

## 제품화된 무방부제 힐론 점안제가 각막상피세포에 미치는 영향

### Effect of Preservative-Free Healon Eye Drop on Human Corneal Epithelial Cell in Vitro

김호윤<sup>1</sup> · 박영민<sup>2</sup> · 이종수<sup>1,3</sup>

Ho Yun Kim, MD<sup>1</sup>, Young Min Park, MD<sup>2</sup>, Jong Soo Lee, MD, PhD<sup>1,3</sup>

부산대학교병원 안과<sup>1</sup>, 양산부산대학교병원 안과<sup>2</sup>, 부산대학교 의학전문대학원 안과학교실<sup>3</sup>

*Department of Ophthalmology, Pusan National University Hospital<sup>1</sup>, Busan, Korea*

*Department of Ophthalmology, Pusan National University Yangsan Hospital<sup>2</sup>, Yangsan, Korea*

*Department of Ophthalmology, Pusan National University School of Medicine<sup>3</sup>, Busan, Korea*

**Purpose:** To investigate the biologic effects of preservative-free artificial tear drops on cultured human corneal epithelial cells in vitro.

**Methods:** The effects of preservative-free artificial tear drops (sodium hyaluronate 0.1% (Kynex<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), sodium hyaluronate 0.18% (Kynex2<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), and sodium hyaluronate 0.3% (Hyaluni eye drops 0.3%<sup>®</sup>, Taejoon, Seoul, Korea)) on human corneal epithelial cells were evaluated. Cellular proliferation was determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and Ki-67 assays. Cellular migration was determined using CD44 and scratch wound assays. Cell damage was determined using the lactate dehydrogenase (LDH) assay and cellular morphologies using electronic microscopy and inverted microscopy.

**Results:** Proliferation of corneal epithelial cells, as determined by the MTT and Ki-67 assays, was not significantly different between the different eye drops ( $p > 0.05$ ). The measured value of cellular migration after exposure of the sodium hyaluronate 0.3%, as determined by mean CD44 percentage and scratch wound assay, was higher than that of the sodium hyaluronate 0.1% and sodium hyaluronate 0.18%, but the CD44 value was not significantly different ( $p > 0.05$ ). The LDH titer tended to increase as the concentration of sodium hyaluronate increased ( $p > 0.05$ ), but influence on cytoplasm, as determined by electronic microscopy, was not different.

**Conclusions:** Among 3 preservative-free artificial tear drops, sodium hyaluronate 0.3% demonstrated increased migration of corneal epithelial cells. As the concentration of sodium hyaluronate in eye drops increased, the corneal cytotoxicity of corneal epithelial cells also increased. However, there was no significant difference among the 3 tear drops.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(11):1698-1705

**Key Words:** Artificial tear, Cornea, Epithelial cell, Hyaluronic acid

2007년 Dry Eye Workshop (DEWS)<sup>1</sup>에서는 건성안 분류

■ Received: 2014. 3. 14.      ■ Revised: 2014. 3. 24.

■ Accepted: 2014. 10. 27.

■ Address reprint requests to Jong Soo Lee, MD, PhD  
Department of Ophthalmology, Pusan National University  
Hospital, #179 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 602-739, Korea  
Tel: 82-51-240-7321, Fax: 82-51-242-7341  
E-mail: jongsool@pusan.ac.kr

법상 1단계부터 인공누액의 사용을 권장하고 있다. 흔히 사용되는 히알루론산나트륨(sodium hyaluronate)은 세포외 기질에 존재하는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 성장, 상처회복, 염증반응에 중요한 역할을 하며, 각막 상피 세포를 보호하기 위하여 안구건조증 환자에서 많이 사용되고 있다.<sup>2,3</sup> 히알루론산나트륨의 작용은 점탄성에 의한 물리적인 각막상피세포 보호작용뿐만 아니라 상처치유에 관계

되어, 각막상피세포 증식을 자극하며, 히알루론산나트륨 수용체의 경우는 활발한 세포 증식이 이루어지는 동안 각막상피세포에서 더 많이 발현된다.<sup>4,5</sup>

다양한 연구에서 히알루론산나트륨이 각막상피세포 회복을 촉진한다고 보고하고 있지만,<sup>2,3</sup> 각자 다른 전해질, 무기질 등을 포함하고 있는 제품화된 히알루론산나트륨 안약의 농도에 따른 직접적인 실험연구는 없었다. 따라서 본 연구는 현재 시판 중인 히알루론산나트륨을 주성분으로 하는 보존제가 없는 인공누액 3종류 sodium hyaluronate 0.1% (카이닉스<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), sodium hyaluronate 0.18% (카이닉스2<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), sodium hyaluronate 0.3% (히알유니점안액<sup>®</sup>, Taejoon, Seoul, Korea)를 이용하여 약제 간에 노출시간에 따른 각막상피세포의 이주 및 증식에 미치는 영향과 세포독성에 대해 비교해 보고자 하였다.

## 대상과 방법

### 세포배양과 처리

각막이식 이후 남은 주변부 각막조직을 이용하여 endo-thelium-free explant method로 계대배양시켰다. 각막상피와 실질을  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 가 함유되지 않은 1 unit/mL Dispase II (Boehringer, Mannheim, Germany)에 담겨서 37°C 배양기에서 1시간 동안 처리하여 각막상피세포를 분리한 다음 5분간 1,000분당 회전수(revolutions per minute, rpm)로 원심분리하였다. 세포침전물을 배양액으로 부유시켜 세포를 모은 후 35 mm 크기의 조직배양접시(Corning Incorporated, Corning, NY)로 옮겨 95% air-5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 37°C 배양기에서 일차배양하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Rockville, MD)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Rockville, MD), 20 ng/mL epidermal growth factor (Gibco BRL, Rockville, MD), 100 units/mL penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD) 및 100 µg/mg streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD)을 첨가한 세포배양액을 2-3일간격으로 교체하여 세포가 합류(confluent growth)되었을 때 배양배지를 완전히 제거한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco BRL, Rockville, MD)으로 1회 세척하고 0.25% trypsin-0.002% EDTA를 처리하여 세포를 분리하였다. 세포가 배양접시에서 완전히 이탈되면, 새로운 조직배양접시에 분리된 세포가 포함된 배양액을 약 1 cc 넣고 신선한 배양액을 약 2 cc 첨가시켜 세포를 재배양시켰다. Coulter counter로 세포수를 측정하여 배양액에 각막상피세포  $5 \times 10^3$  cell/mL이 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate에 200 µL씩 심은 후 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air의 배양기에서 다시 배양시켰고, 이때 세포수가 너무 짙을 경우 각 약물에 의

한 영향이 적을 수 있으므로 배지에서 각막상피세포가 80-90% 정도 성장할 때까지 4-5일 정도 배양시켰다.

### 약제의 농도 및 노출시간에 따른 세포의 증식력 측정

#### MIT 분석법

세포의 증식력을 측정하기 위해 calorimetric assay를 이용하여 세포 내에 존재하는 formazan 화합물의 흡광도를 측정하여 세포 증식억제력을 비교하였다.

Subconfluence에 도달한 cell을 D-PBS로 1회 세척한 후 50%로 희석시킨 무방부제 인공누액 3가지 및 대조군으로 평형염액(balanced salt solution, BSS)을 1, 3, 6, 12, 24, 36시간 동안 각막상피세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척한 다음 배지에 넣어 주었다. 약물처리 후 24시간 정도 세포 배양기에 넣어 배양한 다음 MTT assay를 실시하였다. 세포의 흡광도를 측정하기 위해 5 mg의 MTT solution을 PBS 1 mL에 녹인 후 0.2 µL syringe filter로 거른 다음 DMEM 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 상층의 배양액을 140 µL 정도 제거한 후 MTT solution을 100 µL 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 가린 후 37°C에서 4시간 반응시켰다. 다시 상층액을 110 µL 제거한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma, Cat. D-5869, St. Louis, MO)를 100 µL 넣어 실온에서 20분간 흔들어 혼합시키고 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 약제별 노출 시간에 따른 측정된 흡광도를 이용하여 각 세포의 생존율을 구하였다. 세포 생존율은 각 칸의 흡광도 수치를 대조군 칸의 흡광도 수치로 나눈 백분율 즉, 세포의 생존율(%) = 각 칸의 흡광도 / 대조군 칸의 흡광도  $\times 100$ 으로 나타냈었다.

#### Ki-67 검사법

세포 증식은 G0기가 아닌 G1-M기의 증식하는 인간 세포에 존재하는 핵 항체 Ki67에 반응하는 monoclonal antibody를 이용하여 측정하였다. Subconfluence에 도달한 cell을 D-PBS로 1회 세척한 후 무방부제 인공누액 3가지 및 대조군으로 평형염액을 1, 3, 6, 12, 24, 36시간 동안 각막상피세포와 접촉시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척하였다. Ki67검사에서 희석된 용액을 이용하여 실험한 결과 결과치가 미미하게 관찰되어 원액을 이용하여 실험을 진행하였다. 배양액은 0.02% trypsin/EDTA를 이용하여 해리시킨 후 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리시켜 세포를 대상으로 binding buffer 200 µL 넣고 씻은 후 다시 5분간 4°C에서 12,000 rpm으로 원심분리시킨다. 1:20으로 희석된 FITC mouse anti-human Ki67 (BD biosciences, california, USA)을 넣고 암실에서 20

분간 배양 후 CYTOMICSFC500<sup>®</sup>×(BECKMAN COULTER, USA)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

각 약제별 노출 시간에 따른 측정된 유세포 분석을 통해 각 상태 세포수를 구하였다. 상태 세포수는 농도에 따른 각 세포수를 대조군의 세포수로 나눈 백분율 즉, 상태 세포수(%)=각 세포수/대조군의 세포수×100으로 나타내었다.

약제의 농도 및 노출시간에 따른 각막상피세포의 상피 세포 이주력

#### CD44 검사법

상피세포의 이주력을 측정하기 위하여 CD44의 발현율을 이용하였으며, CD44의 발현은 CD44 수용체에 유도된 항체를 사용하여 측정하였다. Ki67 검사법과 동일하게 실험을 진행하였으며, 1:100으로 희석된 FITC mouse anti-human CD44 (BD biosciences, california, USA)를 넣고 암실에서 20 분간 배양 후 CYTOMICSFC500<sup>®</sup>×(BECKMAN COULTER, USA)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

각 약제별 노출 시간에 따른 측정된 유세포 분석을 통하여 각 상태 세포수를 구하는데, 방법은 Ki-67 검사법과 같은 요령으로 시행하였다.

#### Scratch wound assay

인공누액에 노출 시 세포의 창상 회복 정도를 관찰하기 위해서 배양액에 각막상피세포를 각각  $5 \times 10^3$  cell/well이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500  $\mu$ L씩 심은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air의 배양기에서 4-5일 정도 배양하였다. Subconfluence에 도달한 배지에 100  $\mu$ L 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 낸 후, 상층의 배지를 제거하고, 3가지 인공누액 및 대조군으로 평형염액을 접촉시킨 후 역상 광학 현미경(Inverted phase-contrast light microscope)으로 24, 48시간 후 세포가 스크래치 모서리 부분으로 자라 들어오는 정도를 관찰하였다.

약제의 농도 및 노출시간에 따른 약제 독성 비교

#### 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH) 분석법

50%로 희석된 무방부제 인공누액 3가지 및 대조군으로 평형염액을 96 well 배지의 전체 양 200  $\mu$ L에서 100% 농도가 되도록 배지액에 넣은 후 각각 1, 3, 6, 12, 24, 36시간 동안 접촉시켰다. 약물에 노출된 후 세포질에서 유리된 LDH의 양을 37°C 온도의 암순응상태에서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였고, 대조군으로는 평형염액(BSS)을 처리하여 490 nm의 파장에서 각각의 파장을 측정하여 노출시간에 따른 농도의 차이를 비교하였다.

각 약제별 노출 시간에 따른 젖산탈수소효소(LDH)의 역가를 구하였으며 LDH 누출률은 각 약제의 LDH 역가를 대조군의 LDH 역가로 나눈 백분율 즉, LDH 누출률(%)=각 약제의 LDH 역가/대조군의 LDH 역가×100으로 나타내었다.

#### 세포의 형태학적 변화

약제에 따른 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해서 세 가지 약제 및 대조군으로 평형염액을 24시간 노출 후 전자현미경 및 도립위상차현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 방법은 배양액에 각막상피세포가  $5 \times 10^3$  cell/mL이 되도록 부유시킨 다음 6 well plate에 500  $\mu$ L씩 seeding한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% air의 배양기에서 4-5일 정도 배양하였다. 배지에서 성장한 세포를 세 가지 약제에 24시간 노출시킨 후 다시 D-PBS로 1회 세척하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색시켜 투과전자현미경(JEOL 1200EX, Tokyo, Japan)으로 세포의 미세구조를 관찰하였으며 도립위상차현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다.

#### 통계학적 분석

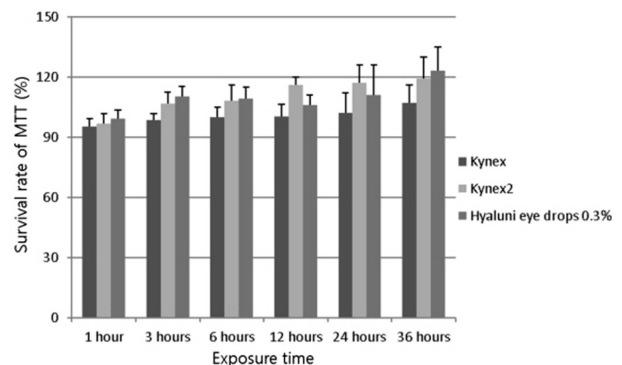
각 실험 과정들을 3회 반복하여 시행하였고, 약제 간의 통계학적 유의성을 비교를 위해 Kruskal-Wallis test를 시행하였으며 통계학적 신뢰도를 95%로 정하였다.

## 결 과

#### 각막상피세포 증식력 비교

#### MTT 분석법을 이용한 세포 증식력 비교

세 약제 간 농도에 따른 MTT 결과치의 유의한 차이는 발



**Figure 1.** The mean survival rate of corneal epithelial cell showed 3 preservative free sodium hyalunate eye drops - among kynex<sup>®</sup>, kynex2<sup>®</sup>, hyaluni eye drops 0.3%<sup>®</sup>. The survival rate tended to increase with higher concentrations of sodium hyaluronate and longer epithelial cells exposure to eye drops, but the values were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

견되지 않았고( $p>0.05$ ), 세 약제 모두 시간이 지날수록 유의하지는 않지만 MTT 결과치의 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

#### Ki67측정을 통한 세포 증식력 비교

히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스 2®, 카이닉스® 순으로 높게 측정되었으나, 세 약제 간 통계학적 유의성은 없었다( $p>0.05$ , Fig. 2).

#### 각막상피세포 이주능력

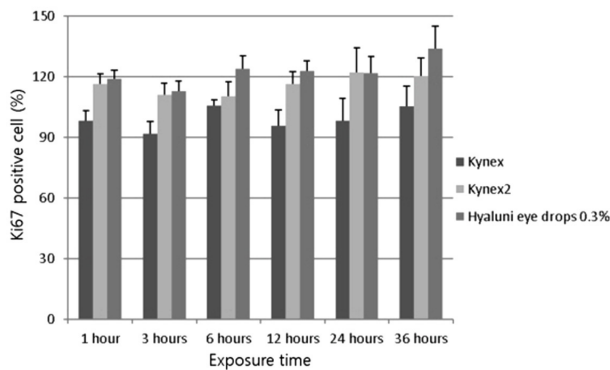
#### CD44 측정을 통한 세포 이주력 측정

CD44 발현율을 측정한 결과 유의한 차이는 없으나 히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스2®, 카이닉스® 순으로 발현되

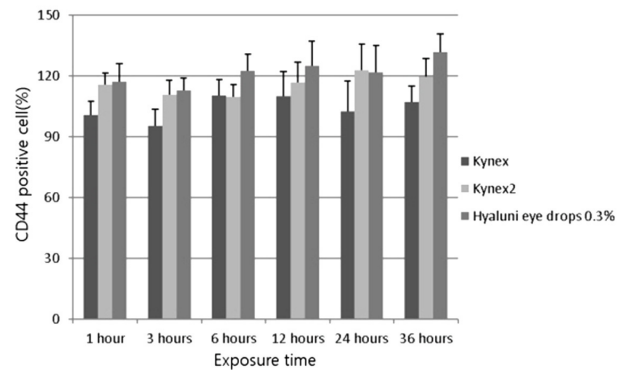
었다( $p>0.05$ ). 각 약제별 노출시간에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

#### 약제의 농도 및 노출시간에 따른 Scratch wound assay 결과

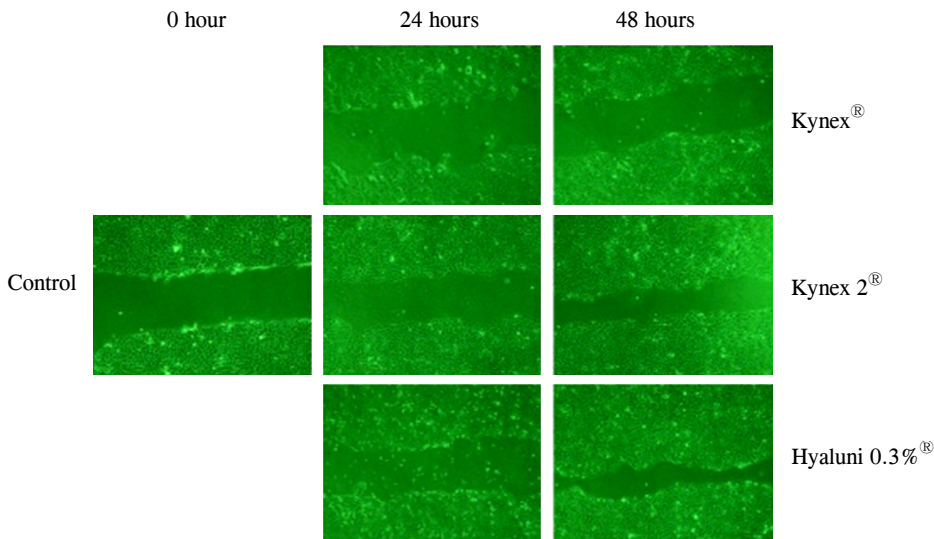
24시간 동안 약제에 노출한 경우 카이닉스®, 카이닉스2®, 히알유니점안액 0.3%® 모두에서 각막상피세포가 창상부위로 이주, 증식하여 창상회복이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 노출 48시간째 각막상피세포가 자라 들어오는 정도는 유의하지는 않지만 히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스2®, 카이닉스® 순으로 세포의 이주가 일어나 창상 크기의 감소가 관찰되었다(Fig. 4).



**Figure 2.** The graph show the mean percentage of Ki67 positive human corneal epithelial cells in the 3 preservative free sodium hyalunate eye drops - among kynex®, kynex2®, hyaluni eye drops 0.3%®. The percentage of Ki67 positive human corneal epithelial cells tended to increase with higher concentration of sodium hyaluronate, but the values were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3.** This graph show the mean percentage of CD44 positive human corneal epithelial cells in 3 preservative free sodium hyalunate eye drops - among kynex®, kynex2®, hyaluni eye drops 0.3%®. The percentage of CD44 positive human corneal epithelial cells tended to increase with higher concentration of sodium hyaluronate was, but the values were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).



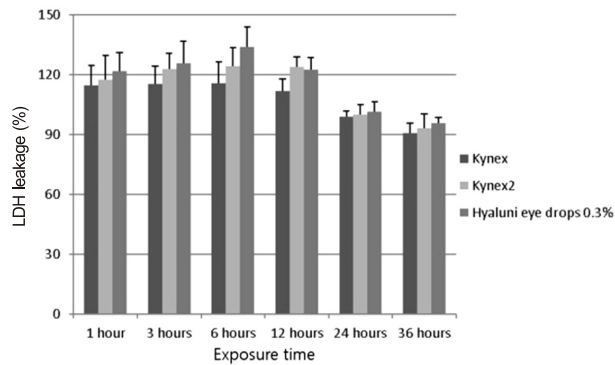
**Figure 4.** This show that scratch wound assay of the corneal epithelial cells after 24 hours and 48 hours exposure to control, kynex®, kynex2®, hyaluni eye drops 0.3%®. Corneal epithelial cells were proliferated and moved into collagenous membrane in media. Hyaluni 0.3%® showed most prominent cellular migration activity than other eye drops.



## 각막상피세포의 독성비교

### 약제별 및 노출 시간에 따른 LDH assay

LDH 분석법을 이용하여 LDH 누출률을 측정한 결과에서 통계학적 유의성은 없으나 모든 노출 시간대에서 히알유니 점안액 0.3%®, 카이넥스2®, 카이넥스® 순으로 높은 LDH 누출률을 보였다( $p>0.05$ ). 세 약제 모두 노출 초기부터 LDH 누출률이 증가하여 6시간에 최고치를 나타낸 이후 점차 감소하는 양상을 보였으며, 24시간 이후 100 이하로 떨어져



**Figure 5.** The lactate dehydrogenase (LDH) leakage was increased as concentration of sodium hyaluronate increased with exposure time, but the values were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The LDH leakage tended to increase after all sodium hyaluronate eye drops were exposed up to 6 hours and decrease after 24 and 36 hours later.

대조군에 비해 낮은 LDH titer를 나타내었다(Fig. 5).

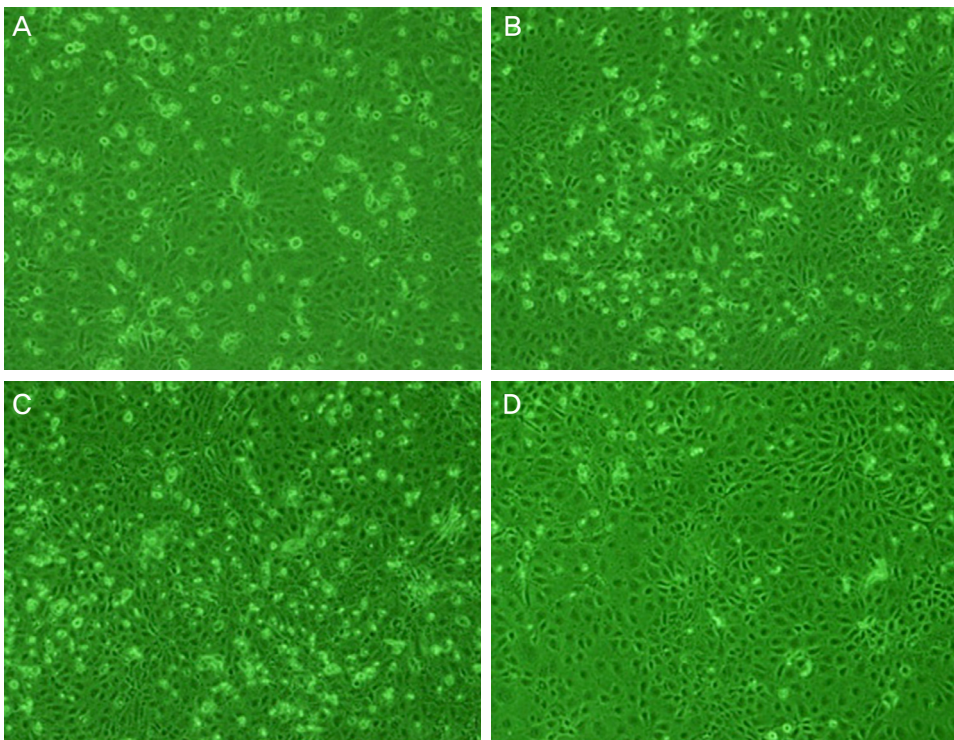
### 약제에 따른 세포의 형태학적 변화

대조군 및 각 약제에 24시간 노출된 이후 도립위상차현미경에 의한 세포의 형태 소견은 각막상피세포가 배지에 뽀뽀하게 분포하고 있는 대조군에 비해 약제의 농도가 높아질수록 세포의 손상으로 배지에서 이탈되는 세포수가 많이 관찰되었다(Fig. 6).

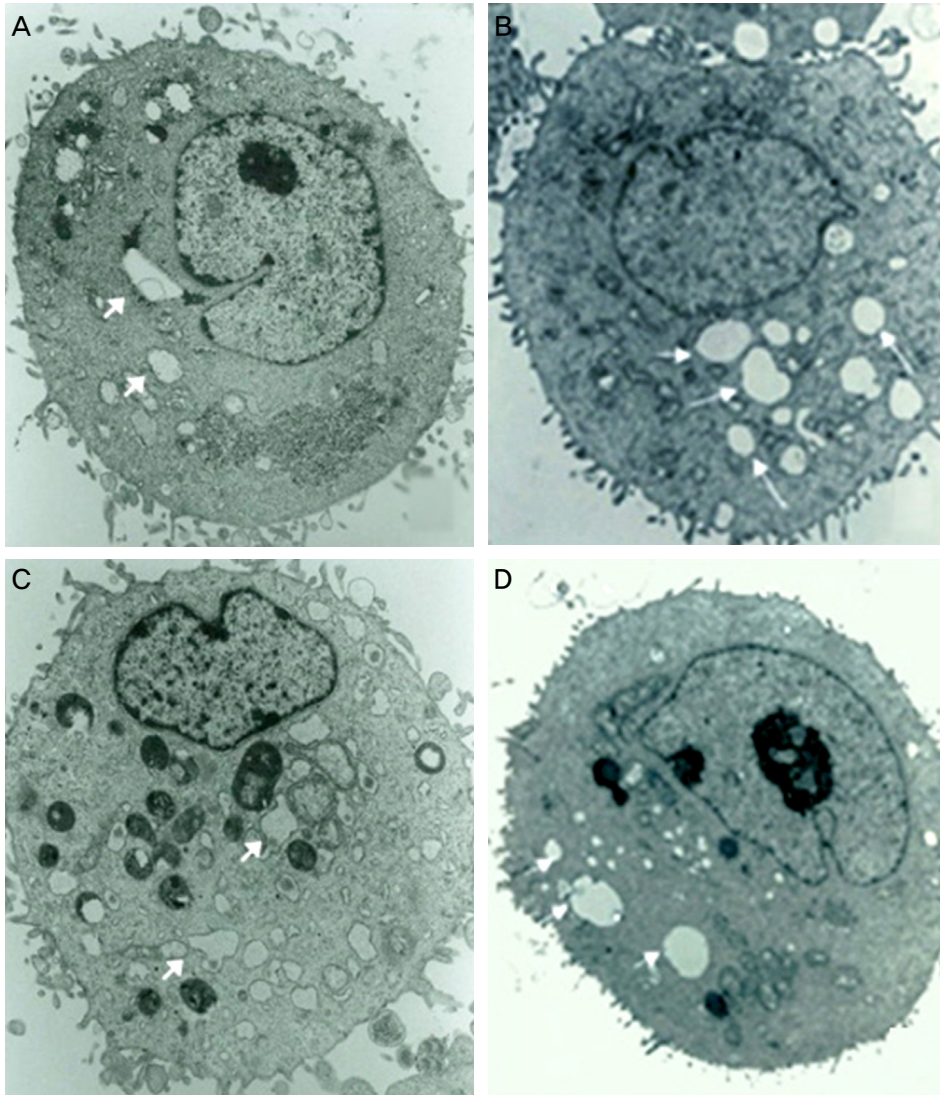
각막상피세포의 전자현미경적 소견은 대조군에서 손상 없이 원형질막에 미세융모가 잘 유지되며 세포질 내 사립체나 과립세포질망의 미세한 확대 및 공포 형성이 관찰되었고, 이와 유사하게 세 약제에 세포질내 공포 형성 및 기관 확대가 나타났으며 세 약제 간 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 7).

## 고찰

히알루론산나트륨은 N-acetyl-glucosamine과 glucuronate가 골은 사슬 모양으로 반복된 형태를 띠며,<sup>6</sup> 물과 결합하는 능력이 매우 커서 질량의 1000배의 물과 결합할 수 있으며 탈수에도 저항한다.<sup>7</sup> 또한, 히알루론산나트륨 점안제는 안구표면상태를 호전시키고, 눈물막을 안정화시키며, 증상을 완화시키고,<sup>3,4</sup> 각막의 습윤성 및 각막상피의 회복 기간을 증가시키고,<sup>8,9</sup> 막간세포의 표면 부착분자(transmembrane)인 CD44 수용체와 연계되어 각막상피세포의 증식과 이주를 촉진시키기도 한다.<sup>5,7,10</sup>



**Figure 6.** Inverted microscopic image of the corneal epithelial cells after 24 hours exposure. A: kynex®, B: kynex2®, C: hyaluni eye drops 0.3%®, D: control. The higher concentration of sodium hyaluronate, the more detached epithelial cell from the media compared with the control.



**Figure 7.** Transmission electron micrographs of corneal epithelial cells appeared after 24-hour exposure to A: kynex®, B: kynex2®, C: hyaluni eye drops 0.3%, D: control. There was no significantly difference among the 3 preservative free hyaluronate eye drops - among kynex®, kynex2®, hyaluni eye drops 0.3%. White arrows indicate the intracellular vacuoles of corneal epithelial cell.

히알루론산나트륨에 의한 각막상피세포의 증식능력은 Inoue and Katakami<sup>5</sup>에 따르면 토끼 각막상피세포를 대상으로 히알루론산나트륨을 사용할 경우 상피세포의 증식이 증가하였다고 보고한 반면, Gomes et al<sup>10</sup>은 각막상피세포의 증식에 영향을 미치지 못한다고 하였다. 본 연구에서는 세 가지 약제에 의한 세포의 증식력에 관한 영향을 알아보기 위해 시행한 MTT 측정결과 세 약제 간 유의한 차이점은 관찰되지 않았고, 통계학적 유의성은 없었지만 노출시간이 증가할수록 세포의 증식력이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. 그리고 노출 1시간 MTT 결과치를 제외하면 모든 MTT 결과치가 100 이상으로 대조군에 비해 증식력이 높은 것을 확인하였다. Ki67 분석법을 통한 결과 유의한 차이를 보이지는 않았지만 히알루니점안액 0.3%<sup>®</sup>가 카이닉스2<sup>®</sup>와 카이닉스1<sup>®</sup>에 비해 다소 높은 결과치를 나타내었다. Ki67 결과치 역시 대부분 100 이상으로 측정되었으며 대조군에 비해 증식력이 높음을 확인할 수 있다.

세 가지 약제가 각막 상피세포 증식에 관여하는 현상을 관찰할 수 있었으나 전해질, PH, 무기질 등을 배제한 히알루론산나트륨 농도에 따른 구체적인 실험으로 약제의 영향을 확인할 필요가 있다고 생각한다. 또한, Joseph et al<sup>11</sup>에 따르면 Ki67이 세포의 증식을 나타내는 지표이기는 하지만 히알루론산나트륨이 인간 각막상피세포의 증식에 미치는 영향에 대해서는 CK3 staining의 소실이나 CK19 staining의 연구가 필요하다는 주장도 제기되고 있어 추후 연구과정에서 확인할 예정이다.

히알루론산나트륨 사용에 따른 각막상피세포의 이주를 관찰한 보고에서 토끼의 경우는 각막상피세포의 이주를 자극한다고 하였으나,<sup>3,7</sup> 인간의 경우는 각막상피세포를 이용한 연구에서 다양한 결과가 확인되었다. 예를 들면, Gomes et al<sup>10</sup>은 히알루론산나트륨이 각막상피세포의 이주를 촉진한다고 보고하였고, Sugiyama et al<sup>12</sup>은 히알루론산나트륨 농도가 높을수록 각막상피세포의 이주가 활발하다고 보고

하였다. 그러나 Algawi et al<sup>13</sup>은 각막상피세포 이주에 영향을 미치지 못한다고 보고하여, 저자들은 인체의 각막상피세포의 이주 확인을 위하여 CD44 분석법과 Scratch assay를 이용하여 분석하였다.

CD44 분석법 결과 대조군에 비해 통계학적 유의성은 없지만 히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스2®, 카이닉스®의 순으로 CD44발현이 높게 관찰되었고, CD44 발현율이 대부분 100 이상으로 측정되어 대조군에 비해 약제를 사용할 경우 이주현상이 증가됨을 알 수 있다. Scratch wound assay상 노출 48시간에는 대조군에 비해 히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스2®, 카이닉스® 순으로 각막상피세포의 이주가 관찰되어 히알우론산나트륨과 각막상피세포 이주의 연관성을 확인할 수 있었다. 세포의 이주현상에 관련하여 Miyauchi et al<sup>14</sup>은 히알우론산나트륨 농도 0.05-4.0%를 대상으로 한 연구에서 0.4% 농도에서 가장 높은 이주력을 보여 본 연구에서 히알유니점안액 0.3%®가 높은 이주력을 보인 결과와 일치하는 결과를 보였으며, 이보다 높은 농도의 히알우론산나트륨에서는 농도가 높을수록 점성이 증가하여 상피세포의 이주가 제한된다고 하였는데 이는 점성이 높을수록 영양분의 이동과 세포 대사가 억제되어 발생한 것으로 주장하였다.

CD44는 각막염이나 각막이식거부반응 등의 병적 상황에서 증가한다고 보고되며, Asari et al<sup>15</sup>은 각막 손상 후 3일까지 히알우론산나트륨의 농도가 증가하며 이에 따라 CD44 양성 세포율도 동시에 증가한다고 보고하였다. 그러나 Brignole et al<sup>16</sup>은 건성안 환자를 대상으로 한 in vivo연구에서 0.18% 히알우론산나트륨 제제를 56일간 점안 이후 CD44 수치의 유의한 감소를 보고하여 in vitro로 시행한 본 연구와 다른 점을 보여, 이는 in vitro 연구와 in vivo 연구 간 차이 및 연구기간의 차이가 결과의 차이를 나게 만든 것으로 생각하며 건성안 환자 등을 대상으로 한 장기간의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 그리고 Zhu et al<sup>17</sup>은 각막에 CD44가 존재하지만, 각막에서의 위치에 따라 다르다고 보고하며, 정상 각막에서 CD44는 대부분 바닥 상피세포에서 나타나고 주변부에 위치한 날개세포가 가장 많은 CD44를 지니며, 각막윤부에서는 모든 상피세포층에서 CD44 양성을 보인다고 주장하였다. 본 연구에서도 각막이식 후 남은 각막 조직 즉 limbal explants를 계대배양하여 실험을 시행하였고, 결과적으로 세 군 모두에서 CD44 양성의 수치를 얻을 수 있어서 이런 실험적인 근거를 입증하고 있다. 따라서 다양한 부위의 상피세포를 대상으로 다양한 농도의 히알우론산나트륨 제제를 이용한 연구도 필요하다고 생각한다.

약제에 의한 세포의 독성은 크게 세포괴사와 세포자멸사로 나누어지는데, 인공누액의 경우 세포 손상은 주로 세포

자멸사로 이루어지며,<sup>18,19</sup> 본 연구에서는 세 약제가 각막 상피세포에 미치는 세포 독성을 알아보기 위하여 LDH 분석법과 형태학적 변화를 관찰하였다.

본 연구에서 LDH 누출률 분석 결과 히알유니점안액 0.3%®, 카이닉스 2®, 카이닉스® 순으로 농도가 증가할수록 LDH 누출률이 증가함을 알 수 있었다. 그러나, LDH 누출률은 노출 6시간까지 증가된 이후 점차 감소되는 경향을 보였는데 이는 초기에 비해 약제의 노출시간이 오래되는 경우는 생존하고 있는 세포의 수가 감소함에 따라 LDH의 유리가 줄어드는 현상도 설명할 수 있다. 세 가지 약제에 24시간 노출된 각막상피세포를 도립위상차현미경으로 관찰하여 보면, 대조군과 비교하여 히알우론산나트륨의 농도가 증가할수록 죽은 세포의 비율이 증가함이 관찰되어 약제의 농도가 증가할수록 증가된 LDH 누출률 소견과 일치하는 것으로 보인다. 전자현미경소견에서도 대조군에 비해 3가지 무방부제 히알우론산나트륨 인공누액에 의해 세포질 내 기관의 공포화, 소공의 형성 및 미세융모의 소실 등이 관찰되어 24시간 약물접촉에 의한 각막상피세포의 손상을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 연구에 의하면 인체에 무해한 무방부제 히알우론산나트륨 제제라도 각막상피세포에 장기간 접촉하면 세포의 손상이 초래될 수 있으므로, 무분별하게 장기적으로 사용하는 경우 약제의 독성으로 각막상피세포의 손상이 발생할 수 있고 이차적으로 각막의 병변을 악화시킬 수 있는 약제의 부작용을 제시해 주고 있다.

점안액이 안구 표면에 독성을 야기하는 원인으로 약물의 농도 이외에 약제의 전해질, pH, 무기질, 삼투압 등이 관여하고, 특히 전해질과 삼투압이 안표면 세포의 기능 이상을 야기하는 가장 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>20</sup> 다양한 농도의 제제로 생산되어 사용되는 무방부제 히알우론산나트륨 제제의 농도 및 전해질, 삼투압에 관여하여 장기간 약제의 접촉으로 인한 각막상피세포의 독성에 관한 구체적인 연구가 필요하며, 저자들에 의해 현재 48시간 이상의 무방부제 히알우론산나트륨 약제의 노출에 따른 세포의 손상이나 독성연구에 관한 실험이 진행 중에 있다.

## REFERENCES

- 1) 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.
- 2) Sand BB, Marner K, Norn MS. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. A double masked clinical trial. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989;67:181-3.
- 3) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 1991;53:753-8.
- 4) Camillieri G, Bucolo C, Rossi S, Drago F. Hyaluronan-induced



- stimulation of corneal wound healing is a pure pharmacological effect. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20:548-53.
- 5) Inoue M, Katakami C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2313-5.
  - 6) Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:109-12.
  - 7) Nakamura M, Hikida M, Nakano T, et al. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* 1993;12:433-6.
  - 8) Snibson GR, Greaves JL, Soper ND, et al. Precorneal residence times of sodium hyaluronate solutions studied by quantitative gamma scintigraphy. *Eye (Lond)* 1990;4(Pt 4):594-602.
  - 9) Avisar R, Creter D, Levinsky H, Savir H. Comparative study of tear substitutes and their immediate effect on the precorneal tear film. *Isr J Med Sci* 1997;33:194-7.
  - 10) Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88:821-5.
  - 11) Joseph A, Powell-Richards AO, Shanmuganathan VA, Dua HS. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol* 2004;88:393-8.
  - 12) Sugiyama T, Miyauchi S, Machida A, et al. The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. II. The effect of topical administration. *J Ocul Pharmacol* 1991;7:53-64.
  - 13) Algawi K, Agrell B, Goggin M, O'Keefe M. Randomized clinical trial of topical sodium hyaluronate after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1995;11:42-4.
  - 14) Miyauchi S, Sugiyama T, Machida A, et al. The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. I. An in vitro study. *J Ocul Pharmacol* 1990;6:91-9.
  - 15) Asari A, Morita M, Sekiguchi T, et al. Hyaluronan, CD44 and fibronectin in rabbit corneal epithelial wound healing. *Jpn J Ophthalmol* 1996;40:18-25.
  - 16) Brignole F, Pisella PJ, Dupas B, et al. Efficacy and safety of 0.18% sodium hyaluronate in patients with moderate dry eye syndrome and superficial keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:531-8.
  - 17) Zhu SN, Nölle B, Duncker G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas. *Br J Ophthalmol* 1997;81:80-4.
  - 18) Adler R. Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of the 21st century? *Arch Ophthalmol* 1996;114:79-83.
  - 19) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
  - 20) Wee WR, Wang XW, McDonnell PJ. Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro. *Cornea* 1995;14:273-9.

## = 국문초록 =

# 제품화된 무방부제 힐론 점안제가 각막상피세포에 미치는 영향

**목적:** 농도가 다른 세 가지 제품화된 무방부제 힐론 점안제가 각막상피세포에 미치는 영향을 비교해 보고자 한다.

**대상과 방법:** 인체의 각막상피세포를 일차배양하여 3-4차례 배양 분주한 후 배지에 sodium hyaluronate 0.1% (카이닉스<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), sodium hyaluronate 0.18% (카이닉스2<sup>®</sup>, Alcon, Seoul, Korea), sodium hyaluronate 0.3% (히알유니점안액 0.3%<sup>®</sup>, Taejoon, Seoul, Korea) 점안약제를 1, 3, 6, 12, 24, 36시간 노출한 후 각막상피세포에 미치는 영향을 비교하였다. 각막 상피세포의 증식력을 비교하기 위해 MTT 검사와 Ki67 검사, 각막 상피세포의 이주력을 비교하기 위해 CD44 검사와 Scratch wound assay, 각막 상피세포에 미치는 세포독성을 비교하기 위해 LDH 검사와 전자현미경 및 도립위상차현미경을 이용한 형태학적 관찰을 시행하였다.

**결과:** 세 가지 약제에서 각 시간별 농도에 따른 MTT 결과치는 유의한 차이가 없었고( $p>0.05$ ), Ki-67 결과치는 히알유니점안액 0.3%<sup>®</sup>가 카이닉스<sup>®</sup>, 카이닉스2<sup>®</sup>보다 높았으나 유의한 차이를 보이지 않았다( $p>0.05$ ). CD44 결과 유의한 차이는 없으나 히알유니점안액 0.3%<sup>®</sup>가 높은 수치를 보였고( $p>0.05$ ), 48시간 후 Scratch wound assay는 히알유니점안액 0.3%<sup>®</sup>, 카이닉스2<sup>®</sup>, 카이닉스<sup>®</sup> 순으로 세포 이주가 증가되었다. LDH 결과치는 각 시간별 약제의 농도가 올라갈수록 증가되었지만( $p>0.05$ ), 형태학적 관찰에서는 세포질내 변화는 큰 차이를 보이지 않았다.

**결론:** 시중에 판매되는 제품화된 히알유니점안액 0.3%<sup>®</sup>가 카이닉스2<sup>®</sup>, 카이닉스<sup>®</sup>에 비해 각막상피세포에 대한 세포의 이주능력이 다소 빨리 진행되며, 세포손상에서는 약제의 농도가 높을수록 더 심하게 나타나지만 세 약제 간 유의한 차이는 없었다.

(대한안과학회지 2014;55(11):1698-1705)