

익상편 절제술 후 괴사성 공막염이 발생한 환자의 눈물에서 TNF-alpha 와 MMP-9 의 증가

신정철 · 임찬영 · 이준행 · 서경률

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발 연구소

목적 : 익상편 수술 후 괴사성 공막염이 발생한 환자의 눈물과 공막조직에서 TNF-alpha(tumor necrosis factor-alpha)와 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)의 정량분석을 시행하여 이 병의 진행 및 치료와 관련하여 이들의 상관관계를 분석하고 이를 바탕으로 치료방법을 모색하고자 한다.

대상과 방법 : 익상편 절제술 후 발생한 괴사성 공막염으로 내원한 세 명의 환자를 대상으로 눈물과 공막조직에서 Western blot분석을 통해 MMP-9과 TNF-alpha의 정량분석을 시행하였다.

결과 : 대조군(건강한 반대편 눈)에 비교할 때 괴사성 공막염이 있는 눈에서 채취한 눈물표본에서 TNF-alpha 와 MMP-9 모두 증가되었다. 또한 치료 전과 비교할 때 치료 후에 TNF-alpha 와 MMP-9 모두 감소되었다. 그리고 공막이식공여자의 공막 및 환자의 결막과 비교할 때 괴사된 공막표본에서 MMP-9의 증가가 관찰되었다.

결론 : 익상편 절제술후 합병된 괴사성 공막염의 병인으로 cytokine과 연관된 염증반응이 중요한 역할을 담당하고 있으며, 이러한 사실은 이 병의 진행을 막는데 있어서 부신피질호르몬제와 면역억제제가 도움이 될 수 있음을 시사해 주고 있다.

<한안지 45(5):720-724, 2004>

수술 후 발생하는 괴사성 공막염은 시력을 위협하는 안과적 수술의 심각한 합병증 중에 하나로 익상편 절제술을 포함한 여러 안과적 수술 후에 나타날 수 있으며, 대부분 수술 후 수주에서 수개월 사이에 발생하나 일부에서는 수년이 지난 후에도 발생할 수 있다.¹⁻⁴ 최근 이에 대한 치료로서 전신적인 부신피질호르몬제와 면역억제제가 사용되고 있지만, 이러한 치료의 정확한 임상적 역할 및 병에 대한 분자생물학적 기전은 명확히 밝혀지지 못하고 있다.^{1,2}

최근 연구결과에 따르면, 괴사성 공막염과 MMPs(Matrix metalloproteinases) 및 TNF-alpha(Tumor necrosis factor-alpha)의 잠재적 연관성

이 밝혀지고 있으며, 염증세포에서 생산된 cytokines, 예를 들면 TNF-alpha와 IL-1(interleukin-1) 등에 의한 MMPs와TIMPs(tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)의 불균형이 병리적 과정에 관여하는 것으로 생각되고 있다.⁵⁻⁷

MMPs는 정상 결체 조직의 재생, 상처치유, 혈관 형성 등에 관여하는 효소군으로서, 세포외 기질과 기저막을 분해하는 단백질 분해 기능을 가지고 있다. 이러한 MMPs의 과도한 활성화와 관절염, 궤양, 동맥경화증 등에서 보이는 결체조직단백의 조절되지 않는 분해사이의 연관성에 대해서는 이미 알려진 바이다. 그 중 MMP-9는 젤라틴분해효소로서, 바닥막을 분해하는 역할을 하며, 아교질 IV, V, elastin, fibronectin, gelatin에 대한 효소작용이 있다.^{5,6} 한편, ocular rosacea 같은 외안부 염증질환이 있는 환자의 눈물에서 MMP-9의 활성이 증가된 소견이 밝혀진 바 있다.⁸

TNF-alpha는 강력한 pro-inflammatory cytokine으로서 염증반응의 매개체로 작용하며, 류마티스 관절염, 폐혈성 쇼크, Crohn's disease, polyarteritis nodosa등의 많은 염증성 질환과의 관련성이 알려져 있다. 이러한 TNF-alpha는 만성염증이 있

<접수일 : 2003년 12월 24일, 심사통과일 : 2004년 4월 14일>

통신저자 : 서 경 률

서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 신촌세브란스병원 안과
Tel: 02-361-8450, Fax: 02-312-0541
E-mail: seoky@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 논문은 연세대학교 의과대학에서 시행하는 신진교수연구비에 지원을 받았음. (승인번호:2003-16)

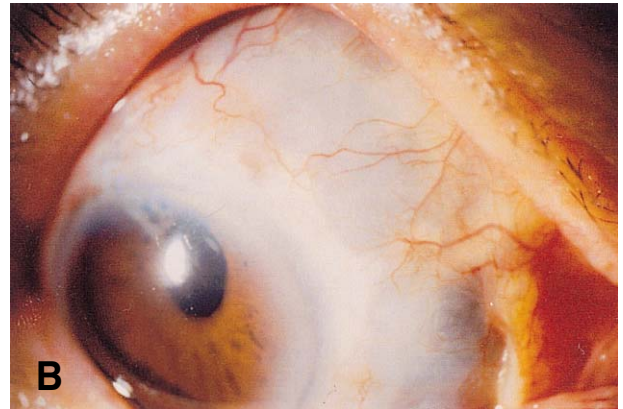
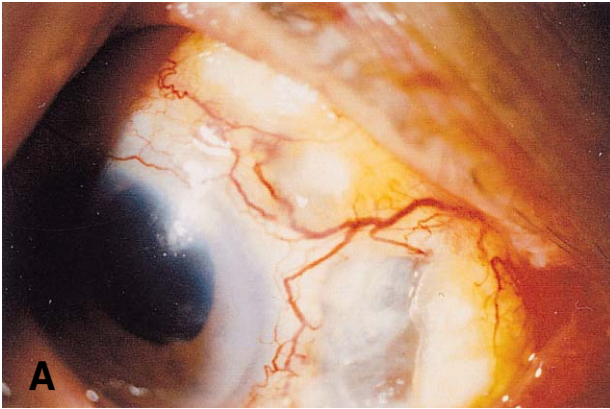


Figure 1. (A) Slit lamp photograph of patient 1 before treatment, showing marked necrotized sclera in the nasal side of right eye with injection and necrosis of adjacent conjunctiva and sclera. (B) One month after IV methylprednisolone treatment, the necrotized defect in the nasal sclera was healed and covered with conjunctiva. Surrounding inflammation was markedly decreased.

는 안구의 눈물 및 안구표면에 있는 염증세포의 세포질에서 발견된다.⁹

본 연구는 익상편 수술 후 괴사성 공막염이 발생한 환자의 눈물과 공막조직에서 TNF-alpha 및 MMP-9의 정량분석을 시행하여 이 병에 대한 분자생물학적 기전을 밝히고 그를 바탕으로 치료방법을 모색하고자 하였다.

대상과 방법

익상편 절제술 후 발생한 괴사성 공막염으로 내원한 세 환자의 눈물과 공막조직에서 MMP-9와 TNF-alpha의 정량분석을 시행하였다.

증례 1

9년 전 우안 익상편 절제술, 8년 전 백내장 적출술을 시행 받은 71세 여자환자로, 초진당시 세극등 검사상 비측의 가로2mm, 세로5mm 크기의 공막 괴사가 주변 결막 충혈과 동반되어 있었다. 4주간 전신적 부신피질호르몬제, cyclophosphamide, ofloxacin 점안제, 자가혈청 점안제로 치료하였으나 기존의 괴사병변은 증가하였고 상측과 하측 limbus 근처에 새로운 공막괴사병변이 발생하였다(Fig. 1A). 고용량 부신피질호르몬제(1000mg/day methylprednisolone for three day) 정맥투여를 위해 입원하여 1주간 경과 관찰한 결과, 공막 괴사 병변은 점진적으로 호전되었으며, 주변의 결막염증도 감소되었다. 치료 한 달 후 괴사된 공막은 염증 없이 완전히 재생되었다(Fig. 1B).

증례 2

10년 전 익상편 절제술을 시행 받은 65세 여자환자로, 초진당시 공막괴사가 진행되어 기저부위에 맥락막이 비쳐 보이는 상태였다. 전신적 부신피질호르몬제 치료로 괴사병변은 치유되었고 7주후에 재상피화가 되었다.

증례 1과 2에서 세균 및 fungus 배양 검사는 모두 음성하였고, 치료 전과 후 모두에서 눈물표본을 채취하였다.

증례 3

1년 전 익상편 절제술을 시행 받고 5개월간 안통이 있었던 53세 여자환자로, 초진 시 가로4.5mm, 세로 3.5mm 크기의 공막 천공이 주변의 공막 괴사와 동반되어 있었으며, 이미 타병원에서 전신적 부신피질호르몬제 치료와 결막편 수술(conjunctival flap surgery)을 시행 받은 상태였다. 본원에서는 동종 공막이식 및 양막 이식(amniotic membrane transplantation)을 시행하였다. 괴사된 공막 조직 및 결막에서 TNF-alpha 와 MMP-9를 Western blots으로 분석하였다.

눈물과 공막 조직의 채취

증례 1과 2에서 눈물은 세극등 하에서 10 mm polyester rods(Transrb[□], America Filtrona Company, Richmond, VA)를 사용하여 하외측 눈물층으로부터 조심스럽게 채취하였다. 대조군으로서 환자의 건강한 반대편 안구로부터 같은 방법으로 눈물을

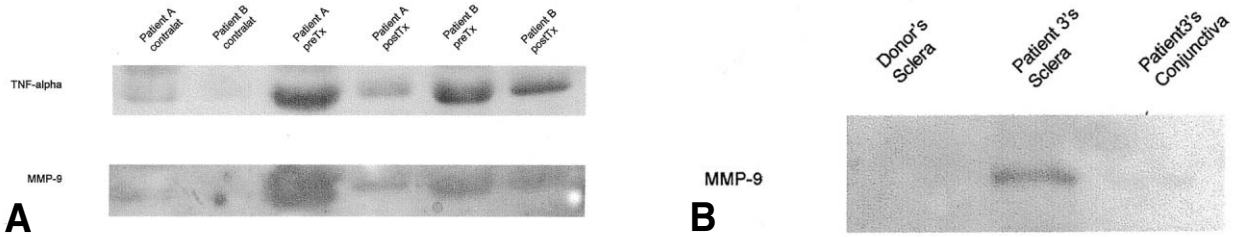


Figure 2. (A) Western blot analysis of the patients (case1=patient A and case2=patient B) with necrotizing scleritis after pterygium excision. Before treatment with corticosteroid, patients' tear samples showed an increase in the express of TNF-alpha and MMP-9 compared to those of contralateral eyes. After treatment, the expression of TNF-alpha and MMP-9 was decreased compared to those of pre-treated tear samples in both patients. (B) Analysis of case 3 (=patient 3) with perforated sclera by necrotizing scleritis after pterygium excision. The patient's sclera showed an increase in the expression of MMP-9 compared to that of the donor's sclera or the patient's conjunctiva.

채취 하였다. 채취된 눈물은 4°C에서 13000 g으로 10 ~ 15분간 원심분리하였다.

증례 3에서 수술 중에 채취한 공막과 결막조직은 lysis buffer에 보관되었다.

film, ECL recycling kit; Amersham Biosciences Corp.)에 노출되었다. 띠의 크기는 영상 편집 프로그램(Image ver. 4.1; Scion, Frederick, MD)을 사용하여 측정하였다.

Western blot

Western blot 분석을 위해 MMP-9에 대한 토끼 항체(Triple point Biologics, Inc, Forest Grove, OR)와 TNF-alpha에 대한 쥐 항체(Triple point Biologics, Inc, Forest Grove, OR)가 사용되었다.

공막조직은 10mL Tris-buffered saline(TBS; 10mM Tris-HCl(pH7.4), 5mM EDTA, and 5mM EGTA) 내에서 균질화 되었고, 4°C에서 15분간 12000 g 으로 원심분리 하였으며 다시 4M urea와 5mM Tris (pH9.5)에서 재부유 되었다. 이러한 과정이 3차례 반복 되었고, 마지막 pellet은 5mM Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA, 2mM EGTA, 100mM NaCl의 혼합액 100 µL에 재부유 되었다. 단백질은 10% SDS 폴리악릴아마이드 젤에서 nitrocellulose membrane으로 옮겨져 170mA로 90분간 전기영동에 의해 분리되었다. Membrane은 blocking solution (1% BSA and 0.1% Tween 20 in 1x TBS)안에 실은 하에서 하루 밤 동안 배양한 후, 1:1000으로 희석된 토끼의 항MMP-9항체와 항TNF-alpha항체에서 각각 2시간동안 배양하였고, 마지막으로 1:1000으로 희석된 streptavidin horseradish peroxidase(Amersham Biosciences Corp.)에서 1시간동안 배양하였다. 각각의 배양 후에 membrane을 3차례 물로 헹구어내고 1x TBS에서 15분간 3차례 씻어내었다. MMP-9와 TNF-alpha의 존재는 화학형광에 의해 감지되었고 자가방사선 필름(Hyper-

결 과

증례 1과 2의 환자에서는 대조군(건강한 반대편 눈)에 비교할 때 괴사성 공막염이 있는 눈에서 채취한 눈물표본에서 TNF-alpha와 MMP-9 모두가 증가되었다. 또한 치료 전과 비교할 때 치료 후에 TNF-alpha와 MMP-9 모두 감소되었다(Fig. 2A). 증례3환자에서 공막이식공여자의 공막 및 환자의 결막과 비교할 때 괴사된 공막표본에서 MMP-9의 증가가 관찰되었으나 (Fig. 2B) TNF-alpha는 검출되지 않았다.

고 찰

본 연구를 통해 익상편 절제술 후 괴사성 공막염이 합병된 환자의 눈물에서 공막염의 임상경과에 따라 TNF-alpha와 MMP-9가 동시에 변한다는 사실을 발견하게 되었다.

MMP-9은 세포외기질을 분해하고 재형성하는 효소로서 공막 섬유아세포와 공막염의 염증세포내에 존재한다.^{5,6} TNF-alpha는 많은 조직에서 MMP-9 발현을 유도하는 역할을 하며, 염증세포의 세포질과 안질환이 있는 환자의 눈물 내에서 발견된다.⁵⁻⁷

본 연구의 결과, 부신피질호르몬제와 면역억제제의 사용 후 TNF-alpha가 감소되는 점으로 미루어 볼 때, 이들 약제에 의해 괴사성 공막염에 있어서 염증세포의 침윤이 조절될 수 있음을 유추할 수 있다.

최근에는 통상적인 면역억제치료에 반응하지 않는

만성 염증성 질환과 염증성 안질환에서 TNF-pathway를 선택적으로 억제하는 infliximab, etanercept 등의 약제를 사용하여 효과가 나타났다는 연구결과가 보고되고 있다.^{10,11} 또한, Tristaniopsis calobuxus의 껍질에서 추출된 polyphenolic compound가 MMP-9의 활성 및 유전자 발현을 억제한다는 연구결과가 보고되고 있어, 괴사성 공막염의 또 다른 치료적 접근의 가능성이 제기되고 있다.¹²

증례3에서, 괴사된 공막 조직 내에 TNF-alpha의 증가를 예상했지만, 예상과는 다르게 TNF-alpha가 검출되지 않았다. 그러나 MMP-9이 증가하였다는 사실은 공막염에서 증가된 염증세포에서 방출된 cytokine에 의한 자극으로 인한 결과임을 고려할 때, 염증세포 내에 많이 존재하는 TNF-alpha가 검출되지 않은 것은 수술 전에 괴사된 부위의 세척으로 인하여 염증세포가 감소되어 나타난 결과로 생각된다.

본 연구 결과, 비감염성 괴사성 공막염의 병인으로 cytokine과 연관된 염증반응이 관계가 있다는 사실을 알 수 있었다. 국내에서도 한과 위¹³가 군날개절제술 후 발생한 괴사성공막염 환자에서 수술적 치료 없이 면역억제요법만으로 좋은 치료 효과를 얻었다는 보고를 한 바 있다. 이러한 일련의 사실들은 시력에 지대한 영향을 미칠 수 있는 이 병의 진행을 막는데 있어서 부신피질호르몬제와 면역억제제가 도움이 될 수 있음을 시사해주고 있다. 단, 그러한 약제의 사용에 있어서 미생물 배양검사상 음성임을 확인하는 것이 전제조건으로 만족되어야 할 것이며 기회감염의 가능성에 대한 주의 또한 필요할 것이다. 한편, 선택적으로 TNF-pathway 또는 MMP-9를 억제하는 약제를 사용한 치료에 대한 연구가 활성화 된다면 괴사성 공막염에 대한 치료의 다양화에 고무적인 일이 될 것이다.

참고문헌

1) Sridhar MS, Banasal AK, Rao GN. Surgically induced

necrotizing scleritis after pterygium excision and conjunctival autograft. *Cornea* 2002;21:305-7.

2) O'Donoghue E, Lightman S, Tuft S, Watson P. Surgically induced necrotizing scleritis - precipitating factors and response to treatment. *Br J Ophth* 1992;76:17-21.

3) De la Maza MS, Foster CS. Necrotizing scleritis after ocular surgery: a clinicopathologic study. *Ophthalmology* 1991;98:1720-6.

4) 김재호. 익상편절제술후의 괴사성 공막염 병발에 대한 공막이식. *한안지* 1982;23:29-39.

5) Wong TT, Sethi C, Daniels JT, et al. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv Ophthalmol* 2002;47:239-56.

6) Di Girolamo N, Lloyd A, McCluskey P, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases in vivo in scleritis tissue and in vitro in cultured human scleral fibroblasts. *Am J Pathol* 1997;150:653-66.

7) Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 1996;157:4159-65.

8) Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 2001;85:147-53.

9) Di Girolamo N, Visvanathan K, Lloyd A, Wakefield D. Expression of TNF -alpha by human plasma cells in chronic inflammation. *J Leukoc Biol* 1997;61:667-78.

10) Smith JR, Levinson RD, Holland GN, et al. Differential efficacy of tumor necrosis factor inhibition in the management of inflammatory eye disease and associated rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001;45:252-7.

11) Aeberli D, Oertle S, Mauron H, et al. Inhibition of the TNF-pathway; use of infliximab and etanercept as remission-inducing agent in cases of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med Wkly* 2002;27:414-22.

12) Bellasta S, Dell'Agli M, Canavesi M, et al. Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of Tristaniopsis calobuxus(Myrtaceae). *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1440-8.

13) 한영근, 위원량. 군날개절제술 후 발생한 괴사성공막염에 대한 면역억제제를 이용한 치료. *한안지* 2003;44:272-7.

=ABSTRACT=

Increased Tear TNF-alpha and MMP-9 in Patients with Necrotizing Scleritis after Pterygium Excision

Jung Chul. Shin, M.D., Chan Young Im, M.D.,
Joon H. Lee, Ph.D., Kyoung Yul Seo, M.D.

*Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine
Institute of Vision Research*

Purpose: We collected tear or scleral tissues of necrotizing scleritis after pterygium excision, and evaluated them for tumor necrosis factor (TNF)-alpha and matrix metalloproteinase (MMP)-9 to elucidate the molecular basis and seek for treatment of this disease.

Methods: Three patients with necrotizing scleritis after pterygium excision were evaluated for MMP-9 and TNF-alpha in tear and scleral tissue by Western blot analysis.

Results: Before treatment with corticosteroid, the patients' tear samples showed increased expression of TNF-alpha and MMP-9 compared to those of the contralateral eye. After treatment, the expression of TNF-alpha and MMP-9 was decreased compared to those of the pre-treated tear samples. The patients' sclera showed increased expression of MMP-9 compared to that of the donors' sclera and the patients' conjunctiva.

Conclusions: Our results suggest that cytokine-related inflammation plays a role in the pathophysiology of necrotizing scleritis and strongly supports, under the guarantee of negative microbiological culture, the prompt use of corticosteroid and immunosuppressive agents to help suppress the progression of this disease.

J Korean Ophthalmol Soc 45(5):720-724, 2004

Key Words: Corticosteroid, Matrix metalloproteinase-9, Necrotizing scleritis, Tumor necrosis factor-alpha

Address reprint requests to **Kyoung Yul Seo, M.D.**

Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University college of Medicine

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

Tel: 82-2-361-8450, Fax: 82-2-312-0541, E-mail: seoky@yumc.yonsei.ac.kr