

인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 항섬유화 효과

The Anti-fibrotic Effect of Nilotinib on Tenon's Capsule Fibroblasts *in Vitro*

강정우¹ · 정재훈² · 문남주¹

Jeong Woo Kang, MD¹, Jae Hoon Jeong, MD², Nam Ju Moon, MD, PhD¹

중앙대학교 의과대학 중앙대학교병원 안과학교실¹, 건양대학교 의과대학 안과학교실²

Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Konyang University College of Medicine², Daejeon, Korea

Purpose: To evaluate the anti-fibrotic effects of nilotinib on the survival of cultured human Tenon's capsule fibroblasts (HTFs).

Methods: HTF primary cultures were obtained from samples following glaucoma surgery. Primarily cultured HTFs were exposed to 1, 5, 10, and 20 μ M nilotinib for 24 hours. The effects of nilotinib on HTF proliferation and cell viability were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay, and apoptosis was determined by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide (PI) double staining. Apoptosis-related proteins were detected by western blotting.

Results: The MTT assay showed that nilotinib induced an inhibition of HTF proliferation at concentrations of 10 and 20 μ M ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Annexin V/PI double staining showed significantly increased apoptosis in cells treated with nilotinib. Nilotinib activated caspase-3, -9, and poly adenosine diphosphate ribose polymerase cleavage, and downregulated the expression of B-cell lymphoma-extra large and Bax, which indicated that nilotinib-induced apoptosis was partly mediated through the mitochondrial pathway. In addition, treatment with nilotinib decreased the expression of α -smooth muscle actin and transforming growth factor- β .

Conclusions: Nilotinib decreased cell survival of cultured HTFs and induced mitochondria-mediated apoptosis. The results suggested that nilotinib may exert antiproliferative effects on HTFs, making it a possible agent to control postoperative fibrosis in patients undergoing glaucoma surgery.

J Korean Ophthalmol Soc 2018;59(6):549-555

Keywords: Fibrosis, Glaucoma surgery, Human Tenon's capsule fibroblast, Nilotinib

섬유주절제술 등의 녹내장여과수술은 약물 또는 레이저 치료로 조절되지 않는 녹내장 환자의 안압을 조절하는 데 효과적인 치료방법으로 시행되고 있다. 그러나 녹내장여과 수술은 결막과 결막하 조직의 구조에 손상을 주게 되는데,

이러한 과정은 대식세포, 호중구와 변환성장인자-베타1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1), 인슐린성장인자-1 (insulin-like growth factor 1), 인터루킨-1 (interleukin-1, IL-1), 인터루킨-6 (interleukin-6, IL-6) 등 면역 사이토카인들에 의한 섬유아세포의 자극으로 일어나게 되며,^{1,2} 이는 세포외기질의 분화와 재구성을 유발하는 복잡한 과정에 관여한다. 이때 섬유아세포의 과도한 자극은 세포외기질의 축적을 유발하는데,³ 이로 인한 방수유출로 주위 결막의 과도한 섬유화와 테논낭 여과포의 반흔형성은 녹내장수술의 실패를 야기한다. 이러한 수술 후 섬유화와 반흔형성을 줄이기 위하여 미토마이신 C (mitomycin C, MMC)와 같은 항섬유화제제가 임상적으로 사용되고 있으나, 항섬유화제

■ Received: 2017. 12. 7. ■ Revised: 2018. 3. 12.

■ Accepted: 2018. 6. 4.

■ Address reprint requests to **Nam Ju Moon, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Hospital,
#102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea
Tel: 82-2-6299-1666, Fax: 82-2-825-1666
E-mail: njmoon@cau.ac.kr

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

© 2018 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.

제는 저안압증, 창상부위 누출, 여과포염 등 여러 합병증을 일으킬 수 있어 이를 개선하기 위해 여러 종류의 물질이 연구되고 있다.^{4,10}

2세대 티로신키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor)인 닐로티닙(nilotinib)은 만성골수성백혈병의 치료제로서 미국에서 승인을 받은 표적항암제로 여러 분야의 질환에서 항섬유화 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹⁶ 닐로티닙은 IL-1, IL-6 등의 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 농도조절을 통해 섬유화를 조절하며, TGF- β 1의 농도를 줄여 전섬유화 사이토카인(profibrogenic cytokine)의 신호전달 경로를 조절한다고 알려져 있으나, 닐로티닙이 테논양의 섬유화에 미치는 영향은 연구된 바가 없다.¹²⁻¹⁶ 이 연구는 인체 테논양 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 효과를 평가하기 위하여 진행되었으며, 이를 통해 닐로티닙이 녹내장수술 시 섬유화와 반흔형성을 예방하기 위한 효과적인 보조제로 사용될 수 있는지 확인하고자 하였다.

대상과 방법

인체 테논양 섬유아세포 일차 배양

인체 테논양 섬유아세포는 녹내장수술 도중 3명의 환자로 부터 분리하여 소태아혈청이 첨가된 배지에서 15분간 배양하였으며, 이후 10% (vol/vol)의 소태아혈청, 페니실린(100 units/mL), 스트렙토마이신(streptomycin, 100 units/mL)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium을 배지로 하여 37°C의 5% CO₂ 배양기(Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다. 일차배양세포는 동일한 배지에서 배양을 유지하며 배양율이 80-90%에 이른 경우 계대배양하였으며, 본 연구에는 3회에서 7회까지 계대배양된 세포를 사용하였다.

세포 생존율 분석

배양한 섬유아세포는 96 well plate에 5,000 cell/well이 되도록 분주하였으며, 24시간 뒤 배지판 바닥에 세포가 부착되면 인산염완충용액(phosphate buffer solution, PBS)에 녹인 닐로티닙을 농도별로 첨가하여 최종 농도가 각각 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M 또는 0 μ M (대조군)가 되도록 하여 24시간 배양하였다. 세포생존율은 발색검사의 일종인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 이용하였으며 10 μ L에서 100 μ L의 각각의 well에 PBS에 녹인 5 mg/mL의 MTT를 첨가하여 차광상태로 2시간 배양하였다. 배지에는 100 μ L의 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 분광광도계(Spectramax™ 340PC384

microplate reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 억제율은 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{세포억제율} = (\text{OD}_c - \text{OD}_0) / \text{OD}_c \times 100 (\%)$$

(OD_c: 대조군의 광학밀도[optical density, OD]; OD₀: 닐로티닙 처리군의 광학밀도)

세포자멸사 분석

세포자멸사는 annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (ALX-850-020, Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA)를 이용한 유세포분석을 시행하였다. 세포자멸사 과정에서 포스파티딜세린은 세포의 내부에서 세포막의 외부로 노출되며, Annexin V는 포스파티딜세린에 결합하여 생존세포와 사멸세포를 구별해 낼 수 있도록 한다. 세포막이 파괴된 인체 테논양 섬유아세포는 annexin V, propidium iodide (PI)와 함께 염색되어 검출되며, Annexin V 양성, PI 음성인 세포들은 초기 세포자멸사를, Annexin V 양성, PI 양성인 세포들은 후기 세포자멸사를 의미하며 이는 유세포분석을 통해 정량화 되었다.

6 well plate에서 자란 인체 테논양 섬유아세포의 Triplicate well은 24시간 동안 각각의 농도별 닐로티닙에 노출시켰으며, 트립신으로 처리하여 배지에 다시 녹여 재배양하였다. 일부 세포 현탁액은 트립판블루(trypsin blue)로 염색하여 혈구계로 계측하였으며, 남은 세포들은 저온의 PBS에 재용해시켜 2 \times 10⁶ cells/mL의 농도로 만들고, 동량의 저온 무수에탄올을 넣은 후 20분간 얼음에 고정하였다. 고정된 세포는 원심분리한 후 PBS에 녹였으며, 50 μ g/mL의 PI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 100 μ g/mL의 RNase Type I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)을 각각의 tube에 첨가하였다. 실온의 암실에서 20분간 배양하였으며, 유세포분석기(Navios, Beckman coulter, Miami, FL, USA)로 분석하였고, 실험은 2번 반복 시행하였다.

웨스턴 블롯

단백질 추출용액인 PRO-PREP™ (iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)을 사용하여 배양된 세포로부터 전체 세포단백질을 분리해내었다. 세포용해물들은 12.5%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하였고, wet-blotting 장치(Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 0.3% Tris, 1.4% glycine, 20% methanol이 포함된 완충제에서 100V로 전기영동하여 polyvinylidene fluoride

membrane (PVDF; Merck Millipore, Billerica, MA, USA)로 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 PVDF membrane은 실온에서 1시간 동안 5%의 탈지유가 함유된 PBS로 blocking 처리하였다. Caspase-3, caspase-9, TGF- β , poly ADP ribose polymerase (PARP), Bcl-xL (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Bax (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA), α -smooth muscle actin (α -SMA; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), β -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 대한 1차 항체는 5% 소혈청알부민 (bovine serum albumin)이 함유된 PBS에서 1:1,000으로 희석하였으며, PVDF membrane으로 옮겨 4°C에서 하룻 동안 배양하였다. PBS에 1:2,000으로 희석된 2차 항체는 PVDF membrane에 옮겨 실온에서 1시간 동안 배양하였으며, PVDF membrane은 0.1% Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl)으로 10분씩 4회 세척하였다. 특정 항체의 결합 여부는 ECL Western blotting detection kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)로 가시화하여 확인하였으며, 각각의 band는 β -actin을 기준으로 표준화하였다. 모든 웨스턴 블롯은 각각의 샘플에 대하여 3번 수행되었으며, band intensity는 ImageJ 소프트웨어(<http://imagej.nih.gov/ij/>; provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 정량화하였다.

통계분석

모든 실험은 최소 2번 이상 독립적으로 반복하여 시행하였으며, 결과를 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 Kruskal-Wallis test로 분석하였고, 통계적 유의수준은 0.05로 정하였다.

연구윤리

이 연구는 연구윤리 심의위원회(Institutional review board of Chung-Ang University Hospital)로부터 승인을 받았으며, 모든 과정은 헬싱키선언(Declaration of Helsinki)을 준수하였고 환자로부터 동의서(Informed consent)를 받아 진행하였다.

결 과

인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 효과

인체 테논낭 섬유아세포를 닐로티닙에 노출시킨 후 MTT assay를 통해 분석한 결과 농도의존적 증식억제가 유발되었다. 1, 5, 10, 20 μ M 농도의 닐로티닙에 24시간 노출

시켰을 때 억제율은 대조군과 비교하여 각각 10.29%, 12.46%, 64.55%, 72.45%였다(Fig. 1). 10, 20 μ M 농도로 처리했을 때 세포증식은 유의한 감소를 보였다($p < 0.001$).

인체 테논낭 섬유아세포의 세포자멸사 분석

닐로티닙이 인체 테논낭 섬유아세포에 세포독성반응 혹은 세포자멸사를 일으키는지 평가하기 위하여 Annexin V/PI 이중염색 후 유세포분석을 통해 확인하였다. 유세포 분석 결과 10, 20 μ M 닐로티닙을 처리했을 때 세포자멸사는 각각 31.5%, 69.4%로 증가하였다(Fig. 2).

웨스턴 블롯

닐로티닙에 의해 유도되는 세포자멸사의 기전을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 검사를 통해 닐로티닙을 처리한 인체 테논낭 섬유아세포들의 단백질 농도 변화를 측정하였다. 닐로티닙 처리 후 24시간 뒤 pro-caspase-3와 pro-caspase-9의 부분적인 분열이 확인되었으며(Fig. 3), 이는 닐로티닙이 pro-caspase-3와 pro-caspase-9의 분열을 유발함을 의미한다. Caspase-3의 분열은 10 μ M에서 증가하였으며, 활성화된 caspase-9은 5 μ M에서 유의하게 증가하였다($p < 0.001$, $p = 0.004$, 각각). 또한, 웨스턴 블롯에서 PARP의 분열을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 닐로티닙에 의해 유발된 세포자멸사는 미토콘드리아 경로의 일부로 매개됨을 의미하며, 이를 확인하기 위해 닐로티닙이 처리된 인체 테논낭 섬유아세포에서 Bcl-xL, Bax의 발현을 웨스턴 블롯

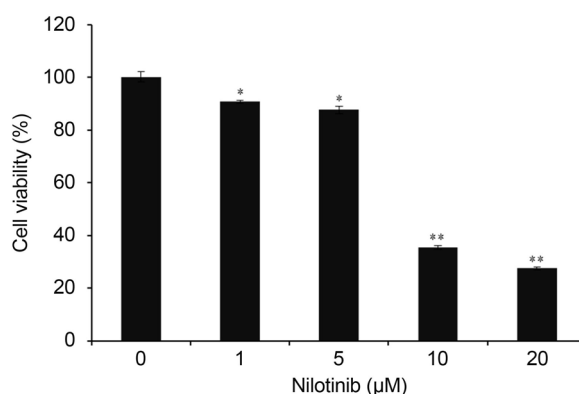


Figure 1. MTT assay of nilotinib-treated human tenon's capsule fibroblasts. Nilotinib decreased cellular viability significantly in a dose-dependent manner. The results represent the means of six independent experiments. MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. * $p < 0.005$ vs. control; ** $p < 0.001$ vs. control (Kruskal-Wallis test with post hoc pairwise comparisons adjusted by the Bonferroni method).

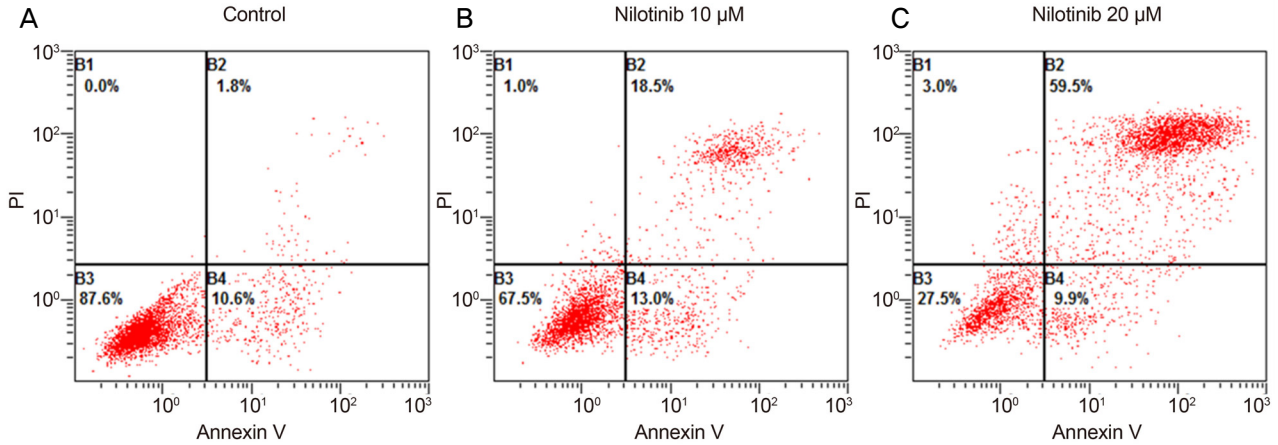


Figure 2. Apoptosis assay of human Tenon's capsule fibroblasts by flow cytometry. Annexin V/ propidium iodide (PI) dual-staining demonstrated significantly increased apoptosis (12.4% [A], 31.5% [B], and 69.4% [C], respectively) in cells treated with nilotinib for 24 hours. Results were confirmed in at least two independent experiments.

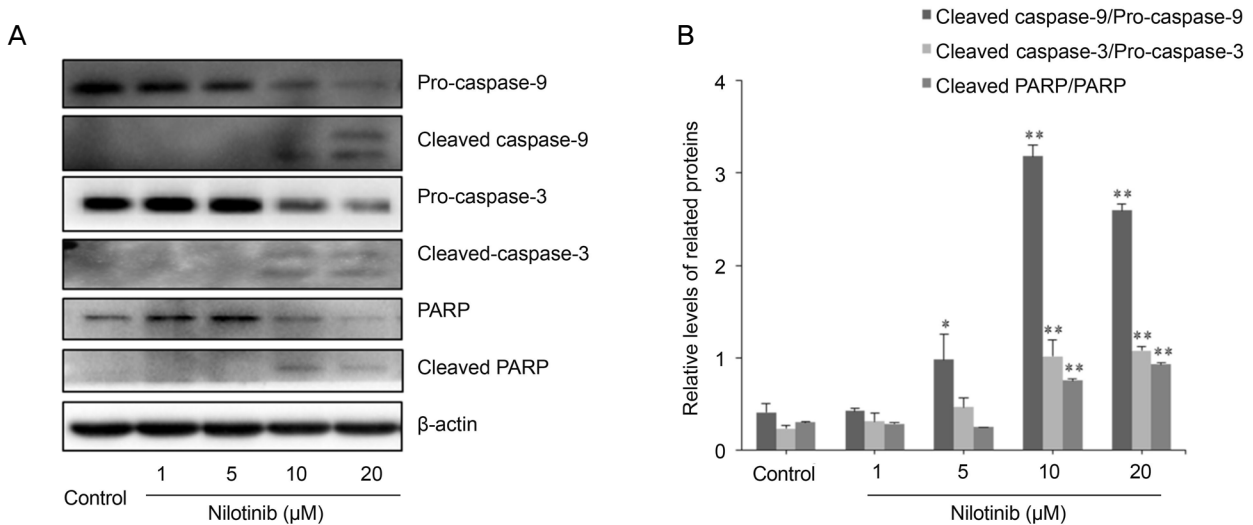


Figure 3. Expression levels of caspase-3, caspase-9, poly ADP ribose polymerase with (24 hours) or without nilotinib determined by Western blot analysis. Western blots (A) and relative band intensity values (B) show that nilotinib induces caspase activation in human Tenon's capsule fibroblasts. β -actin was selected as the loading control. The results represent the means of three independent experiments. ADP = adenosine diphosphate; PARP = poly ADP ribose polymerase. * $p < 0.005$ vs. control; ** $p < 0.001$ vs. control (Kruskal-Wallis test with post hoc pairwise comparisons adjusted by the Bonferroni method).

분석하였다. Bcl-xL과 Bax는 하향조절(downregulation)되었으며(Fig. 4A), 이는 닐로티닙에 의한 세포자멸사가 미토콘드리아 경로를 매개하여 일어남을 추가적으로 뒷받침해 주었다.

대조군과 비교하여, 10 μ M의 닐로티닙을 처리한 군에서 α -smooth muscle actin (α -SMA) 농도가 유의하게 감소한 것을 확인하였으며($p=0.034$), 20 μ M의 닐로티닙을 처리한 군에서 TGF- β 발현이 유의하게 억제되었다($p=0.002$, Fig. 4B).

고 찰

본 연구에서는 배양된 인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 직접적인 증식억제 효과를 확인하였다. 연구결과에 따르면 닐로티닙 처리는 10, 20 μ M에서 모두 대조군과 비교하여 세포 증식의 억제가 나타났고 세포자멸사가 증가되는 것이 확인되었으며, 20 μ M에서 닐로티닙에 의한 TGF- β 의 발현이 억제되었다.

TGF- β 가 섬유화 단계에서 증가조절(upregulated)되며, 닐로티닙 처리가 TGF- β 의 발현을 감소시킨다는 점은 이전

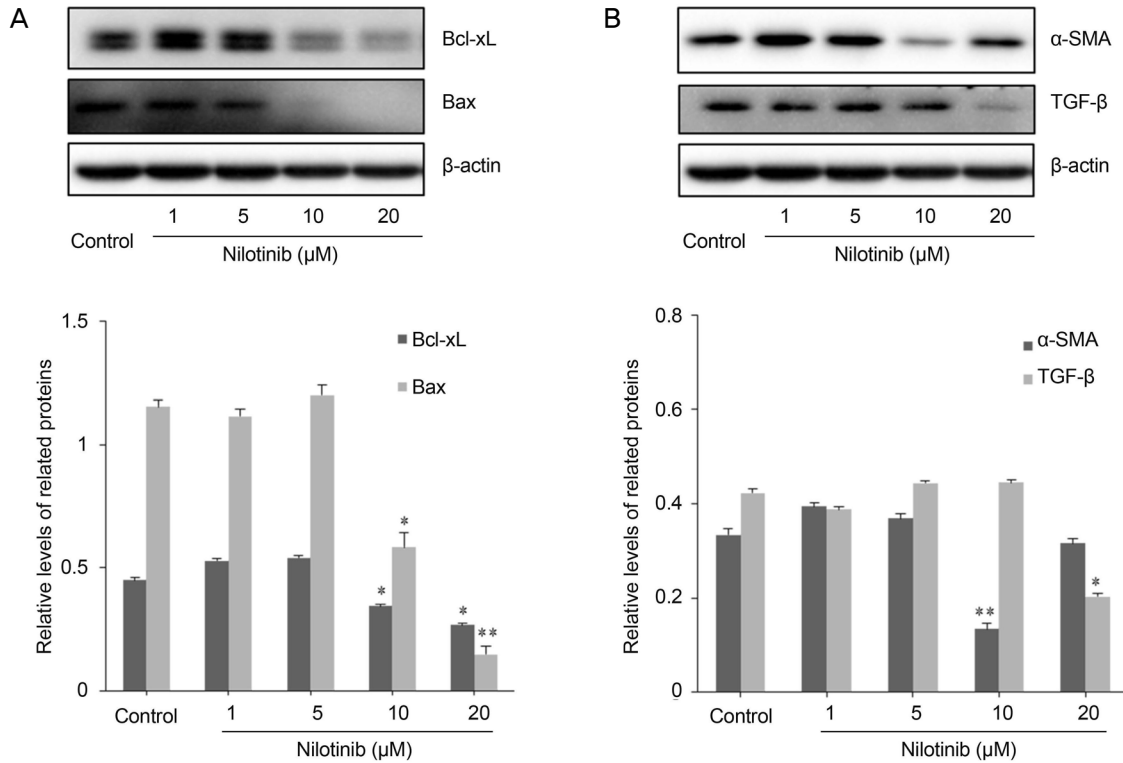


Figure 4. Expression levels of Bcl-xL, Bax, α -smooth muscle actin (α -SMA), TGF- β with (24 hours) or without nilotinib determined by Western blot analysis. (A) Nilotinib treatment resulted in a downregulation of Bcl-xL, Bax. (B) Nilotinib significantly down-regulated expression of α -SMA, TGF- β . β -actin was selected as the loading control. The results represent the means of three independent experiments. Bcl-xL = B-cell lymphoma-extra large; TGF- β = Transforming growth factor beta. * p < 0.005 vs. control; ** p < 0.001 vs. control (Kruskal-Wallis test with post hoc pairwise comparisons adjusted by the Bonferroni method).

에 많은 연구에서 보고되었다.^{12,14,15} TGF- β 의 발현을 조절하는 점은, 닐로티닙이 녹내장수술 후 섬유화와 반흔형성을 줄여주는 항대사물질로서 이용될 수 있음을 의미한다.

대식세포, 혈소판, 섬유아세포에 의해 분비되는 TGF- β 는 결막의 창상회복에서 가장 중요한 전섬유화 사이토카인 중 하나로,^{17,18} 섬유화 매개체들의 발현을 촉진하고 콜라겐형성을 증가시킨다.¹⁹ TGF- β 의 감소는 반흔을 형성하지 않는 화상의 창상회복과정이나 태아의 피부 창상회복과 관련된다.^{20,21} 반면, TGF- β 의 증가는 심장, 간, 신장, 폐, 피부와 골수를 포함한 다양한 장기에서 섬유화의 증가와 연관된다고 보고되었다.^{21,22} 따라서 TGF- β 를 억제하는 것이 녹내장수술 후의 반흔형성을 억제하는 효과적인 수단이 될 수 있으며, 인체 테논낭 섬유아세포는 녹내장수술 후 수술 부위에서 주로 증식하므로 이를 억제하는 것은 수술 후 반흔형성을 억제하는 효과가 있다.

섬유아세포의 근섬유아세포로의 전환분화(transdifferentiation)는 섬유화의 주요 기전으로, 근섬유아세포는 증식, 이주 및 분비능을 가져 창상 회복과 세포의 재배열 과정에서 중요한 역할을 한다.²³ 따라서 본 연구에서는 근섬유아세포 분화를

나타내는 α -SMA의 발현 정도를 측정하였으며,²⁴ 10 μ M 농도의 닐로티닙을 처리하였을 때, 닐로티닙이 α -SMA의 발현을 억제함을 확인하였다. 이러한 결과는 닐로티닙이 rat의 간조직에서 α -SMA의 발현을 감소시킨다는 이전 연구와 일치한다.¹²

본 연구에서 유세포분석을 통해 닐로티닙 처리 시 섬유아세포의 세포자멸사가 증가됨을 확인하였다. 이는 닐로티닙에 의한 섬유아세포 증식의 억제가 세포자멸사로 인한 결과임을 의미한다.

세포자멸사는 일반적으로 내인성, 외인성 경로를 통해 일어나는데, 사멸수용체 경로(death receptor pathway)로 알려진 외인성 경로는 세포막에 위치한 세포 표면-사멸수용체(tumor necrosis factor [TNF] receptor family)의 결합(ligation)으로 세포자멸사가 시작된다.²⁵ 반면, 내인성 경로는 세포자멸사를 일으키는 신호 전달로 인해 촉발되는데, 이러한 신호 전달 경로는 과도한 활성산소의 형성과 함께 The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m)의 파괴, cytochrome c와 세포자멸 유도 인자(apoptosis inducing factor)의 분비를 일으키며, 이러한 일련의 과정은 Caspase의 활성화

화를 통해 세포자멸사를 일으키게 된다(미토콘드리아 매개 경로).²⁶ 세포자멸사와 관련된 단백질(caspase-3, caspase-9)에 대한 웨스턴블롯 분석결과, 인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 항섬유화 효과는 세포자멸사 과정에서 미토콘드리아 경로로 매개됨을 알 수 있다. Bcl-2는 세포자멸사 경로를 조절하는데 주요 역할을 하며,²⁷ Bcl-xL과 Bax는 Bcl-2의 Subfamily로 세포자멸사를 억제하는 단백질로서 작용한다.²⁸ 본 연구에서 닐로티닙 처리가 Bcl-xL, Bax의 발현을 용량 의존적으로 감소시켜 미토콘드리아 매개 경로를 통한 인체 테논낭 섬유아세포의 세포자멸사를 유발함을 확인하였다.

닐로티닙은 만성 골수성 백혈병에서 The Abelson tyrosine kinase (c-ABL)을 저해하는 타이로신 키나아제 표적치료제로 개발되었으며, p38 키나아제의 억제에도 효과적인 것으로 알려져 있다. p38 키나아제의 활성화와 factor NF- κ B의 전사(transcription)는 TGF- β 의 downstream을 활성화시킴으로써 TNF에 의해 유발되는 세포자멸사를 억제하는 역할을 한다.^{29,30} 닐로티닙은 p38 키나아제의 활성을 억제하여 세포자멸사를 유발하며, *in vitro* 실험에서 TGF- β 가 있을 때에도 TNF를 통한 섬유지방전구세포(fibro/adipogenic progenitors)의 세포자멸사를 유도함이 확인되었다.¹⁴ 이처럼, 이전 연구들에서 닐로티닙은 TGF- β 의 농도를 낮추고, p38 키나아제의 활성을 포함한 TGF- β 신호 전달 경로를 억제하여 항섬유화 작용을 나타내는 것으로 알려져 왔는데, 본 연구에서는 닐로티닙이 미토콘드리아 매개 경로를 통하여 인체 테논낭 섬유아세포의 세포자멸사를 유도함을 확인하였다. 이러한 기전은 상호배타적인 관계가 아니며 여러 기전이 복합적으로 작용하여 닐로티닙의 항섬유화 작용이 나타나는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구는 녹내장수술 이후 반흔형성을 억제하는 항섬유화제제를 찾기 위해 수행되었다. 배양된 인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 항증식효과를 확인하였으며, 이러한 과정이 미토콘드리아 매개 세포자멸사 경로를 통해 이루어진다는 것을 확인하였다. 본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 우선, *in vitro* 실험은 항섬유화 효과와 독성을 평가하기에는 부적절하여 임상적으로 적용하기가 어렵고, 농도와 치료 방법이 실제 임상과 차이가 있다. 또한 본 연구에서 10 μ M의 닐로티닙을 처리한 군에서 α -SMA의 발현이 억제된 것에 반해 20 μ M의 닐로티닙을 처리했을 때에는 α -SMA의 발현이 유의미한 감소를 보이지 않았는데, 이는 실험 수행에서의 오류 혹은 실험 반복 횟수가 적어 통계적으로 유의미한 결과를 보이지 않은 것으로 생각할 수 있으며, 특정 농도이상의 닐로티닙이 오히려 α -SMA 발현을 감소시키지 않을 가능성도 있으므로 추가적

인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 섬유아세포 이외의 다른 정상세포에 대한 닐로티닙의 세포독성을 평가하는 실험이 수행되지 않았는데, 실제임상에서의 적용을 위해서는 항섬유화 효과를 나타내면서 세포독성을 일으키지 않는 최대농도에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 또한 5-Fluorouracil, MMC나 트리암시놀론과 같은 다른 제제들과 그 효과를 비교해 보는 연구가 필요할 것이다. 결론적으로 녹내장수술 후 반흔형성을 조절하는 데 닐로티닙이 추후 효과적인 항섬유화 제제로 사용될 가능성이 있을 것으로 생각되며, 본 연구가 닐로티닙의 항섬유화 기전을 이해하는 데 도움을 줄 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Eren K, Turgut B, Akin MM, Demir T. The suppression of wound healing response with sirolimus and sunitinib following experimental trabeculectomy in a rabbit model. *Curr Eye Res* 2016;41:367-76.
- 2) Xue H, McCauley RL, Zhang W, Martini DK. Altered interleukin-6 expression in fibroblasts from hypertrophic burn scars. *J Burn Care Rehabil* 2000;21:142-6.
- 3) Nakamura-Shibasaki M, Ko J, Takenaka J, et al. Matrix metalloproteinase and cytokine expression in Tenon fibroblasts during scar formation after glaucoma filtration or implant surgery in rats. *Cell Biochem Funct* 2013;31:482-8.
- 4) de Carvalho LE, Alves MR, da Silva MA, Gaal Vadas MF. Experimental strabismus surgery using triamcinolone: outcomes and effects on inflammatory response. *Arq Bras Oftalmol* 2007;70:209-15.
- 5) Demirel S, Atilla H, Okcu Heper A, Erkam N. Effects of amniotic membrane on wound healing and adhesions in experimental strabismus surgery. *Eur J Ophthalmol* 2009;19:899-904.
- 6) Frangouli O, Adams GG. The use of amniotic membrane for the management of fibrosis in complex strabismus surgery. *Strabismus* 2013;21:13-22.
- 7) Jung KI, Choi JS, Kim HK, Shin SY. Effects of an anti-transforming growth factor-beta agent (pirfenidone) on strabismus surgery in rabbits. *Curr Eye Res* 2012;37:770-6.
- 8) Minguini N, Monteiro de Carvalho KM, Akaishi PM, De Luca IM. Histologic effect of mitomycin C on strabismus surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3399-401.
- 9) Mora JS, Sprunger DT, Helveston EM, Evan AP. Intraoperative sponge 5-fluorouracil to reduce postoperative scarring in strabismus surgery. *J AAPOS* 1997;1:92-7.
- 10) Ozkan SB, Kir E, Culhaci N, Dayanir V. The effect of Seprafilm on adhesions in strabismus surgery-an experimental study. *J AAPOS* 2004;8:46-9.
- 11) Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007;110:3540-6.
- 12) Shiha GE, Abu-Elsaad NM, Zalata KR, Ibrahim TM. Tracking an-

- ti-fibrotic pathways of nilotinib and imatinib in experimentally induced liver fibrosis: an insight. Clin Exp Pharmacol Physiol 2014;41:788-97.
- 13) Gordon JK, Martyanov V, Magro C, et al. Nilotinib (Tasigna(TM)) in the treatment of early diffuse systemic sclerosis: an open-label, pilot clinical trial. Arthritis Res Ther 2015;17:213.
 - 14) Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. Nat Med 2015;21:786-94.
 - 15) Rhee CK, Lee SH, Yoon HK, et al. Effect of nilotinib on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. Respiration 2011;82:273-87.
 - 16) Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, et al. Inhibition of PDGF, TGF-beta, and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. J Hepatol 2011;55:612-25.
 - 17) Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:6020-4.
 - 18) Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. J Biol Chem 1983;258:7155-60.
 - 19) Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. Prog Retin Eye Res 2000;19:113-29.
 - 20) Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, et al. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. J Pediatr Surg 1995;30:198-202; discussion 202-3.
 - 21) Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. Lancet 1992;339:213-4.
 - 22) Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev 2003;83:835-70.
 - 23) Conte E, Gili E, Fagone E, et al. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF-beta-induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. Eur J Pharm Sci 2014;58:13-9.
 - 24) Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell 2001;12:2730-41.
 - 25) Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-65.
 - 26) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999;397:441-6.
 - 27) Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer 2002;2:647-56.
 - 28) Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. Science 2007;315:856-9.
 - 29) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF-kappaB anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 1998;281:1680-3.
 - 30) Bergmann MW, Loser P, Dietz R, von Harsdorf R. Effect of NF-kappa B Inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2001;33:1223-32.

= 국문초록 =

인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 항섬유화 효과

목적: 본 연구에서는 인체 테논낭 섬유아세포에 대한 닐로티닙의 항섬유화 효과를 확인하고자 하였다.

대상과 방법: 녹내장수술 도중 채취하여 일차배양한 인체 테논낭 섬유아세포를 1, 5, 10, 20 μM 농도의 닐로티닙에 24시간 동안 노출시켰다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 세포의 생존 정도를 측정하였고, annexin V/propidium iodide (PI) 이중염색 후 유세포분석을 시행하여 세포자멸사 정도를 확인하였다. 이후 세포자멸사 관련 단백질을 웨스턴블롯 분석 방법으로 정량적으로 평가하였다.

결과: MTT assay 결과, 닐로티닙은 10, 20 μM의 농도에서 인체 테논낭 섬유아세포에 대한 항증식 효과를 보였다($p < 0.001$, $p < 0.001$, 각각). Annexin V/PI 이중염색 후 시행한 유세포분석상 닐로티닙은 세포자멸사를 증가시켰다. 또한 닐로티닙은 caspase-3, -9, poly adenosine diphosphate ribose polymerase의 분열을 활성화시켰으며, B-cell lymphoma-extra large, Bax 발현을 억제하였다. 이는 닐로티닙에 의해 유도되는 세포 자멸사가 미토콘드리아 경로를 통해 매개된다는 것을 의미한다. 닐로티닙은 α-smooth muscle actin, transforming growth factor beta의 발현 역시 감소시켰다.

결론: 본 연구를 통해 닐로티닙은 인체 테논낭 섬유아세포의 세포 생존을 저하시키며, 미토콘드리아 경로 매개 세포자멸사를 유도하는 것을 확인하였다. 본 연구의 결과를 토대로, 녹내장수술 후 발생하는 섬유화 문제의 해결책으로서 닐로티닙이 사용될 수 있을 것이라 기대된다.

〈대한안과학회지 2018;59(6):549-555〉