

건성각결막염 환자에서 스테로이드 점안 후 눈물 신경성장인자의 변화

정승아¹ · 이형근¹ · 서경률¹ · 홍순원² · 김현창³ · 김응권¹

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능개발연구소¹, 연세대학교 의과대학 병리학교실², 연세대학교 의과대학 예방의학교실³

목적 : 건성각결막염 환자에서 눈물 신경성장인자의 농도를 정상인과 비교하고 스테로이드 점안 후 농도 변화를 측정하고자 하였다.

대상과 방법 : 비쇼그렌 건성각결막염 환자 41명과 정상인 23명에서 눈물 속 신경성장인자의 농도를 ELISA로 측정하였다. 건성각결막염 환자군에서는 0.1% prednisolone와 0.1% hyaluronic acid를 각각 28일 동안 하루에 세 번씩 점안한 후, 압흔세포진단법과 면역염색검사법을 시행하였다. 또한 눈물 속 총 단백질에 대한 신경성장인자의 분획을 구하였고 주관적 증상 정도와 눈물막 파괴시간을 측정하였으며 쉬르머 검사를 시행하였다.

결과 : 건성각결막염 환자군은 정상안군에 비해 눈물 신경성장인자의 농도가 높았다($p < 0.0001$). 스테로이드 점안군은 대조군에 비해 28일 점안 후 눈물 신경성장인자 농도가 감소하였고($p < 0.0001$), 주관적 증상($p = 0.0014$)과 압흔세포진단 결과($p = 0.0317$)도 호전되었다. 눈물막 파괴시간과 쉬르머 측정값은 두 군간의 차이가 없었다.

결론 : 건성각결막염에서 눈물 속 신경성장인자 농도가 높았으나 스테로이드 점안으로 감소되었다.

〈한안지 47(11):1720-1728, 2006〉

건성안은 흔하지만 그 원인과 임상양상이 다양하고 표준화된 진단법과 검사법이 부족하여 치료가 어려운 질환이다.¹ 또한, 환자의 증상과 임상 양상, 이학적 소견이 일치하지 않는 경우도 흔하다.²

건성안의 시작과 진행에 있어서 안구표면의 염증과 이것의 신경 되먹임이 중요한 인자로 알려져 있다.^{3,4} 건성안의 진단적 분류는 일반적으로 수성눈물 생성부족과 눈물막 증발증가로 나누어지며,⁵ 눈물막의 결핍이 가장 흔한 문제이지만 여전히 많은 건성안 환자들은 인공눈물을 사용해도 불편감을 호소한다.

수성눈물 생성부족과 눈물막 증발증가는 안구표면의 만성염증을 유도한다.⁶⁻⁸ 이러한 염증반응은 염증세포의 침윤과, HLA-DR나 ICAM-1 같은 염증인자,

IL-1 α , - β , TNF- α 와 TGF- β 1 같은 사이토카인의 발현 증가로 상피세포가 활성화되고, 눈물 속의 매질 분해효소의 활동증가 등으로 이루어진다.⁶⁻¹⁴

신경성장인자는 말초 신경조직의 분화와 생존에 관여하는 신경영양물질로써 각막 상피를 포함한 인체의 거의 모든 조직에서 발현되며 건강한 각막 감각과 상피를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷ 또한, 염증 발생시 비만세포나 대식세포, T 세포 및 B 세포에서는 뉴런의 성장과 분화를 위해 신경성장인자 생산된다.¹⁸⁻²¹ 예를 들어, 기관지천식이 발생하면 신경성장인자의 혈중농도가 증가하는 것으로 알려져 있으며,²² Lambiase et al²³은 봄철 각결막염 환자와 알레르기성 결막염 환자에서 안구표면의 염증이 발생하면 신경성장인자의 혈중 농도가 증가함을 처음으로 보고하였다. 그러나 지금까지 건성안 환자에서 실제 염증이 발생하는 눈물 속이나 안구표면에서의 신경성장인자 발현 변화에 관한 연구는 없었다.

본 연구는 2가지 목적을 가지고 있다. 첫째 정상인과 비쇼그렌 건성각결막염 환자의 신경성장인자 농도를 비교하고자 하였고, 둘째로 건성각결막염 환자에서 스테로이드 점안 후 신경성장인자 농도 변화를 조사하여 주관적 또는 객관적인 임상적 지표들과 신경성장인자 농도 사이의 상관관계를 밝히고자 하였다.

〈접수일 : 2006년 1월 28일, 심사통과일 : 2006년 8월 17일〉

통신저자 : 김 응 권

서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 신촌세브란스병원 안과
Tel: 02-2228-3577, Fax: 02-312-0541
E-mail: eungkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 논문 요지는 2004년도 대한안과학회 제92회 추계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

대상과 방법

연구대상

본 연구는 본원을 방문한 환자들을 대상으로 전향적, 임의적인 이중맹검법을 이용하여 시행되었다. 모든 참가자들로부터 informed consent를 받았으며 Helsinki 선언의 윤리적 기준에 합당하게 진행되었다. 본 연구를 완수한 총 41명의 비쇼그렌 건성각결막염 환자 중 남자가 11명, 여자가 30명이었으며 평균 연령은 49.9±13.0세(24~70)였다. 조여름, 이물감, 자극감, 충혈, 가려움, 따가움, 혹은 통증과 같은 건성안 증상이 한가지 이상 존재하면서 쉬르머 검사상 5분 동안 8 mm 이하의 결과치를 양안에서 보이고 양안 눈물막 파괴시간이 7초 이하이며, 특징적인 각막 또는 결막의 점상 미란이 관찰되고 압흔세포진단법상 결막상피세포의 핵:세포질 비율이 1:3이상으로 증가되어 있는 경우를 본 연구의 대상군으로 하였다. 감염 또는 외상력이 있거나, 임신, 수유를 하였거나, 6개월 이내에 안과를 포함한 수술적 치료를 받은 과거력이 있는 환자는 본 연구에서 제외하였으며, 마이봄샘의 기능 이상을 동반한 심한 안검염을 앓았거나, 파킨슨씨 병 및 얼굴신경마비 같은 눈깜박임 장애, 심한 익상편, 조절이 잘 안 되는 전신질환 환자 역시 연구에서 제외하였다. 본 연구에 앞서 모든 환자는 최소 1주 이상 아무런 점안약을 투여하지 않았다. 한편, 눈물막 파괴시간이 10초 이상이고 쉬르머 검사결과 10 mm 이상이면서 주관적인 건성안 증상을 호소하지 않으며 안과적 혹은 전신적인 질환이 없는 46안(23명: 남 7, 여 16)에서도 압흔세포진단법과 눈물 속 신경성장인자의 기초량(baseline) 측정을 시행하였다. 이들 정상안 군의 평균연령은 47.4±14.0세(28~67)였다.

모든 대상자의 양안에서 눈물막 파괴시간과 쉬르머 검사를 시행하였고 생체 현미경을 이용하여 형광염색과 안압 측정을 하였으며 압흔세포진단법을 위해 결막 세포를 채취하였고 눈물을 모았다. 건성안 환자들은 각각의 눈에 대해 증상의 정도를 10 cm bar scale (0=무증상, 10=참기 힘들 정도의 통증)로 표시하였다. 또한, 건성안 환자들은 한쪽 눈에는 하루에 3번 0.1% prednisolone 용액을 점안하고 즉시 다른 눈에는 0.1% hyaluronic acid를 점안하도록 하였는데 스테로이드 점안안과 히알루론산 점안안은 임의로 정하도록 하였다. 이들 측정지표들을 점안 전에 기초자료(baseline)로 측정하였으며 점안 후 14일과 28일에 각각 조사하였다.

연구기간동안 모든 검사는 맹검법으로 진행되었고

점안용기에 표시로는 내용물을 알 수 없도록 하였다. 한 저자가(H.K.L.) 발생할 수 있는 약의 부작용과 환자의 순응도를 검사하였고 다른 한 저자는(S.A.C.) 눈물막 파괴시간과 쉬르머 검사 그리고 증상 정도를 측정하였으며 이 자료들은 또 다른 저자에 의해 분석되었다(H.C.K.).

압흔세포진단법과 면역염색

압흔세포진단법은 5×8 mm 크기로 자른 니트로 셀룰로오스막 strip (Immobilon-NC, Millipore, Billerica, MA)으로 이측 구결막을 5초 정도 누른 후 이를 제거하는 방법으로 시행하였다. 이 strip은 2개의 조각으로 나뉘어 PAS 염색과 신경성장인자 염색을 하였는데, 젤라틴이 덮혀있는 슬라이드 위에 세포가 있는 부분이 아래로 가도록 strip을 덮은 후 즉시 공기와 접촉하지 않도록 95%알코올에 담그었다. Periodic Acid Schiff (PAS)염색은 Tseng의 방법을 이용하였다.²⁴ 신경성장인자 염색은 슬라이드를 3% 과산화수소에 15분간 노출시켜 내재적인 페록시다아제의 활성을 억제한 후 PBS로 헹구고 염소 혈청에서 20분간 실온에서 숙성하여 비특이적인 항체 반응을 줄였으며, 이후 2시간 동안 실온에서 1:500으로 희석한 토끼의 항인체 β-NGF 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN)로 숙성시켰다. 숙성 후 20분 동안 이차 항 가토 항체(DAKO, Glostrup, Denmark)와 반응시켜 그 면역활성을 Histofine SAB-PO kit (Nichirei, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)이 chromogen으로 사용되었으며 슬라이드들은 Mayer's hematoxylin으로 counter-stain되었다. 각 검체들은 술잔세포를 파악하기 위해 PAS 염색을 시행하였고 Nelson의 분류에 따랐다.²⁴ 신경성장인자의 면역활성과 압흔세포진단 등급을 결정하기 위해 신경성장인자 염색의 표준화 사진을 지정하여 각각의 슬라이드를 분석하고 등급을 매겼다(S.W.H.).

눈물채취와 눈물 속 신경성장인자에 대한 ELISA 분석

눈물 속 신경성장인자 농도를 측정하기 위해 bonded 2.0×10 mm polyester fiber rod (Transorb[®] Wicks, Filtrona, Richmond, VA)를 사용하였다. 반사적으로 분비되는 눈물에 의해 희석되는 것을 피하기 위해 0.5% propacaine (Alcaine[®], Alcon-Courvreur, Puurs, Belgium)을 우선 점안하였으며 2분 후

polyester wick를 하결막낭에 3~5분 동안 적용하였다. 이 후 자극을 주지 않고 제거한 후 1.5 ml Eppendorf tube에 넣었으며 각 튜브는 ELISA 분석을 하기 전까지 -70°C 에 보관되었다. 신경성장인자의 농도는 DuoSet ELISA development kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 측정되었으며, 각각의 눈물 검체에 포함된 총 단백질은 microBSA (bovine serum albumin) 방법으로 산출되어 총 단백질에 대한 신경성장인자의 분획을 구하였다.²⁶

통계적 분석

정상안군과 건성안군은 Student's t-tests를 이용하여 연령, 각막 감각지각, 그리고 신경성장인자 농도를 비교하였으며, 성별은 chi-square test를 이용하여 분석하였다. 눈물 속의 신경성장인자 농도와 총 단백질에 대한 신경성장인자 농도의 분획은 SAS (ver. 8.0; SAS, Cary, NC)의 ANOVA를 이용하였고, 선행회귀분석과 Pearson 상관분석을 이용하여 총 단백질에 대한 신경성장인자 농도의 분획과 주관적 증상, 눈물막 파괴시간 그리고 쉬르머 검사결과 간의 상관관계를 분석하였으며, p value <0.05 이면 통계학적 의미를 지니는 것으로 하였다.

결 과

총 53명의 비쇼그렌 건성각결막염 환자들을 연구대상으로 하였으나 그 중 12명은 본 연구를 끝까지 수행하지 못하였는데, 6명은 특별한 이유 없이 내원하지 않

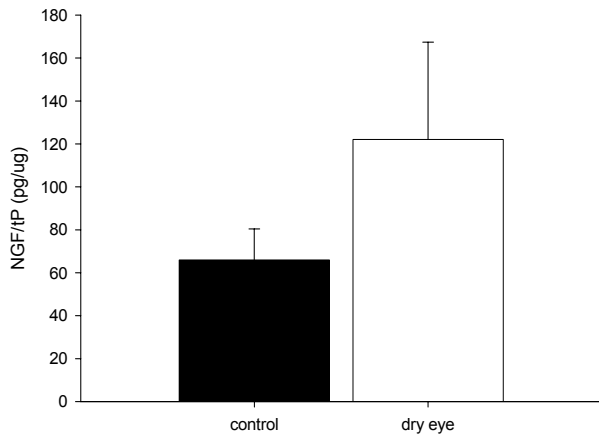


Figure 1. Tear nerve growth factor/tear total protein (NGF/TP) ratios in normal eyes (■) and keratoconjunctivitis sicca (KCS) eyes (□) (*; p<0.01, Student t-test).

았고, 4명은 찌르는 감각, 안구 통증 등의 심각한 약물 부작용을 호소하였으며, 나머지 2명은 연구 시작 전보다 안압이 8 mmHg 이상 증가하여 중단하였다. 부작용을 호소하는 환자 중 3명은 스테로이드 점안안에, 나머지 1명은 히알루론산 점안안에서 통증을 호소하였는데, 두 약제 모두 방부제로 0.05% Benzalkonium chloride을 포함하고 있다. 본 연구를 완수한 41명의 건성안 환자 중 15명은 당뇨가 있었고, 9명은 콘택트렌즈 착용력이 있었으며, 2명은 안과 수술을 받은 적이 있었고 우울증 2명, 갑상선 항진증 1명, 갑상선 저하증 1명, 치료받지 않는 류마치스 관절염 1명이 포함되어 있었다. 41명 중 24명은 좌안에, 17명은 우안에 스테로이드 제제를 점안하였다.

눈물 속 신경성장인자 농도

각 안에서 70~110 µl의 눈물을 채취하였는데, ELISA 분석을 하기 위한 최소한의 눈물양은 50 µl이었고 1 pg/ml의 신경성장인자도 감지 할 수 있었다. 본 연구 대상들의 총 단백질량은 251~4238 µg/ml였고, 신경성장인자의 농도는 19~592 ng/ml였다.

신경성장인자의 눈물 속 기초 농도(baseline, 0일째)는 건성안에서 정상안보다 높았다(65.9±14.5 vs. 122.1±45.3 pg/µg, p<0.0001)(Fig. 1). 치료 전, 건성안 환자의 신경성장인자 눈물 속 농도의 양안 차이는 없었다(p=0.870). 28일간 한쪽 눈에 0.1% prednisolone을 점안하고 다른 눈에는 0.1% hyaluronic acid을 점안한 결과, 치료 후 14일째에는 스테로이드를 점안군에서는 총단백에 대한 눈물 신경성

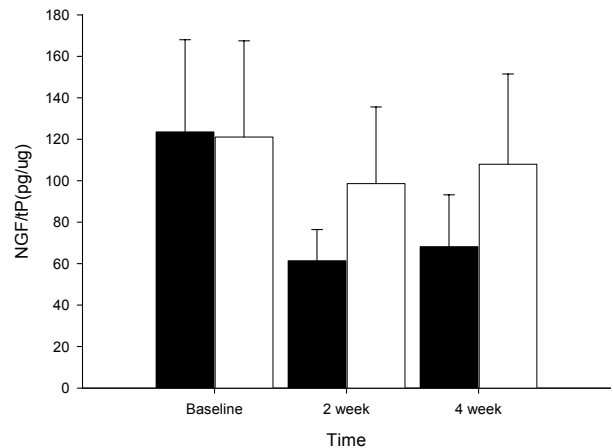


Figure 2. Tear nerve growth factor/tear total protein (NGF/TP) ratios in eyes treated with 0.1% prednisolone (■) or 0.1% hyaluronic acid (□) (*; p<0.01, repeated measures ANOVA).

장인자의 분획이 61.4 ± 15.1 pg/ μ g인데 반해, 히알루론산 점안군에서는 98.6 ± 37.0 pg/ μ g이었으며 이들 분획간에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.0001$). 또한, 치료 후 28일째에는 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획이 스테로이드 점안군에서는 68.2 ± 25.0 pg/ μ g인데 반해, 히알루론산 점안군에서는 108.0 ± 43.4 pg/ μ g이었다($p < 0.0001$) (Fig. 2). 치료 전과 치료 후 28일이 지났을 때의 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획은 스테로이드로 치료한 경우는 의미 있게 감소하였지만($p < 0.0001$), 히알루론산으로 치료한 경우는 유의한 차이가 없었다.

눈물막 파괴 시간과 쉬르머 검사

치료 후 14일과 28일째의 눈물막 파괴시간과 쉬르머 검사결과는 스테로이드 점안군과 히알루론산 점안군 간의 차이는 없었다(Table 1, 2). 더욱이 두 군 모두 치료여부가 쉬르머 검사결과를 변화시키지는 않았다(스테로이드: $p = 0.887$, 히알루론산: $p = 0.322$). 하지만, 눈물막 파괴시간은 두 군 모두 치료 전에 비해 향상되었다(스테로이드: $p = 0.003$, 히알루론산: $p = 0.041$).

주관적 증상 정도

실험을 시작하기 전, 주관적인 증상 정도는 스테로이드 치료군은 4.94 ± 2.21 , 히알루론산치료군은 5.37 ± 2.25 로 두 군간의 차이는 없었다($p = 0.250$). 치료 후

14일째에는 치료 전에 비해 스테로이드 점안군에서는 2.65 ± 1.78 ($p < 0.0001$, compared with baseline)로 감소한데 반해, 히알루론산 점안군은 3.58 ± 1.66 로 감소하였는데($p < 0.0001$, compared with baseline), 이 둘 간에도 유의한 차이가 있었다($p = 0.048$) (Fig. 3). 또한, 치료 후 28일째에는 스테로이드 점안군에서는 2.16 ± 1.01 로 감소한데 반해, 히알루론산 점안군은 3.39 ± 1.50 로 감소하여 28일이 경과하였을 때에도 치료 방법에 따른 명확한 차이가 있었다($p = 0.0014$) (Fig. 3).

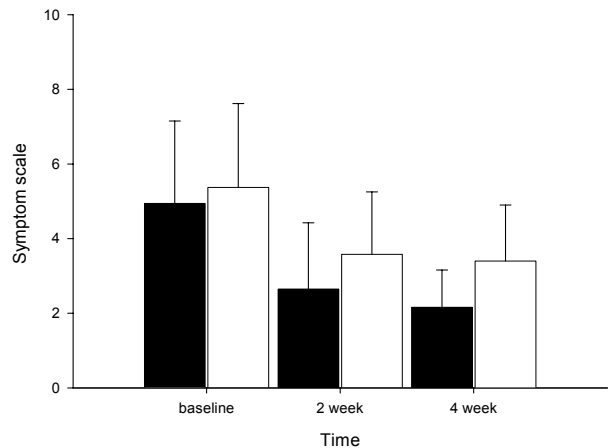


Figure 3. The effect of 0.1% prednisolone (■) or 0.1% hyaluronic acid (□) treatment on subjective symptoms for ocular surface dryness (*; $p < 0.01$, †; $p < 0.05$, repeated measures ANOVA).

Table 1. Tear breakup time (BUT) (sec.) in eyes treated with either 0.1% prednisolone or 0.1% hyaluronic acid

	Baseline	After treatment	
	Mean±SD* (range)	14 days Mean±SD (range)	28 days Mean±SD (range)
0.1% prednisolone	3.24±1.51 (0.6 to 8.2)	4.02±1.70 (0.5 to 8.5)	5.36±1.75 (0.7 to 11.5)
0.1% hyaluronic acid	3.32±1.04 (0.5 to 7.9)	3.93±1.42 (0.5 to 8.4)	4.97±1.19 (0.5 to 10.8)
p value	0.715	0.570	0.062

* SD=standard deviation.

Table 2. Schirmer values (mm) in eyes treated with 0.1% prednisolone or 0.1% hyaluronic acid

	Baseline	After treatment	
	Mean±SD* (range)	14 days Mean±SD (range)	28 days Mean±SD (range)
0.1% prednisolone	2.51±3.10 (0.0 to 8.5)	3.37±3.79 (1.2 to 9.7)	3.40±3.39 (0.7 to 11.5)
0.1% hyaluronic acid	2.39±3.05 (0.0 to 10.0)	3.07±3.78 (0.5 to 9.8)	3.28±3.43 (0.5 to 10.0)
p value	0.149	0.519	0.228

* SD=standard deviation.

신경성장인자의 면역염색과 압흔세포진단

결막상피의 면역염색은 양성, 음성, 그리고 모호한 경우로 나눌 수 있었는데(Fig. 4), 양성군은 신경성장인자가 세포안과 세포간질 모두에서 염색되는 것으로 정의하였고(Fig. 4A), 음성군은 세포 안팎으로 신경성장인자의 염색이 잘 안 되는 경우로 하였으며(Fig. 4B), 모호한군은 세포질에는 염색이 되나 세포간질은 염색되지 않는 경우로 정의하였다(Fig. 4C). 5개의 슬라이드가 모호하였는데, 세포 내 신경성장인자는 신경성장인자의 분비의 직접적인 증거가 아닐 뿐만 아니라 눈물 속의 신경성장인자의 농도와 상관관계가 없으므로 본 연구에서는 모호한 군은 음성군으로 간주하였다.

치료 전의 경우, 건성안의 결막상피 압흔세포진단 결과는 술잔세포의 밀도와 PAS 염색강도 모두가 정상안에 비해 낮았다. 28일이 지난 후 스테로이드 치료군은 세포 부종과 점액의 뭉침이 감소하였으나 PAS 염색의 강도는 변하지 않은 것에 반하여(Fig. 5A), 히알루론산 치료군에서는 큰 세포질(흰 화살)과, 점액 띠(검은 화살), 그리고 분쇄된(pyknotic) 세포핵(검은 화살머리) 소견을 보였으며, 이런 특징은 치료 전과 유사하였다(Fig. 5B). 또한, 스테로이드 치료군과 히알루론산 치료군의 압흔세포진단 등급은 치료 전 각각 1.90 ± 0.76 과 1.86 ± 0.70 ($p=0.752$)이었고, 치료 후 28일에는 1.05 ± 0.67 과 1.61 ± 0.86 이었는데, 히알루론산으로 치료군의 경우는 치료 전 후의 차이가 없었으나 ($p=0.790$), 스테로이드 치료군은 치료 전보다 유의하

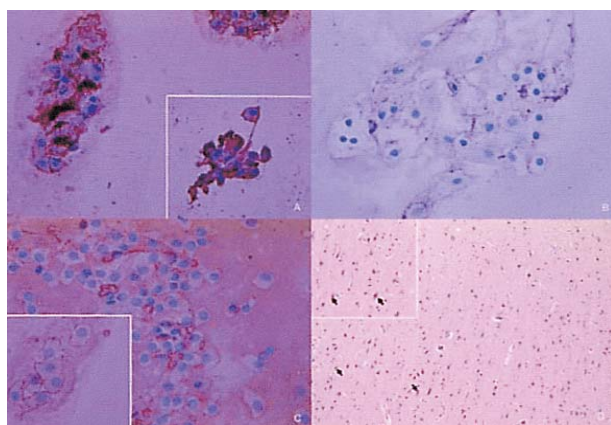


Figure 4. Standard photographs for the determination of nerve growth factor (NGF) immunostaining status: NGF positive (panel A), NGF negative (panel B), equivocal (panel C), and positive control for NGF in human cerebrum (panel D). The arrows mark the immunopositive glial cells (D) ($\times 100$, Olympus B $\times 51$, Tokyo, Japan; $\times 150$ in the white box of A, C, D).

게 낮아졌으며($p=0.0105$), 치료 후 28일에 두 군간의 차이도 통계적으로 의미가 있었다($p=0.0317$).

한편, 치료 전 건성각결막염 환자의 82.9% (82안 중 68안) 결막 상피 세포질에 신경성장인자가 강하게 염색된 것에 반해, 정상안에서는 단지 21.7% (23안 중 5안)만이 비슷한 정도로 신경성장인자가 염색되었다. 치료 후 28일째 스테로이드 치료군은 면역염색되는 신경성장인자의 수가 43.9% (41안 중 18안)로 감소하였고 치료 전에 비해 염색되는 정도도 약해지는데 반해(Fig. 5C), 히알루론산 치료군은 여전히 73.2% (41안 중 30안)에서 신경성장인자 양성 염색소견이 관찰되었다(Fig. 5D).

눈물 신경성장인자와 임상적인 지표의 상관관계

치료 후 28일째 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획은 눈물막 파괴시간이나 쉬르머 검사 결과와 상관관계가 없었다(눈물막 파괴 시간: $r=0.172$, $p=0.439$, 쉬르머 검사결과: $r=0.0474$, $p=0.291$ - 스테로이드 치료군: 눈물막 파괴 시간: $r=0.163$, $p=0.110$, 쉬르머 검사결과: $r=0.226$, $p=0.325$ - 히알루론산 치료군). 하지만, 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획은 주관적 증상 정도와 강한 상관관계를 보였는데

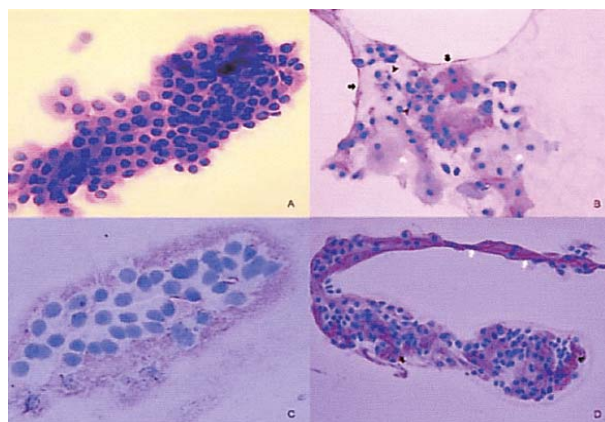


Figure 5. Impression cytology and immunocytochemistry for nerve growth factor (NGF) in samples taken from keratoconjunctivitis sicca (KCS) eyes treated with either 0.1% prednisolone or 0.1% hyaluronic acid for 4 weeks. Impression cytology. Panel A. 0.1% prednisolone treatment ($\times 200$). Panel B. 0.1% hyaluronic acid treatment ($\times 100$). NGF immunostaining. Panel C. NGF-positive conjunctival epithelial cells following 0.1% prednisolone treatment. Panel D. NGF staining following 0.1% hyaluronic acid treatment. Black arrows indicate NGF-positive cells and white arrows indicate aggregated mucus strands ($\times 100$, Olympus B $\times 51$, Tokyo, Japan).

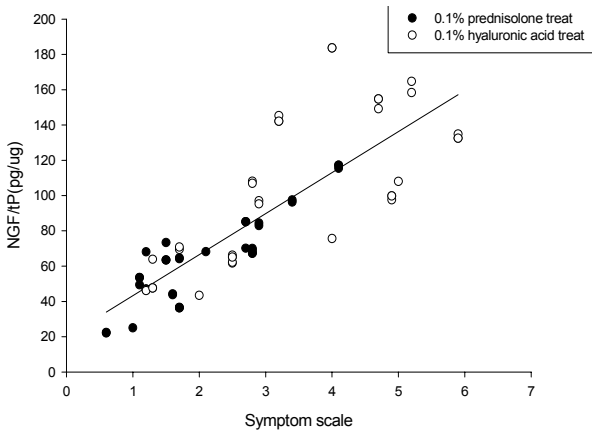


Figure 6. Correlation between tear NGF concentration and subjective symptom score after 28 days of treatment ($r=0.751$, Pearson correlation coefficient, $p<0.00001$).

($r=0.751$, $p<0.0001$) (Fig. 6), 특히 스테로이드 치료군은 히알루론산 치료군에 비하여 낮은 주관적 증상 정도와 낮은 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획을 나타내었다. 또한, 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의 분획은 두 치료군 모두에서 압흔세포진단 등급과 주관적 증상 정도와 상관관계가 있었다($r=0.487$, $p=0.0159$) (Fig. 7).

고 찰

본 연구를 통하여 정상안에 비해 비쇼그렌 건성안에서 눈물 속 신경성장인자 농도가 높았으며, 항 염증제인 0.1% prednisolone 점안액이 이러한 눈물 속 신경성장인자의 농도를 낮춰 주는 것을 알 수 있었다. 또한, 스테로이드 점안치료가 눈물막 파괴시간이나 쉬르머 검사 결과에는 영향을 못 미쳤으나 주관적 증상과 압흔세포진단 결과를 호전시켰다. 반면, 히알루론산을 점안할 경우 증상은 호전되나 스테로이드 점안 시 보다 호전 정도가 적었으며, 눈물 속 신경성장인자 농도 분획과 압흔세포진단 결과에는 영향을 미치지 못하였다. 이 같은 연구 결과는 안구 표면의 신경성장인자가 비쇼그렌 건성안과 관련된 안구표면 염증에 중요한 역할을 하며, 항 염증제제가 건성안의 치료제로서 고려될 수 있음을 제시한다.

전통적으로 건성안의 진단과 평가는 주관적인 증상과 눈물막의 불안정성, 안구표면의 손상 정도로 이루어졌다. 건성안의 병태 생리가 완전히 밝혀진 것은 아니지만, 눈물의 분비와 증발, 신경반사, 호르몬, 표면 염증 등의 여러 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다.^{3,4,9,12,13} 이 중에서 염증 부분은 건성안의 증상뿐만

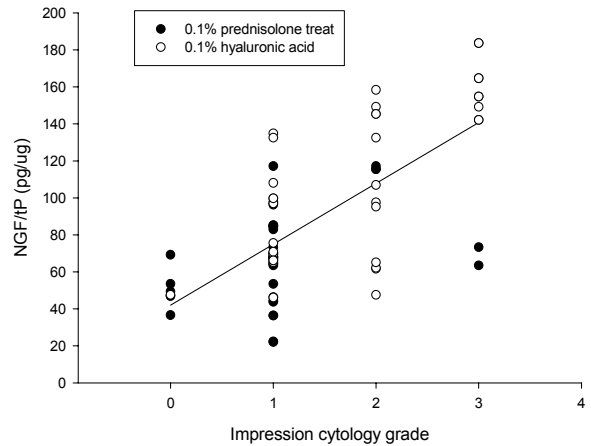


Figure 7. Scatter plot relating tear NGF concentration and impression cytology score after 28 days of treatment. The points can be represented by a linear regression given by the equation $y=19.27+4.53x$ ($r=0.487$, $p=0.0159$).

아니라 질병 과정에도 영향을 미치는 것으로 밝혀지고 있으며,²⁷ 따라서 스테로이드 제제가 안구 표면의 건조로 일어나는 염증 상태에 효과적인 치료제로 쓰일 수 있음이 알려졌다.²⁸⁻³⁰ 최근 임상가들은 환자들의 증상에 비하여 표면 손상과 눈물의 불안정성이 적은 경우를 흔히 접하게 되면서, 눈물막 파괴시간이나 쉬르머 검사와 같은 전통적인 건성안의 진단 및 평가 지표를 신뢰하지 않게 되었다.^{27,31} 이에 건성안의 염증 정도를 보다 정확하게 평가할 수 있고, 이에 따른 적절한 치료를 가능케 하는 유의한 진단 지표들이 필요하게 되었다.

신경성장인자는 1950년대 초에 처음 발견된 이래 광범위하게 연구되고 있는데, 처음에는 뉴론의 성장과 분화를 촉진하는 향신경성인자로만 알려졌다으나, 알레르기성 염증을 포함한 신경계 이외의 광범위한 부분에서 기능하는 것으로 밝혀졌다.³² 본 연구에서는 신경성장인자의 눈물 속 농도가 비쇼그렌 건성안 환자에서 증가되어 있었고 스테로이드 치료로 이를 낮출 수 있음을 확인하였는데, 이는 만성적으로 건조한 안구표면에서는 건성안의 초기 원인에 관계없이 조절과 치유를 위해 신경계가 과도하게 자극 받고 있음을 의미한다.³ 이 신경 자극은 신경학적 염증을 유도하고 T 세포를 활성화하여 염증성 싸이토카인이 눈물샘, 눈물막 그리고 결막에 분비되게 한다고 가정할 수 있으며,^{3,4} 이에 따라 결막과 각막상피세포는 각각 국소적인 면역성 염증반응을 초래하는 IL-1 α , -6, -8과 TNF- α 를 생산하게 되고 결국 신경성장인자 생성이 촉진되는 것이다.⁴ 한편, 스테로이드는 염증 및 면역 매개 물질인 싸이토카인, 케모킨, 세포 표면 수용체, 결합분자, 조직인자, cyclooxygenase (COX)-2 및 유도성 일산화 질소 생성효

소(nitric oxide synthase)와 같은 분해효소의 유전자 발현을 억제한다.³³ 염증 반응 유전자는 특히 NF- κ B 전사인자와 활성화인자 단백질(activator protein-1, AP-1)에 의해 조절된다고 알려져 있으며, 리간드가 부착된 스테로이드 수용체는 AP-1 복합체(대개 c-Jnk/c-Fos heterodimers)와 상호작용을 하여 그들의 전사작용을 억제하게 되는데,^{34,35} AP-1은 신경성장인자의 전사조절에 필수적이다.^{35,36} 따라서, 본 연구에서 수용체에 결합한 스테로이드는 AP-1 활성을 저하시키게 되고, 결국 신경성장인자의 발현을 억제할 수 있게 되는 것이다.

본 연구에서 나타난 건성안의 염증과 관련한 신경성장인자의 조절이 신경성장인자가 이러한 염증반응에서 특별한 역할을 한다는 것을 명백하게 보여주는 것은 아니지만, 신경성장인자가 안구 표면 건조의 병태 생리에서 중요한 역할을 하고 있을 가능성에 대하여 제시하였다. 말초 신경에 대한 신경성장인자의 두드러진 영향은 "neuronal plasticity"라고 표현되는데, 이는 말초신경의 기능적인 활동과 능력의 질적, 양적인 변화로 정의된다. 예를 들어, 척척환자에서 신경성장인자의 생성이 증가하면 염증 자극에 대한 신경의 활성화 역치가 줄어들게 되어 trk 수용체의 발현이 증가하게 되는 것이다.^{37,38} 따라서, 건성안에서의 신경성장인자는 단순한 염증성 사이토카인의 활성화로 인한 부산물이라기 보다는 건성안의 병리에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 스테로이드 점안군이 대조군에 비해 눈물 신경성장인자 농도가 감소하였고 주관적증상과 압흔세포진단결과가 의미 있게 호전되었으나 눈물막과괴시간과 쉬르머측정값은 두군간의 차이가 없었다. 이는 쇼그렌 건성안 환자의 진단에 사용되는 여러 검사들 중 눈물막과괴시간과 쉬르머측정값의 진단적 효용성이 떨어지고 환자의 증상에 관한 설문이 효용성이 뛰어나다는 최근 연구 결과와도 일치하며,³⁹ 스테로이드 점안액과 NSAID 점안액간의 건성안 환자 치료 효용성을 비교한 연구에서도 스테로이드 군에서 주관적증상과 압흔세포진단결과가 의미 있게 호전되었으나 쉬르머측정값은 두군간의 차이가 없었다.⁴⁰ 따라서 전통적으로 건성안 진단과 평가에 사용되고 있는 쉬르머측정값, 눈물막과괴시간 보다는 주관적 증상이나 압흔세포진단결과와 함께 눈물 속 신경성장인자 농도를 이용하는 것이 더 신빙성을 높일 수 있을 것이다.

눈물 수집 과정 중에서 일부 대상은 충분한 눈물량을 보인 반면, 다른 대상들은 안구표면이 건조하였는데, 이러한 조건에서는 눈물 속 총 단백질량은 희석되거나 농축될 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 눈물 속의 총 단백량을 측정하고 총단백에 대한 눈물 신경성장인자의

분획을 구하여 반사적인 눈물 분비에 의해 희석되거나 반대로 건조하여서 신경성장인자가 농축되는 경우를 보정하였다. 눈물 속 신경성장인자의 농도 자체는 안구표면의 건조상태에 따라 매우 다양하게 나타났으나, 총 단백질을 이용하여 표준화함으로써 치료 방법에 따른 차이를 보다 신뢰도 있게 파악할 수 있었다. 또한 가장 동일한 조건에서 약물의 치료효과를 비교하고자 동일인의 양안에 각각 다른 종류의 안약을 점안 하였다. 하지만 Brain-immune system-eye axis라는 lacrimal functional unit 개념에 의하면 스테로이드 안약이 다른 종류의 안약을 점안한 눈에 간접적인 영향을 미쳤을 가능성에 대해서는 배제하기가 어렵다.^{41,42} 추후 실험설계에서는 이러한 점도 고려되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구에서는 눈물 속의 신경성장인자 농도가 정상안에 비해 건성안에서 보다 높았으며, 0.1% prednisolone 점안액을 이용한 단기간의 항염증치료를 시행한 결과 증가하였던 눈물 속 신경성장인자 농도가 감소하였고, 심각한 부작용 없이 건성안의 주관적 증상들이 경감되었다. 이러한 치료의 장기간의 효과와 안전성에 관한 추가적인 연구는 물론, 나아가 건성안에서의 증가된 신경성장인자의 역할에 관한 연구도 필요할 것이다.

참고문헌

- 1) Brewitt H, Sistani F. Dry eye disease: The scale of the problem. *Surv Ophthalmol* 2001;45:199-202.
- 2) Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137:337-42.
- 3) Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584-9.
- 4) Baudouin C. The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45:211-20.
- 5) Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21:222-32.
- 6) Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, et al. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1alpha concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2506-12.
- 7) Barton K, Monroy DC, Nava A, Pflugfelder SC. Inflammatory cytokines in tears of patients with ocular rosacea. *Ophthalmology* 1997;104:1868-74.
- 8) Prabhawar P, Tseng SCG. Frequent association of delayed tear clearance in ocular irritation. *Br J Ophthalmol* 1998;82:666-75.
- 9) Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's

- syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19:201-11.
- 10) Jones DT, Monroy D, Ji Z, et al. Sjogren's syndrome: cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3493-504.
 - 11) Baudouin C, Brignole F, Becquet F, et al. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1458-64.
 - 12) Bourcier T, De Saint-Jean M, Brignole F, et al. Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:120-6.
 - 13) Tishler M, Yaron I, Geyer O, et al. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:2327-9.
 - 14) Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, et al. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1703-9.
 - 15) You L, Kruse FE, Volcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:692-702.
 - 16) Lambiase A, Manni L, Bonini S, et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analysis of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1063-9.
 - 17) Kruse FE, Tseng SC. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:1963-76.
 - 18) Leon A, Buriani A, Dal Toso R, et al. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3739-43.
 - 19) Braun A, Appel E, Baruch R, et al. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998;28:3240-51.
 - 20) Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10984-8.
 - 21) Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 1996;85:345-56.
 - 22) Bonini S, Lambiase A, Bonini S, et al. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10955-60.
 - 23) Lambiase A, Bonini S, Bonini S, et al. Increased plasma levels of nerve growth factor in vernal keratoconjunctivitis and relationship to conjunctival mast cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2127-32.
 - 24) Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-33.
 - 25) Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7:71-81.
 - 26) Jensen JL, Karatsaidis A, Brodin P. Salivary secretoryon: stimulatory effects of chewing-gum versus paraffin tablets. *Eur J Oral Sci* 1998;106:892-6.
 - 27) Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45:221-6.
 - 28) Avunduk AM, Avunduk MC, Vernell ED, Kaufman HE. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol* 2003;136:593-602.
 - 29) Miserocchi E, Baltatzis S, Roque MR, et al. The effect of treatment and its related side effects in patients with severe ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 2002;109:111-8.
 - 30) Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1999;106:811-6.
 - 31) Brewitt H, Sistani F. Dry eye disease: the scale of the problem. *Surv Ophthalmol* 2001;45:199-202.
 - 32) Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-62.
 - 33) Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* 2002;4:146-50.
 - 34) Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000;55:603-13.
 - 35) Colangelo AM, Pani L, Mocchetti I. Correlation between increased AP-1/NGF binding activity and induction of nerve growth factor transcription by multiple signal transduction pathways in C6-2B glioma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;35:1-10.
 - 36) Cowie A, Ivano TL, Fahnestock M. Mouse NGF promoter upstream sequences do not affect gene expression in mouse fibroblasts. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;27:58-62.
 - 37) Hoyle GW, Graham RM, Finkelstein JB, et al. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:149-57.
 - 38) Albers KM, Wright DE, Davis BM. Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1994;14:1422-32.
 - 39) Versura P, Frigato M, Cellini M, et al. Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients. *Eye* 2006;6:1-9.
 - 40) Avunduk AM, Avunduk MC, Varnell ED, et al. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol* 2003;136:593-602.
 - 41) Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584-9.
 - 42) Stern ME, Gao J, Siemasko KF, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-16.

=ABSTRACT=

Topical 0.1% Prednisolone Lowers Nerve Growth Factor Expression in Keratoconjunctivitis Sicca Patients

**Seung Ah Chung, M.D.¹, Hyung Keun Lee, M.D.¹, Kyoung Yul Seo, M.D.¹
Soon Won Hong, M.D. Ph.D.², Hyung Chang Kim, M.D. Ph.D.³, Eung Kweon Kim, M.D.¹**

The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine², Seoul, Korea

Department of Preventive Medicine and Public Health, Yonsei University College of Medicine³, Seoul, Korea

Purpose: To compare nerve growth factor (NGF) levels in tears and on the ocular surface of normal controls with those of non-Sjogren type keratoconjunctivitis sicca (KCS) subjects, and investigate the effect of 0.1% prednisolone eye drops on NGF levels in KCS patients.

Methods: Baseline tear NGF levels were measured in 41 KCS patients and 23 healthy control subjects using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). KCS patients received 0.1% prednisolone drops in one eye, and 0.1% hyaluronic acid drops in the other eye, three times daily for 28 days. Impression cytology (IC) and immunostaining for NGF on conjunctival epithelium was performed for both groups.

Results: KCS patients were found to have higher baseline tear NGF concentrations compared to age- and sex-matched healthy control subjects (65.9 ± 14.5 vs. 122.1 ± 45.3 , $p < 0.0001$). In KCS patients, prednisolone treatment for 28 days resulted in a decrease in tear NGF levels, symptom scores and IC scores, whereas hyaluronic acid treatment had no such effect (68.2 ± 25.0 pg/ μ g vs. 108.0 ± 43.4 pg/ μ g, $p < 0.0001$ for tear NGF/TP ratio; 2.16 ± 1.01 vs. 3.39 ± 1.50 , $p = 0.0014$ for symptom scale; 1.05 ± 0.67 vs. 1.61 ± 0.86 , $p = 0.0317$ for IC). Measurements taken at both 14 and 28 days indicate that neither prednisolone nor hyaluronic acid treatment affected BUT or Schirmer values.

Conclusions: KCS patients showed elevated levels of tear NGF, which were decreased by treatment with 0.1% prednisolone. These data suggest that the ocular surface NGF may play an important role in ocular surface inflammation processes associated with dry eyes.

J Korean Ophthalmol Soc 47(11):1720-1728, 2006

Key Words: Keratoconjunctivitis sicca, Nerve growth factor, Prednisolone

Address reprint requests to **Eung Kweon Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Yonsei University

#134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: 82-2-2228-3577, Fax: 82-2-312-0541, E-mail: eungkim@yumc.yonsei.ac.kr