군날개의 노화 관련 표지자 발현과 세포노화 확인

Cellular Senescence in Pterygium

김종헌 · 이수진 · 이규원 · 김재찬

Jong Heon Kim, MD, Soo Jin Lee, MD, Kyoo Won Lee, MD, PhD, Jae Chan Kim, MD, PhD

제일안과병원 안의학연구소

Cheil Eye Research Institute, Cheil Eye Hospital, Daegu, Korea

Purpose: To determine cellular senescence in pterygium by studying the expression of senescence-related markers.

Methods: Impression cytology was performed on 28 eyes of 28 patients diagnosed with pterygium or pinguecula from August 2019 to January 2020. From the obtained specimen, the expression of senescence-associated beta galactosidase (SA- β -gal), p16, and interleukin (IL)-1 β was examined.

Results: The average percentage of SA- β -gal positive cells was significantly higher for the pterygium group ($67.63 \pm 16.61\%$) compared to the control group ($32.64 \pm 8.98\%$) ($p < 0.01$). The fluorescent expression intensity of IL-1 β was higher in the pterygium group (22.53 ± 19.21) compared to the control group (11.38 ± 6.30) ($p = 0.02$), and the p16 fluorescence expression intensity was also higher in the pterygium group, showing 42.79 ± 23.65 , compared to the control group values (26.73 ± 18.34) ($p = 0.01$).

Conclusions: Cellular senescence specific markers, SA- β -gal, IL-1 β , and p16, were expressed in pterygium, indicating a new possible framework for the development and progression of pterygium.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(8):861-867

Keywords: Cellular senescence, Interleukin (IL)-1 β , p16, Pterygium, Senescence-associated beta galactosidase

세포노화(cellular senescence)는 비가역적인 세포주기의 정지(cell cycle arrest)로 세포 내 항상성을 저해시키고 노화연관분비표현형(senescence associated secretory phenotype, SASP)을 분비하여 조직 내 세포의 지속적 면역, 염증 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 노화세포는 세포주

기의 정지와 SASP를 통해 질병의 발병과 진행에 기여할 수 있으며, 눈에서는 백내장, 녹내장, 황반변성과 같은 노화 연관질환에서 발견된다.³⁻⁵ 군날개는 자외선과 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의해 지속적 스트레스에 노출되어 만성염증이 유발되고 형성 이상(dysplasia)이 발생하는 질환이며 연령이 증가할수록 군날개의 발병률이 높아진다고 알려져 있다.⁶ 이를 통해 세포노화가 군날개의 발병과 진행에 관련 있을 것으로 생각되지만 아직 군날개에서의 세포노화는 밝혀진 바 없다.

Senescence-associated beta galactosidase (SA- β -gal)와 p16 단백질은 세포노화의 생물학적 표지자이며 interleukin (IL)-1 β 는 SASP 중 사이토카인의 일종으로서 노화세포에서 발현된다.⁴ Dimri et al⁷은 pH 6에서 최적의 활성도를 가지는 SA- β -gal을 밝혔고 이는 노화에 의해서 발현되며 노화 세포의 존재를 입증해준다. p16은 cyclin-dependent kinase 4

■ Received: 2020. 1. 28. ■ Revised: 2020. 3. 7.

■ Accepted: 2020. 7. 29.

■ Address reprint requests to Jae Chan Kim, MD, PhD
Cheil Eye Hospital, #1 Ayang-ro, Dong-gu, Daegu 41196, Korea
Tel: 82-53-959-1751, Fax: 82-53-959-1758
E-mail: jck50ey@daum.net

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2017R1A2A2A05001128).

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

© 2020 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.

(CDK 4)와 CDK 6의 활성을 저해하여 세포주기 정지를 일으켜 세포노화를 유도한다.⁸ 염증유발인자, 성장인자, 단백질분해효소로 구성되는 SASP는 자가분비(autocrine) 혹은 측분비(paracrine)의 신호 전달을 하는데, 이 중 IL-1 β 는 측분비신호전달(paracrine signaling)로 노화를 유발하는 대표적인 사이토카인이다.^{9,10}

본 연구에서는 이러한 세포노화의 생물학적 표지자들을 이용하여 군날개 세포에서 세포노화를 확인하고자 한다. 이를 바탕으로 최근 활발히 연구되고 있는 senolytic agent를 이용하여 노화세포를 제거하는 새로운 치료 전략을 군날개 치료에 적용하는 데 도움이 되고자 한다.^{11,12}

대상과 방법

2019년 8월부터 2020년 1월까지 본원에 내원하여 군날개 혹은 검열반 진단을 받은 환자 38명 38안을 대상으로 impression cytology를 실시하였고 이 중 cytology specimen이 판독하기 어려운 경우를 제외한 나머지 28명 28안을 대상으로 결과를 분석하였다. 대상 환자 모두에서 병력청취 및 세극등현미경검사를 시행하여 병변을 검열반과 군날개로 분류하였고 군날개 병변은 원발성과 재발성으로 분류하였다. 본 연구는 모든 과정에서 헬싱키선언(Declaration of Helsinki)을 준수하고 모든 환자의 동의를 얻어 검체를 채취하였으며 본원 연구윤리심의위원회(Institutional Review

Board, IRB)의 승인을 받았다(승인 번호: CEH-2019-2).

모든 환자의 병변이 있는 눈에서 Tseng¹³이 기술한 방법을 바탕으로 impression cytology를 시행하였다. 우선 0.5% Proparacaine HCl (Alcaine®, Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, USA)로 점안 마취 후 5 × 7 mm 크기로 준비한 acetate cellular membrane의 뾰족한 끝 모서리를 smooth-end forcep으로 잡고 비측구결막에 존재하는 군날개 병변에 접하도록 하였다. 결막과 접촉한 acetate cellular membrane을 초자봉으로 약 2초간 가볍게 누르고 smooth-end forcep으로 뾰족한 끝을 잡아 떼어낸 후, 고정액(3% paraformaldehyde)에 검체를 5분간 담가 두었다. 대조군으로 해당안의 상측구결막에서 동일한 방법으로 impression cytology를 시행하여 고정액에 담가 두었다(Fig. 1). 검열반 및 원발, 재발 군날개 병변에서 채취한 검체를 군날개군으로 상측구결막에서 채취한 검체를 대조군으로 정하여 연구를 진행하였다.

노화된 세포에서 특징적으로 발현되는 SA- β -gal의 활성을 측정하기 위해 SPiDER- β Gal solution (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)을 이용하였다. 고정된 acetate cellular membrane을 1 μ M의 SPiDER- β Gal solution에 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 acetate cellular membrane을 슬라이드에 올리고 세포의 핵을 표지하기 위해 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 함유하는 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 mounting하였다. 이때 노화된 세포는 녹

Figure 1. Impression cytology using acetate cellulose membrane. (A) Pterygium lesion on the nasal bulbar conjunctiva. (B) Normal control on the superior bulbar conjunctiva.

색형광을 나타내므로 형광현미경으로 SA-β-gal 양성인 세포수와 전체 세포 수를 세어서 노화된 정도를 백분율로 표시하였다. 세포 수 측정은 한 명의 연구자(S.J.L)에 의해 검체에 대한 암행이 이루어진 상태로 시행되었고 400배 배율로 한 검체에서 서로 다른 세 부위의 세포 수를 세어 평균값을 사용하였다.

면역형광염색은 permeabilization을 위해 0.3% Triton X-100으로 7분간 상온 처리한 후 anti-p16 (rabbit IgG, diluted to 1:80 in PBS; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) 또는 anti-IL-1β (goat IgG, diluted to 1:50 in PBS; Bioworld Technology Co., Ltd., St. Louis Park, MN, USA)를 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 그 후 2차 항체(anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647, anti-goat IgG Alexa Fluor 594; Thermo Fisher Scientific., Waltham, MA, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 함유하는 Vectashield (Vector Laboratories)를 이용하여 mount-

ing하였다. 형광 이미지는 confocal laser scanning microscopy (LSM 800, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)로 확인하였다. 면역형광염색에서 검체 간 단백질 발현의 비교를 위해서 본 연구의 SA-β-gal 염색과 같이 전체 세포 수에 대한 양성 세포 수의 비를 비교하는 방법과 형광발현의 강도를 비교하는 방법이 있는데, p16과 IL-1β의 면역형광염색에서는 양성 세포 수 측정법으로는 검체 간 차이가 적어 형광발현의 강도를 ImageJ software로 측정하여 비교 분석하였다.¹⁴

통계처리를 위해 SPSS software ver. 18.0 (SPSS Inc., Chigaco, IL, USA)을 사용하였다. 군날개군과 대조군에서의 노화 관련 단백질 발현 분석을 위해 Mann-Whitney U-test를 사용하였으며, *p*값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Impression cytology를 시행하고 결과를 분석할 수 있었던 대상은 총 28안에서 얻은 대조군 검체 28개, 군날개군 28개이고 28안 중 검열받은 3안, 원발군날개는 21안, 재발 군날개는 4안이었다. 환자의 평균 나이는 59.93 ± 10.07 세 (46-78세)였고 남자가 12명, 여자가 16명이었으며 우안은 11안, 좌안은 17안이었다(Table 1).

28안 중 18안에서 얻은 대조군과 군날개군의 검체 36개에서 SA-β-gal 염색을 진행하였고, 대조군에서는 4개의 검체, 군날개군에서는 1개의 검체가 염색되지 않았고 염색되지 않았던 5개의 검체 중 3개가 검열받을 가진 눈에서 얻은 것이었다. IL-1β에 대한 형광염색은 18안, 36검체에서 진행하였는데, 대조군에서는 3개의 검체에서 형광발현이 없었으나 군날개군에서는 18개 검체 모두에서 형광발현을 보였다. p16에 대한 형광염색은 28안에서 얻은 모든 검체에서 하였으며 대조군과 군날개군 각각 하나의 검체를 제외하고

Table 1. Clinical and demographic features of 28 patients who were diagnosed with pterygium or pinguecula

Characteristic	Value
Lesion	
Pinguecula	3 (10.7)
Primary pterygium	21 (75.0)
Recurrent pterygium	4 (14.3)
Age (years)	59.93 ± 10.07
Pinguecula	61.33 ± 6.35
Primary pterygium	58.90 ± 9.89
Recurrent pterygium	60.00 ± 10.68
Sex	
Male	12 (42.9)
Female	16 (57.1)
Laterality	
Right	11 (39.3)
Left	17 (60.7)

Values are presented as mean $\pm$ standard deviation or number (%).

Table 2. Staining of SA-β-gal, IL-1β and p16 obtained from control and pterygium groups

	SA-β-gal (n = 18)		IL-1β (n = 18)		p16 (n = 28)	
	Stained	Not stained	Stained	Not stained	Stained	Not stained
Control group	14	4	15	3	27	1
Pinguecula	0	2	1	0	3	0
Primary pterygium	12	1	12	3	20	1
Recurrent pterygium	2	1	2	0	4	0
Pterygium group	17	1	18	0	27	1
Pinguecula	1	1	1	0	3	0
Primary pterygium	13	0	15	0	20	1
Recurrent pterygium	3	0	2	0	4	0

Values are presented as number.

SA-β-gal = senescence-associated beta galactosidase; IL-1β = interleukin-1β.

형광발현을 확인할 수 있었다(Table 2). 염색이나 형광발현이 확인되는 검체의 결과들로 분석을 실시하였다.

전체 세포 수에 대한 SA- β -gal 양성인 세포수의 평균 백분율은 군날개군에서 $67.63 \pm 16.61\%$, 대조군에서 $32.64 \pm 8.98\%$ 로 군날개군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 값을 나타냈다($p < 0.01$) (Fig. 2). IL-1 β 의 형광발현 강도는 군날개군에서 평균 22.53 ± 19.21 로 평균 11.38 ± 6.30 의 대조군에 비해 유의하게 높았으며($p = 0.02$), p16 형광발현에서도 군날개군과 대조군에서의 평균 발현 강도가 42.79 ± 23.65 , 26.73 ± 18.34 로 유의한 차이를 보였다($p = 0.01$) (Fig. 3). Fig. 4는 원발군날개를 가진 60세 여자 환자에서 얻은 검체로 대조군보다 군날개군 검체의 결과에서 SA- β -gal 염색양성과 IL-1 β , p16의 형광 발현이 높게 보이는 것을 확인할 수 있다.

군날개군에서 나이에 따른 형광염색 결과의 차이를 확인

Figure 2. Senescence-associated beta galactosidase (SA- β -gal) positive percentage of control and pterygium group. p -values were obtained by Mann-Whitney U test.

하기 위해 60세를 기준으로 나이가 많은 군(60세 이상, 14명)과 적은 군(60세 미만, 14명)으로 나누어 확인한 결과 IL-1 β 에서 나이가 적은 군이 많은 군에 비해 유의하게 형광 발현이 높게 보였으나($p = 0.02$) SA- β -gal, p16에서는 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.56$, $p = 0.81$). 세극등검사를 이용하여 각막윤부에서 군날개 두부의 정점까지 길이를 측정하고 2.0 mm 기준으로 크기가 작은 군(2.0 mm 이하)과 큰 군(2.0 mm 초과)으로 나누어 군날개군에서 형광염색 정도를 알아본 결과 SA- β -gal, IL-1 β , p16 모두 군날개 크기에 따른 염색 정도는 유의한 차이가 없었다($p = 0.37$, $p = 0.12$, $p = 0.70$).

고 찰

군날개의 발생기전에 대해서는 다양한 가설이 제기되어 왔다. 자외선 노출, 바이러스 감염, 산화 스트레스, 섬유화, 염증 반응, 세포사멸(apoptosis) 등이 제기되어왔으나 정확한 군날개 발생 기전에 대해서는 아직 정립되지 않았다.¹⁵⁻²⁰ Rodier and Campisi²¹는 세포노화의 특징으로 노화세포는 SA- β -gal을 발현하고, 종양 억제자인 p16을 발현하며, 지속적인 DNA 손상 회복 신호를 받아 SASP로 알려진 성장인자, 단백질분해효소, 사이토카인 등을 분비한다고 보고하였다. 본 연구에서는 세포노화에서 특징적으로 관찰되는 SA- β -gal, IL-1 β , p16을 군날개 병변에서의 impression cytology를 통하여 채취한 세포에서 확인할 수 있었고, 이를 근거로 이전까지 보고되지 않았던 군날개 발생의 새로운 기전으로서 세포노화를 제시하는 데 의미를 두었다.

군날개의 대표적인 원인인 자외선은 ROS의 생성을 야기하고 신체의 항산화 기전을 초과하는 ROS의 생성으로 산화스트레스(oxidative stress)가 발생한다.²² 노화세포에서는

Figure 3. (A) Fluorescence intensity of interleukin (IL)-1 β of control and pterygium group. (B) Fluorescence intensity of p16 of control and pterygium group. p -values were obtained by Mann-Whitney U test.

ROS 발생의 신호를 유도하고 그 결과 발생한 산화스트레스는 세포노화에 특이적인 세포주기를 정지하는 p16/Rb pathway 촉진시키게 된다.²³ 정상 결막에서 자외선 노출 후 발생한 산화스트레스는 세포주기를 정지시키는 세포노화의 작용을 일으키고 그 결과 군날개와 같은 병변이 발생할 것으로 생각한다.

Ramalho et al²⁴은 정상 결막 조직과 군날개 조직에서의 p16 발현을 비교한 결과 정상 조직에서는 p16 발현이 거의 나타나지 않았고 군날개 조직에서 p16이 과발현된다고 보고하였다. 본 연구 결과에서는 대조군으로 설정한 병변이 없는 결막에서 채취한 검체에서도 p16 발현이 28개 중 27개 검체에서 나타났고, SA- β -gal, IL-1 β 또한 대조군에서 대부분 그 발현을 확인할 수 있었다(Table 2). 이는 Ramalho et al²⁴이 정상 결막 조직을 군날개가 없는 백내장수술 환자의 결막에서 얻은 데에 반하여, 본 연구에서는 군날개가 있는 환자의 병변이 있는 눈에서 대조군 검체를 얻은 차이로 인한 결과로 생각된다. 군날개가 발생한 눈은 병변이 없는 부위에서도 이미 자외선으로 인한 ROS로 세포노화가 진행되고 있음을 가정할 수 있다. 단 위아래 결막의 경우 눈꺼풀에 의해 자외선 노출이 코쪽과 귀쪽 결막에 비해 적고 코쪽 각막으로 들어오는 자외선이 코에 의해 일부 차단되어 귀쪽 결막에 도달하는 것과 달리 귀쪽 각막으로 들어오는 자외선은 차단 없이 코쪽 결막에 집중될 수 있다.¹⁵ 코쪽 결막

이 다른 부위 결막보다 자외선에 많이 노출되어 손상이 심하고 세포노화의 진행이 심하여 군날개가 자라는 것이다.

검열반 검체의 실험에서는 SA- β -gal 염색을 시행한 대조군 2개의 검체 모두에서 음성을 보였고 병변조직 검체 또한 1개의 검체에서 음성 결과를 보였다. Gao et al²⁵은 골관절염에서 질환의 중증도가 심할수록 SA- β -gal 발현이 증가된다고 하였고, 이는 본 연구의 군날개에도 적용 가능할 것으로 생각된다. 대상 수가 적어 결론을 내리기는 힘들지만 군날개가 진행할수록 세포노화의 진행이 활발할 것으로 추측하며 SA- β -gal과 같은 노화 관련 표지자들을 이용하여 질환 진행의 정도를 예측할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 연구 대상 수가 적어 질환의 진행에 따른 세포노화의 정도를 입증하기 힘들었다. 더 많은 수를 대상으로 하는 대규모 집단의 연구가 필요하며, 본 연구에서 제시한 SA- β -gal, IL-1 β , p16 외 세포노화에서 보이는 다양한 유전자, 단백질 등을 군날개에서 밝혀낸다면 군날개 발생과 진행에 있어 세포노화의 기전을 정립할 수 있을 것이라 생각한다. 또한 군날개뿐만 아니라 안구표면질환에서도 세포노화에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

지금까지 군날개의 근본적인 치료는 수술적 제거술로 자가결막 이식과 양막 이식이 널리 행해지고 있지만 재발과 이식편 괴사, 육아종 형성과 같은 부작용의 빈도가 높을 수 있어 치료는 한계가 있다.²⁶ 이런 합병증을 막기 위한 다양한

Figure 4. Confocal image of 60 years female who was diagnosed with primary pterygium. 4',6-diamidino-2-phenylindole staining of specimen from pterygium lesion (A) and control conjunctiva (E). Senescence-associated beta galactosidase staining of specimen from pterygium lesion (B) and control conjunctiva (F). Interleukin-1 β staining of specimen from pterygium lesion (C) and control conjunctiva (G). p16 staining of specimen from pterygium lesion (D) and control conjunctiva (H). Original bar length 20 μ m.

노력이 있었지만 술 후 재발은 여전히 흔하다.²⁷ 따라서 군 날개에서의 세포노화의 기전을 증명한다면 노화세포를 목표로 하는 senolytic agent를 이용한 군날개 치료의 새로운 접근법을 기대해 볼 수 있을 것이다.²⁸⁻³⁰ 결론적으로 본 연구는 군날개에서 세포노화에 특징적으로 발견되는 SA- β -gal, IL-1 β , p16의 발현을 확인할 수 있었고, 이는 군날개 발생과 진행에 있어 세포노화라는 새로운 기전의 정립에 도움이 될 것이라 기대된다.

REFERENCES

- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008;6:2853-68.
- Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013;123:966-72.
- Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:482-96.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 2015;21:1424-35.
- Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM. Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93:105-16.
- Song P, Chang X, Wang M, An L. Variations of pterygium prevalence by age, gender and geographic characteristics in China: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0174587.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:961-76.
- Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* 2012;4:932-51.
- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013;15:978-90.
- Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today* 2017;22:786-95.
- Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 2017;169:132-47.e16.
- Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-33.
- Kim SJ, Koo HM, Lim BJ, et al. Decreased circulating C3 levels and mesangial C3 deposition predict renal outcome in patients with IgA nephropathy. *PLoS One* 2017;7:e40495.
- Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:734-9.
- Chalkia AK, Spandidos DA, Detorakis ET. Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med* 2013;32:539-43.
- Balci M, Sahin S, Mutlu FM, et al. Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Mol Vis* 2011;17:443-7.
- Chiang CC, Cheng YW, Lin CL, et al. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis* 2007;13:635-8.
- Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3430-7.
- Tan DT, Tang WY, Liu YP, et al. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000;84:212-6.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011;192:547-56.
- de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Adv Exp Med Biol* 2017;996:15-23.
- Sasaki M, Kajiya H, Ozeki S, et al. Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16(INK4a). *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:622-8.
- Ramalho FS, Maestri C, Ramalho LN, et al. Expression of p63 and p16 in primary and recurrent pterygia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:1310-4.
- Gao SG, Zeng C, Li LJ, et al. Correlation between senescence-associated beta-galactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis* 2016;19:226-32.
- Akbari M, Soltani-Moghadam R, Elmi R, Kazemnejad E. Comparison of free conjunctival autograft versus amniotic membrane transplantation for pterygium surgery. *J Curr Ophthalmol* 2017;29:282-6.
- Lee JS, Ha SW, Yu S, et al. Efficacy and safety of a large conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Korean J Ophthalmol* 2017;31:469-78.
- Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015;14:644-58.
- Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* 2017;9:955-63.
- Wang Y, Chang J, Liu X, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY)* 2016;8:2915-26.

= 국문초록 =

군날개의 노화 관련 표지자 발현과 세포노화 확인

목적: 군날개에서 노화 관련 표지자의 발현을 확인하여 세포노화를 밝히고자 한다.

대상과 방법: 2019년 8월부터 2020년 1월까지 본원에서 군날개 혹은 검열반 진단을 받은 환자 28명 28안을 대상으로 impression cytology를 실시하여 얻은 검체에서 senescence-associated beta galactosidase (SA-β-gal)의 활성과, p16, interleukin-1β (IL-1β)의 발현 강도를 확인하였다.

결과: 전체 세포 수에 대한 SA-β-gal 양성인 세포수의 평균 백분율은 군날개군에서 $67.63 \pm 16.61\%$, 대조군에서 $32.64 \pm 8.98\%$ 로 군날개군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 값을 나타냈다($p < 0.01$). IL-1β의 형광발현 강도는 군날개군에서 평균 22.53 ± 19.21 로 평균 11.38 ± 6.30 의 대조군에 비해 유의하게 높았으며($p = 0.02$), p16 형광발현에서도 군날개군과 대조군에서의 평균 발현 강도가 42.79 ± 23.65 , 26.73 ± 18.34 로 유의한 차이를 보였다($p = 0.01$).

결론: 군날개에서 노화세포에 특징적으로 발견되는 SA-β-gal, IL-1β, p16의 발현을 확인할 수 있었고 이는 군날개 발생과 진행에 있어 세포노화라는 새로운 기전의 정립에 도움이 될 것이라 기대한다.

〈대한안과학회지 2020;61(8):861-867〉

김종헌 / Jong Heon Kim

제일안과병원 안의학연구소
Cheil Eye Research Institute,
Cheil Eye Hospital