분석하였고 $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다 평가하였다.

결 과

세포의 대사 활성도

인체 혈청 노출 후 각막상피세포 대사 활성도 변화를 MTT assay를 통해 관찰하였다. 각막상피세포 대사 활성도는 인체 혈청의 모든 농도에서 노출 4시간째 일시적으로 감소한 후, 노출 시간이 증가함에 따라 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군과 3, 5, 8, 그리고 16% 인체 혈청 농도 사이의 결과를 비교하였을 때, 노출 시간이 동일할 경우 대조군과 각 군 간의 유의한 세포 대사 활성도 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$, Fig. 1). 동일한 혈청 농도에서 노출 시간에 따른 세포 대사 활성도 변화를 관찰하였을 경우, 5%와 8%의 인체 혈청 농도에서만 노출 후 24시간째 유의한 세포 대사 활성도 증가가 관찰되었다($p < 0.01$, Fig. 1).

세포 독성

인체 혈청의 각막상피세포 독성 여부를 LDH assay를 이용하여 확인했을 때, 노출 시간이 동일할 경우 모든 인체 혈청의 농도에서 대조군에 비하여 높은 각막상피세포 독성

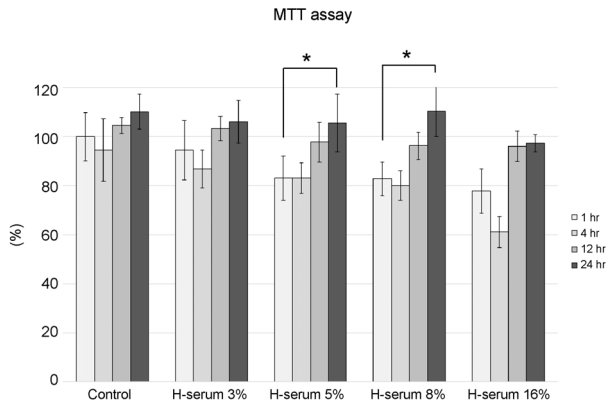


Figure 1. The absorption rate of the water-insoluble formazan dye in corneal epithelial cells. Metabolic activity of the corneal epithelial cells temporarily decreased at 4 hrs of exposure and recovered to baseline levels afterward. With the same exposure time, there was no statistically significant difference in metabolic activity between the human serum-exposed group and the control group. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test, intra-group comparison). hr = hour(s).

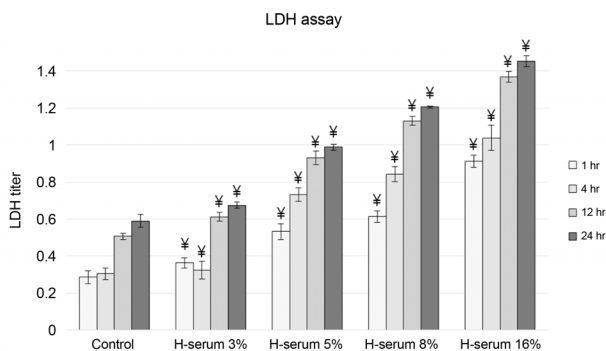


Figure 2. Lactate dehydrogenase (LDH) assay results. LDH titers of cultured corneal epithelial cells exposed to human serum. Y: Significant changes ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test) compared with the control group. hr = hour(s).

이 확인되었다(Fig. 2). LDH 수치는 노출 시간이 증가함에 따라, 그리고 인체 혈청의 농도가 증가함에 따라 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2).

세포외기질 관련 인자 및 성장인자의 변화

각막상피세포는 모든 농도의 인체 혈청에서 노출 후 1시간째부터 PIP와 EGF를 발현하였으며, 높은 농도의 인체 혈청에 노출된 각막상피세포일수록 많은 양의 PIP와 EGF를 발현하였다(Fig. 3A, B). PIP는 인체 혈청 농도의 증가와 이에 대한 노출 시간이 증가함에 따라 지속적으로 증가하였다. Laminin의 경우, 8%와 16% 농도의 인체 혈청에 노출된 각막상피세포에서는 1시간째부터 측정되어 이후에도 지속적으로 확인되었고, 5% 농도의 인체 혈청의 경우 노출

4시간째부터, 3% 농도의 인체혈청의 경우 노출 24시간째에서야 측정되었다(Fig. 3C).

창상 회복

대조군과 3% 농도 인체 혈청의 경우 노출 24시간까지도 유의한 각막 창상의 회복이 관찰되지 않았다. 5% 농도 인체 혈청의 경우 24시간째에서야 임상적으로 유의한 창상 회복이 관찰된 것과 달리, 8%와 16% 농도 인체 혈청의 경우 12시간째부터 유의한 각막 창상 회복이 관찰되어 24시간째까지도 유의한 창상 회복이 지속되었다(Table 1, Fig. 4). 16% 농도의 인체 혈청에 노출된 각막상피세포의 경우 낮은 농도의 인체 혈청에서보다 노출 시간이 증가함에 따라 현저한 각막 창상 회복을 보였다(Fig. 4).

고 찰

안구건조증을 포함한 안구 표면 장애에서 인체 혈청의 효과에 대한 보고는 많다.⁶⁻⁹ 이러한 긍정적 효과는 인체 혈청이 눈물과 유사한 생체 역학을 가지며, 여러 가지 성장인자와 영양인자를 포함하여 각막 표면의 회복을 유도하기 때문이다. 자가 혈청에 포함된 PIP와 laminin 및 EGF, vitamin A, TGF- β , fibronectin 등의 인자들은 각막상피세포의 증식, 분화 및 이주에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포 외기질인 PIP와 laminin은 상피세포의 분화, 성숙, 이동에 관여하며,^{14,15} 성장인자인 EGF는 각막상피세포의 증식을 자극하고 자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁻²³ 반복적인 채혈의 불편함, 인체 혈청 조제를 위한 연구실과 인력의 필요성, 그리고 점안 용기 2차 오염의 가능성 등 인체 혈청의 많은 단점에도 불구하고, 심한 안구건조증을 포함한 다양한 안표면질환에서 인체 혈청은 이미 임상에서 광범위하게 사용되고 있다.⁶⁻⁹ 하지만, 현재까지도 임상적인 사용에 있어 안전한 인체 혈청의 농도는 확립되지 않았으며, 대부분의 인체 혈청에 대한 보고들은 임상 보고 수준에 머물러 있고, 세포를 이용한 안전성 연구는 전무하다. 일부 연구에서는 인체 혈청이 눈물보다 5배 이상 높은 TGF- β 를 함유하기에, 희석 없이 사용할 경우 인체 혈청 내 높은 TGF- β 가 각막상피세포 증식 억제인자로 작용하여 각막 상피 회복을 더디게 할 수 있음을 보고하고, 이에 인체 혈청을 20% 이하로 희석하여 사용할 것을 권고하였다.^{6,13} 이에 본 연구는 20% 이하의 인체 혈청이 배양된 각막상피세포에 미치는 영향을 확인하여 임상에서의 안전한 사용 기반을 마련하고자 하였다.

본 연구의 MTT assay 결과에 따르면 모든 농도의 인체 혈청에서 혈청 노출 4시간째 각막상피세포의 세포 대사 활

성도가 일시적인 감소를 보인 후, 노출 12시간을 지나면서 세포 대사 활성도가 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 또한, LDH assay 결과에서는 인체 혈청에의 노출 시간이 증가하고 농도가 증가함에 따라 각막상피세포 독성이 유의하게 증가하였다. 즉, 인체 혈청의 농도가 증가하고 이에 대한 노출 시간이 증가함에 따라 각막상피세포의 대사 활성도의 저하는 관찰되지 않았으나, 각막상피세포에 대한 독성은 증가하는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 MTT assay와 LDH assay 결과가 일부 불일치하여, 인체 혈청의 농도 및 노출시간이 증가함에 따라 세포 독성은 증가하는 데 반해 세포 대사 활성도는 유지되는 양상을 보였다. MTT assay의 결과는 세포막이 손상되지 않은 세포뿐만 아니라 lysates에 의해서도 영향을 받을 수 있으며, LDH assay의 경우 세포막이 손상된 세포에 의해서만 수치가 증가하기에 이러한 차이가 본 연구의 결과에 일부 영향을 미친 것으로 생각할 수 있다. 이와 관련하여 일부 보고에서는 MTT assay의 부정확성을 제시하며 추가 검사의 필요성을 언급한 바 있으며,²⁴ 본 연구 역시 이를 바탕으로 MTT assay 결과뿐만 아니라 LDH assay를 추가 시행하여 결과를 재확인하였다. LDH assay 역시도 칼슘 이온의 농도에 따라 결과의 차이를 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있으며,²⁵ 본 연구에 사용된 인체 혈청 역시 칼슘을 일부 포함하고 있기에, 인체 혈청의 농도와 그 노출 시간에 따른 칼슘 이온 농도 차이가 LDH assay의 결과에 영향을 미쳤을 가능성 또한 배제할 수 없어 연구의 제한점으로 생각된다. 향후의 연구는 동일 검사 방법에 의한 여러 번 반복하는 것을 넘어 추가적인 세

포 독성 검사법을 이용한 재확인이 필요할 수 있을 것으로 생각된다.

동일한 조건에서 시행된 송아지 혈청을 이용한 연구에서, 8%와 16% 농도의 송아지 혈청의 경우 노출 4시간째부터 유의한 각막상피세포 대사 활성도의 감소가 발생하여 노출시간이 늘어남에 따라 지속적으로 대사 활성도의 감소가 관찰되었다.¹³ 이 결과는 인체 혈청 노출 12시간째부터 세포 대사 활성도의 증가가 관찰된 본 연구의 결과와 차이를 보인다. 또한, 각막상피세포 독성을 나타내는 LDH 수치 증가의 절대값 역시 송아지 혈청을 이용한 기존의 보고에서보다 인체 혈청을 이용한 본 연구가 낮았다.¹³ 비록, 본 연구와 송아지 혈청을 이용한 기존 연구가 동시에 진행되지는 않았으나 동일 저자들에 의해 동일한 실험 조건에서 시행되었다는 것을 가정할 때, 인체 혈청이 송아지 혈청에 비해 세 포 대사 활성도 감소를 초래하지 않았고, 세포 독성은 더 낮은 것을 유추해 볼 수 있다. 하지만, 향후 인체 혈청과 송아지 혈청의 비교 연구가 수행되어야 할 것으로 평가되며, 혈청 구성 성분에 대한 비교 분석이 필수적일 것으로 사료된다. 특히, 혈청 제제의 임상적 사용 농도 결정에 있어 중요한 역할을 하는 TGF- β 의 농도를 비교해 보는 것이 반드시 필요할 것으로 생각된다.

Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP)의 분비는 각막 상피가 손상으로부터 회복하기 위해 각막 상피세포를 이동시키는 데 있어 필수적이다.²⁶ PIP 분비를 억제하는 치료가 각막 상피 세포의 이동과 성장을 저해한다는 발표 또한 이를 뒷받침한다.^{27,28} Laminin은 인체 각막상피세

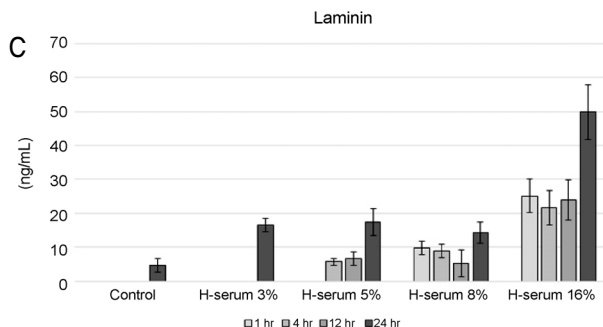
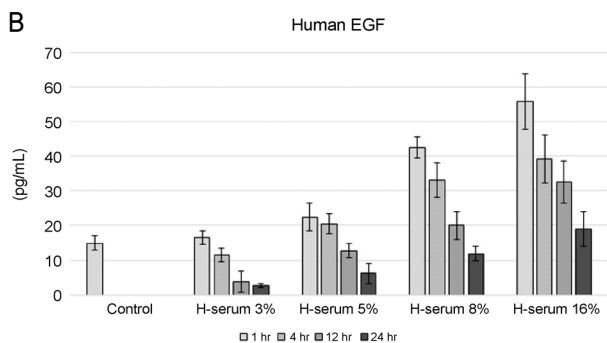
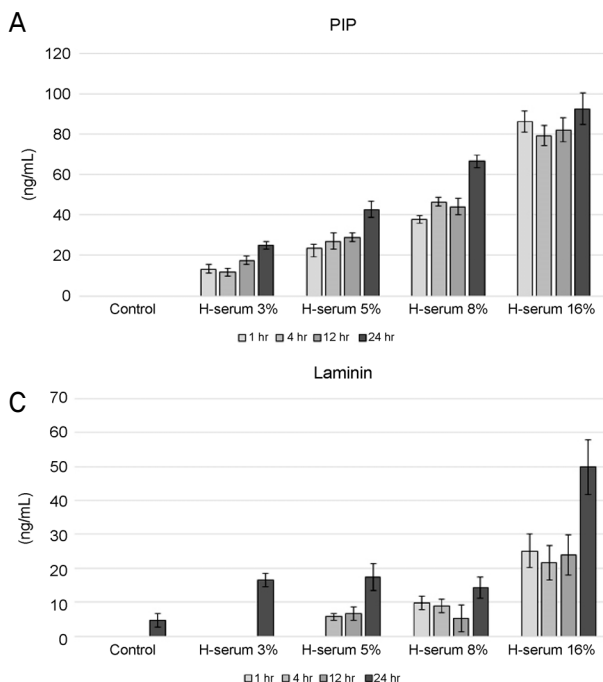


Figure 3. Procollagen type I COOH-terminal peptide (PIP), Laminin, and epidermal growth factor (EGF) titers of cultured corneal epithelial cells exposed to human serum. The PIP (A), EGF (B), and laminin (C) titers increased in time- and dose-dependent manners. hr = hour(s).

Table 1. Comparison of the cell migration assay after exposure to human serum

		Control	H-serum 3%	H-serum 5%	H-serum 8%	H-serum 16%
1 h	Acellular Zone (number of pixels)	19,782 ± 258	21,685 ± 229	19,834 ± 257	23,105 ± 251	16,751 ± 250
12 h	Acellular Zone (number of pixels)	14,660 ± 349	10,915 ± 136	10,927 ± 304	13,126 ± 245	4,315 ± 159
	<i>p</i> -value	0.25	0.06	0.12	0.04	<0.01
24 h	Acellular Zone (number of pixels)	10,465 ± 259	9,014 ± 244	5,547 ± 236	4,315 ± 121	945 ± 111
	<i>p</i> -value	0.06	0.07	0.04	<0.01	<0.01

Acellular Zone: values are mean ± standard deviation. *p*-value: Kruskal-Wallis test (1 h vs. tested h).

h = hour(s).

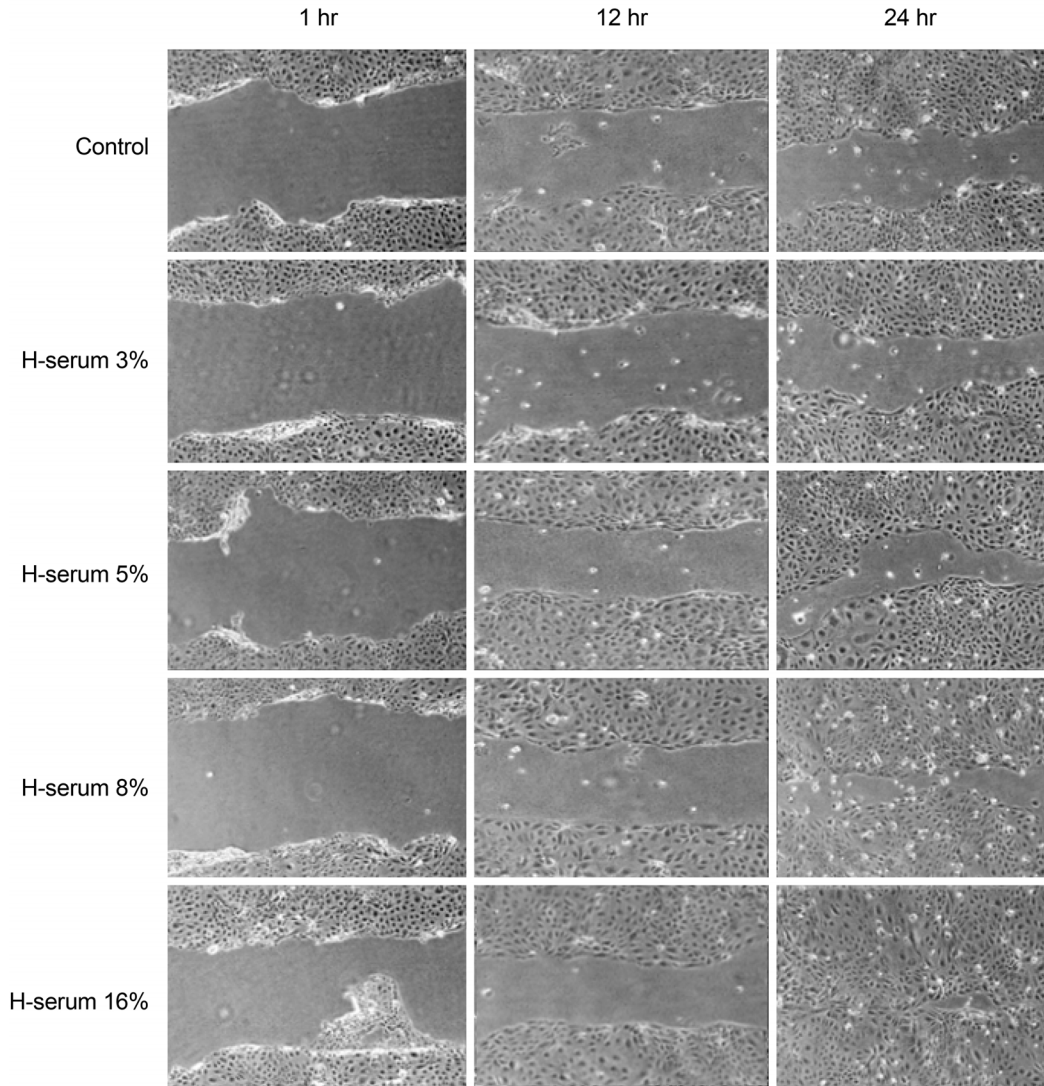


Figure 4. Scratch assay of corneal epithelial cells after exposure to human serum. Cellular migration was observed after 24 hrs of exposure to 5% concentration of human serum and after 12 hrs of exposure to 8% and 16% concentration of human serum. hr = hour(s).

포에서 생산되어 각막 상피 바닥막의 세포외기질로 분비되며, 각막 상피의 바닥막에서 표현되어 anchoring filaments와 함께 국소화된다.^{14,29} 일부 연구는 laminin이 각막상피세포의 부착에 필수적인 요소로 평가하였으며, laminin의 부재는 각막 상피의 안정성을 손상시켜 epidermolysis bullosa

등을 유발할 수 있다고 하였다.^{30,31} 많은 연구에서 EGF의 각막 상처 회복에 있어서의 유용성이 발표된 바 있으며, 이는 EGF가 각막상피세포의 증식을 자극하기 때문으로 밝혀졌다.¹⁸⁻²⁰ 또한, EGF는 각막의 tensile strength 증가에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과에 따르면, 인체

혈청 농도의 증가 및 이에 대한 노출 시간이 증가함에 따라 PIP, laminin, 그리고 EGF 발현의 증가가 관찰되었다. 또한 실제적으로 본 연구의 Scratch wound assay 결과 역시 인체 혈청의 농도가 높아지고 이에 대한 노출시간이 증가할수록 창상 회복이 현저하게 관찰되어 이 결과를 뒷받침하였다. 하지만, 3% 농도의 인체 혈청에 노출된 각막상피세포의 경우 노출 24시간째에서야 소량의 laminin이 측정되었으며, Scratch wound assay에서도 5% 이상 농도의 인체 혈청에서 12시간 이상 노출 시부터 창상 회복이 관찰된 것과 달리 3% 인체 혈청의 경우 노출 24시간까지도 창상 회복이 관찰되지 않았다. 이는 각막 창상 회복은 최소 5% 이상의 인체 혈청 농도에 12시간 이상 노출되어야 함을 유추할 수 있다. 창상 회복 정도와 Laminin을 포함한 세포외기질 관련 인자 및 EGF 수치 변화와의 연관성 파악을 위해서는 더 많은 표본을 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 각막 이식 후 남은 주변 각막 조직에서 데스메막, 각막 내피, 그리고 뒤쪽 각막 실질을 박리하여 세포를 획득 배양하였다.¹⁰ 해당 방식이 각막상피세포를 배양하기 위해 흔히 이용되는 방법 중 하나이지만, 배양된 세포가 실제 각막상피세포인지를 확인하는 과정이 생략되었다는 점이 본 연구의 제한점으로 생각된다. 향후의 연구는 각막상피세포를 특징짓는 것으로 알려진 p63, K3 등³²을 이용한 면역조직화염색 방법을 통해 배양된 세포가 각막상피세포임을 명확히 하는 과정이 추가되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 인체 혈청은 농도가 증가하고 노출 시간이 증가함에 따라 각막상피세포의 대사 활성도 감소를 초래하지는 않지만 세포 독성을 초래할 수 있다. 또한, 각막 창상 회복을 위해서는 최소 5% 이상 농도의 인체 혈청에 12시간 이상 노출이 필요할 것으로 생각된다. 본 연구의 경우 각막상피세포를 장시간 지속적으로 혈청에 노출시킨 후 그 변화를 관찰한 것으로 실제 점안액의 형태로 점안하는 것과 많은 차이를 보일 것으로 평가되며, 혈청 점안 횟수에 따라서도 많은 차이가 있을 것으로 생각되어, 해당 연구의 결과를 임상에 바로 적용하는 것은 무리가 있다 생각된다. 하지만, 본 연구 결과를 통한다면 인체 혈청의 안전한 임상 사용을 위한 농도와 사용 기간을 정하기 위한 기반이 될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bray RC, Leonard CA, Salo PT. Correlation of healing capacity with vascular response in the anterior cruciate and medial collateral ligaments of the rabbit. *J Orthop Res* 2003;21:1118-23.
- 2) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.

- 3) Hwang J, Chung SH, Jeon S, et al. Comparison of clinical efficacies of autologous serum eye drops in patients with primary and secondary Sjögren syndrome. *Cornea* 2014;33:663-7.
- 4) Noble BA, Loh RS, MacLennan S, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004;88:647-52.
- 5) Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-61.
- 6) Kojima T, Higuchi A, Goto E, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases. *Cornea* 2008;27 Suppl 1: S25-30.
- 7) Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004;111:1115-20.
- 8) Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:579-83.
- 9) Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, et al. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 1987;104:494-501.
- 10) Gipson IK, Grill SM. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:269-73.
- 11) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 12) Lee JS, Kim YH, Park YM. The toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory eye drops against human corneal epithelial cells in vitro. *J Korean Med Sci* 2015;30:1856-64.
- 13) Park YM, Kim SJ, Han YS, Lee JS. Cellular toxicity of calf blood extract on human corneal epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res* 2015;40:66-71.
- 14) Timpl R, Rohde H, Robey PG, et al. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979;254:9933-7.
- 15) Kwansa AL, De Vita R, Freeman JW. Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. *Matrix Biol* 2014;34:161-9.
- 16) Couch JM, Cullen P, Casey TA, Fabre JW. Mitotic activity of corneal endothelial cells in organ culture with recombinant human epidermal growth factor. *Ophthalmology* 1987;94:1-6.
- 17) Woost PG, Jumblatt MM, Eiferman RA, Schultz GS. Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell DNA synthesis by defined growth factors. *Cornea* 1992;11:1-10.
- 18) Brightwell JR, Riddle SL, Eiferman RA, et al. Biosynthetic human EGF accelerates healing of Neodecadron-treated primate corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:105-10.
- 19) Petroustos G, Courty J, Guimaraes R, et al. Comparison of the effects of EGF, pFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing. *Curr Eye Res* 1984;3:593-8.
- 20) Ho PC, Davis WH, Elliott JH, Cohen S. Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol* 1974;13:804-9.
- 21) Kruse FE, Tseng SC. A serum-free clonal growth assay for limbal, peripheral, and central corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2086-95.
- 22) Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T. Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci 1987;28:205-11.
- 23) Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-9.
- 24) Jo HY, Kim Y, Park HW, et al. The unreliability of MTT assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. *Exp Neurobiol* 2015;24:235-45.
- 25) Lee CH, Park M, Kang SJ. The Effects of Calcium Nutrition on the Activities of Lactate Dehydrogenase, Alcohol Dehydrogenase and Other Enzymes in Melon (*Cucumis melo* L.) Seedlings Subjected to Flooding. *Korean J Soil Sci Fert* 2016;49:36-43.
- 26) Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, et al. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea* 2002;21(2 Suppl 1):S23-9.
- 27) Handa JT, Murad S, Jaffe GJ. Minoxidil inhibits ocular cell proliferation and lysyl hydroxylase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:567-75.
- 28) Saika S, Yamanaka O, Hashizume N, et al. Cis-hydroxyproline inhibits adhesion, migration and proliferation of cultured rabbit keratocytes. *Ophthalmic Res* 1993;25:363-70.
- 29) Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:199-214.
- 30) Ebihara N, Mizushima H, Miyazaki K, et al. The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2000;71:69-79.
- 31) Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem cells* 2006;24:2346-54.
- 32) Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, et al. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res*. 2004;79:41-9.

= 국문초록 =

인체 혈청이 배양된 인체 각막상피세포에 미치는 영향

목적: 인체 각막상피세포에 대한 인체 혈청의 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인체 각막상피세포를 배양하여 3, 5, 8, 그리고 16% 농도의 인체 혈청에 1, 4, 12, 24시간 동안 접촉시킨 후, 세포 대사 활성도 변화와 세포 독성을 확인하였다. 혈청 노출 후 Procollagen type-I COOH-terminal peptide (PIP), epidermal growth factor (EGF), 그리고 laminin 수치 변화를 측정하였으며, 창상 회복력을 확인하였다.

결과: 각막상피세포 대사 활성도는 인체 혈청의 모든 농도에서 노출 4시간째 일시적으로 감소한 후, 노출 시간이 증가함에 따라 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 노출 시간이 동일할 경우, 대조군과 혈청 노출군 사이 유의한 세포 대사 활성도 차이는 관찰되지 않았다. 세포 독성은 인체 혈청의 농도와 노출 시간이 증가함에 따라 증가하는 양상을 보였다. 5% 농도 인체 혈청의 경우 24시간째, 8%와 16% 농도의 경우 12시간째부터 유의한 각막 창상 회복이 관찰되었다. 높은 농도의 인체 혈청에 노출된 각막상피세포일수록 많은 양의 PIP, EGF, 그리고 laminin을 발현하였다.

결론: 인체 혈청은 농도가 증가하고 노출 시간이 증가함에 따라 각막상피세포의 대사 활성도 감소를 초래하지는 않지만 세포 독성을 초래할 수 있다. 또한 각막 창상 회복을 위해서는 최소 5% 이상 농도의 인체 혈청에 12시간 이상 노출이 필요할 것으로 생각된다. <대한안과학회지 2017;58(12):1333-1340>
