

섬유아세포의 이동과 교원질 겔의 수축에 미치는 일산화질소의 영향

이정일 · 이수윤 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적 : 일산화질소(Nitric oxide, NO)가 섬유아세포의 이동과 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.
대상과 방법 : 사람의 테논낭 섬유아세포를 일차배양하여 인공상흔을 만든 후, sodium nitropusside (SNP)와 S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), dexamethasone에 5일간 노출시켜 세포이동성검사를 시행하였고, 섬유아세포를 교원질 겔 내에 봉입하여 수축성검사를 시행하였다. 세포의 생존은 MTT assay로 NO의 생성은 Griess assay로 조사하였다.

결과 : 두 NO 제공자는 세포의 생존을 억제하였으나 dexamethasone은 영향을 미치지 않았다. SNP는 농도에 비례하여 세포이동을 억제하였고 교원질 겔의 수축을 촉진시켰으나 SNAP은 영향을 미치지 않았다. Dexamethasone은 세포이동을 억제하였으나 콜라겐 겔의 수축에는 영향을 미치지 않았다.

결론 : SNP는 배양된 섬유아세포의 이동을 억제하고 교원질 겔의 수축을 촉진시켰으나 SNAP은 영향을 미치지 않았다. NO 제공자가 섬유아세포에 의한 창상치유에 미치는 영향은 NO 제공자의 종류에 따라 효과가 다르게 나타날 수 있다.

〈한안지 49(4):661-668, 2008〉

섬유아세포는 창상치유에 중요한 역할을 하는데 섬유주절제술 실패의 가장 흔한 원인은 섬유아세포의 증식에 의한 결막하 섬유화로 알려져 있다.^{1,2} 섬유아세포는 섬유주절제술 후 창상치유에 중요한 역할을 하므로 섬유아세포가 창상치유에 미치는 영향과 기전에 관한 많은 연구가 이루어 졌으며 또한 섬유주절제술의 성공율을 높이기 위해 항대사제를 비롯한 다양한 약물을 이용하여 섬유아세포의 활성을 억제하여 창상 치유를 조절하고 있다.³

일산화질소(nitric oxide, NO)는 자유유리기로 생체막을 투과하여 내피세포에서의 이완작용, 신경계에서의 조절작용, 면역계에서의 면역매개물질 등의 생체에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고^{4,5} 안구 내에서 다양한 조직에서 발견되며⁶ 생리적인 매개체일 뿐만 아니라 다양한 병리적 역할을 나타내어 녹내장을 유

발하는 기전의 한 가지로도 알려져 있다.⁷⁻⁹ NO는 세포의 종류에 따라 세포의 생존에 다양한 역할을 나타낼 수 있으며 창상치유에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 창상치유의 과정에 있어서 섬유아세포의 이동과 교원질의 수축이 중요한 역할을 하는데 사람의 테논낭 섬유아세포의 경우 이에 대한 NO의 영향은 아직 자세히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 사람의 테논낭 섬유아세포를 일차배양하여 NO 제공자들에 노출시킨 후 NO 제공자가 섬유아세포의 이동에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또한 창상치유의 단계에 있어서 교원질의 성숙과 수축이 중요한 작용을 하므로 교원질 겔을 합성하여 섬유아세포를 봉입하여 배양한 후 NO 제공자에 노출시켜 NO 제공자가 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

〈접수일 : 2007년 4월 23일, 심사통과일 : 2007년 10월 10일〉

통신저자 : 김 재 우
대구시 남구 대명4동 3056-6
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

대상과 방법

1. 세포배양

환자의 허락 하에 다른 안질환이나 안수술력이 없었던 53세 남자 환자의 백내장 수술 도중 테논낭 일부를

절제하여 일차배양하였다. 먼저 테논탕 조직을 염류용액(phosphate buffered saline, Gibco, USA) 용액으로 세척한 후 10%의 혈청이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco, USA)을 배지로 하여 5% CO₂ 배양기에서 일차배양하였다. 세포가 조직 주위로 자라나오는 것을 확인한 후 조직을 제거하고 배양을 계속하여 세포가 배양접시에 충만해지면 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, USA)를 이용하여 계대배양하였다.

2. 약물처리

배양된 섬유아세포를 트립신 처리하고 12-well plate에 분주하여 하룻동안 부착시킨 후 NO 제공자인 10, 100 μ M의 sodium nitroprusside (SNP, Sigma, USA)와 S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, Sigma, USA)에 각각 3일간 노출시켜 세포의 생존과 NO의 생성을 조사하였으며, 10, 100 μ M의 dexamethasone에도 노출시켜 NO 제공자의 효과와 비교하였다. 또한 위의 세 가지 약물을 10, 100 μ M의 농도로 배양된 섬유아세포에 5일간 노출시켜 세포이동성과 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 조사하였다.

3. MTT assay와 Griess assay

NO 제공자가 섬유아세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였다.¹² 섬유아세포를 각 농도의 NO 제공자에 노출시켜 3일간 배양한 다음, 각 배지에 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양하였다. 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, USA)를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 μ l씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. NO의 생성은 NO의 대사물인 아질산염(nitrite)의 양을 측정하는 Griess assay를 이용하였는데¹³ NO 제공자를 처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma, USA)를 섞은 후 96-well 배양접시에 옮겨 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선을 구하기 위해 상용의 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

4. 세포 이동성 실험(Migration assay)

NO 제공자가 섬유아세포의 이동성에 미치는 영향을 알아보기 위해 wound migration assay를 변형하여 시행하였다.¹¹ 세포의 부착을 막기 위해 지름 10 mm의 원형 디스크를 12-well plate의 바닥에 부착시킨 다음 트립신 처리한 배양된 섬유아세포를 12-well plate에 5시간 동안 분주하여 부착시킨 후 원형 디스크를 제거한 다음 신선한 배지로 교환하고 나서 약물처리를 하여 정치배양하였다. 그 다음 눈금이 새겨진 격자판을 이용하여 제거된 원형 디스크 부위 안쪽으로 섬유아세포가 자라 들어온 길이를 네 군데에서 평균치를 5일간 측정하여 기록하였다. 또한 5일 동안의 세포의 평균이동거리를 시간으로 나누어 섬유아세포의 이동속도도 함께 측정하였다.

5. 교원질 겔의 제작과 수축성 실험(Collagen gel contraction assay)

쥐의 꼬리에 있는 힘줄에서 추출한 교원질 섬유에 0.1% glacial acetic acid (Sigma, USA)를 첨가하여 콜라겐 용액을 만들어 교원질 겔 수축성 실험을 시행하였다.¹⁴ 섬유아세포가 포함된 교원질 겔을 만들기 위하여 교원질 용액과 4배 농도의 DMEM 배지, 혈청, 그리고 세포부유액을 4:2:1:1의 비율로 섞은 후 24-well 배양접시에서 수분간 정치배양하여 굳힌 다음 (gelatinization) 12-well 배양접시로 옮긴 후 섬유아세포의 증식에 의한 영향을 배제하기 위하여 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 넣고 나서 같은 농도의 NO 제공자에 노출시켰다. 교원질 겔의 수축 정도를 알아보기 위하여 각각의 교원질 겔의 직경을 노출 후 5일 후에 각각 네 군데에서 측정하여 평균치를 기록하여 교원질 겔의 직경이 감소한 정도를 %로 나타내었다. 이때 교원질 겔의 수축이 교원질 자체의 감손(degradation)에 의한 것인지 구별하기 위하여 NO 제공자에 노출 전과 5일간 노출 후의 교원질 겔을 대상으로 교원질을 녹인 후 Bradford assay를 함께 시행하여 비교하였다.¹⁵

6. 통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물에 노출되지 않은 군으로 하였고 실험값은 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 이용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

1. NO 제공자가 섬유아세포의 생존과 NO의 생성에 미치는 영향

3일간 NO 제공자에 노출시킨 후 MTT assay로 세포의 생존율을 알아본 결과 SNP는 100 μ M의 농도에서 84.6%, 그리고 SNAP은 10 μ M과 100 μ M의 농도에서 약물처리를 하지 않은 대조군에 비해 90.1%, 84.6%로 세포의 생존이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 1). 한편 두 NO 제공자 모두 10 μ M과 100 μ M의 농도에서 배지에서 아질산염의 생성을 유의하게 증가시켰으나($p < 0.05$) dexamethasone은 세포의 생존과 NO의 생성에 유의한 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$, Fig. 2).

2. NO 제공자가 섬유아세포의 이동에 미치는 영향

SNP는 3일째부터 10, 100 μ M의 농도 모두에서 약물처리를 하지 않은 대조군에 비해 세포의 이동거리를

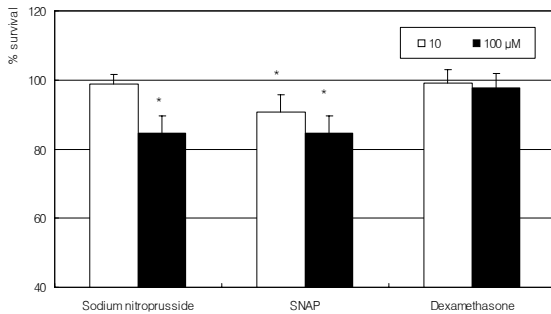


Figure 1. Effect of NO donors and dexamethasone on the survival of fibroblasts. NO donors decreased cellular survival in a dose-dependent manner compared to non-exposed control. (*; $p < 0.05$)

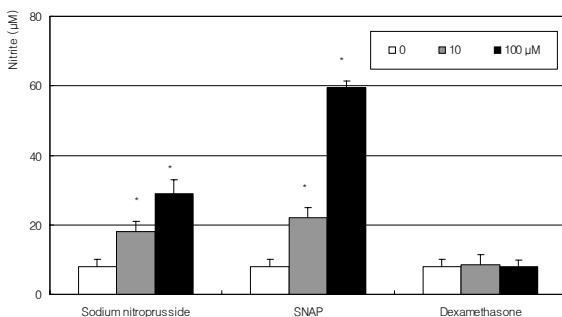


Figure 2. Effect of NO donors on the production of nitric oxide. Both NO donor increased NO in a dose-dependent manner. (*; $p < 0.05$)

500 μ m이하로 유의하게 감소시켰으나($p < 0.05$, Fig. 3) SNAP은 세포의 이동거리에 유의한 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$, Fig. 4). 또한 dexamethasone은 100 μ M의 농도에서는 3일째부터 그리고 10 μ M의 농도에서는 4일째부터 대조군에 비해 세포의 이동거리를 각각 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$, Fig. 5).

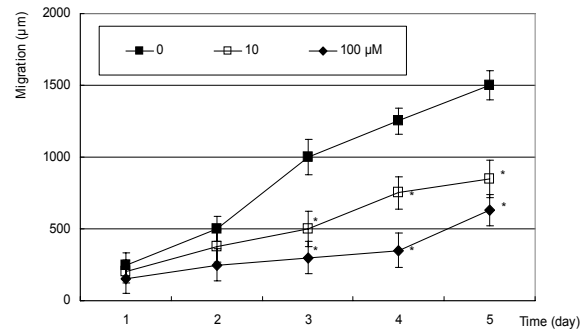


Figure 3. Effect of sodium nitroprusside on the migration of fibroblasts. Sodium nitroprusside inhibited migration of fibroblasts in a dose-dependent manner from 10 μ M of concentration after 3 days. (*; $p < 0.05$)

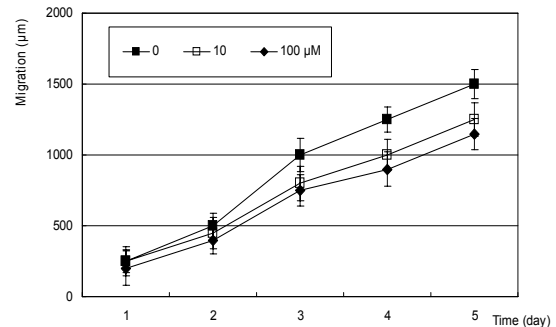


Figure 4. Effect of SNAP on the migration of fibroblasts. SNAP did not affect on the migration of fibroblasts up to 5 days compared to non-exposed controls.

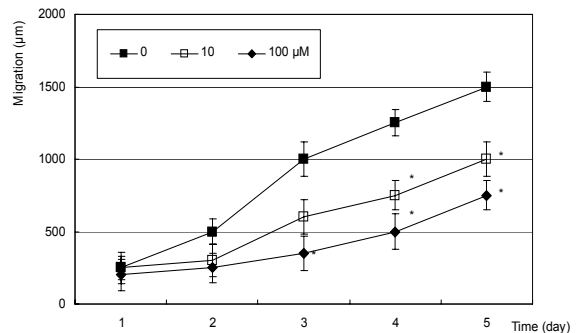


Figure 5. Effect of dexamethasone on the migration of fibroblasts. Dexamethasone inhibited the migration of fibroblasts after 4 days at 10 μ M and after 3 days at 100 μ M, compared to non-exposed controls. (*; $p < 0.05$)

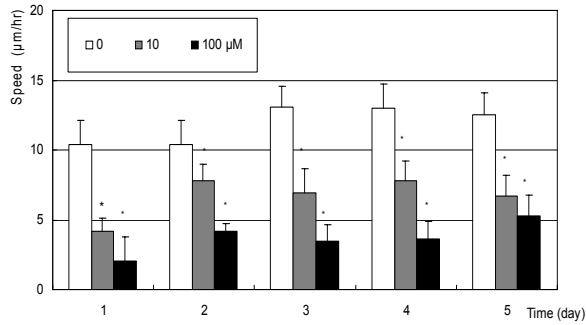


Figure 6. Effect of sodium nitroprusside on the speed of migration in cultured Tenon fibroblasts. Sodium nitroprusside decreased the speed of migration significantly compared to non-exposed control up to 5 days. (*; $p<0.05$)

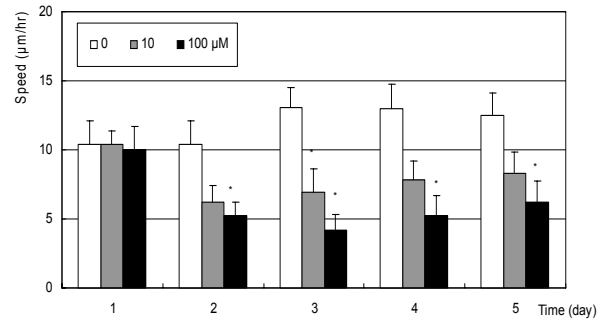


Figure 8. Effect of dexamethasone on the speed of migration in cultured human Tenon capsule fibroblasts. Dexamethasone decreased the speed of migration at high concentration. (*; $p<0.05$)

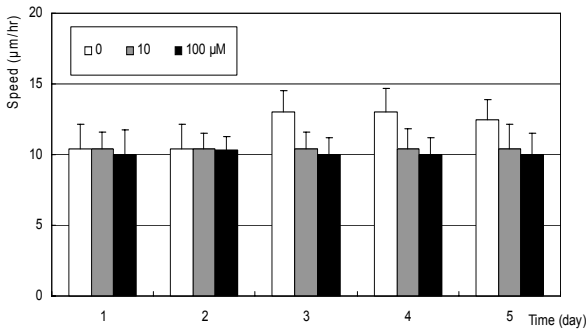


Figure 7. Effect of SNAP on the speed of migration in cultured Tenon capsule fibroblasts. SNAP did not affect on the speed of migration significantly compared to non-exposed control.

한편 SNP가 세포의 이동속도에 미치는 영향을 알아본 결과 약물에 노출시킨 후 1일째부터 대조군이 $10.41 \mu\text{m/h}$ 의 속도로 이동한 데 비해서 10, 100 μM 의 농도에서 각각 $4.16 \mu\text{m/h}$, $2.08 \mu\text{m/h}$ 로 세포의 이동속도를 유의하게 감소시켰다($p<0.05$, Fig. 6).

그러나 SNAP은 노출 후 5일째까지 10, 100 μM 의 농도 모두에서 세포의 이동속도에 유의한 영향을 미치지 않았다($p>0.05$, Fig. 7). 또한 dexamethasone은 100 μM 의 농도에서는 2일째부터 그리고 10 μM 의 농도에서는 3일째에만 세포의 이동속도를 유의하게 감소시켰다($p<0.05$, Fig. 8).

3. NO 제공자가 섬유아세포에 의한 교원질 겔의 수축에 미치는 영향

NO 제공자가 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알

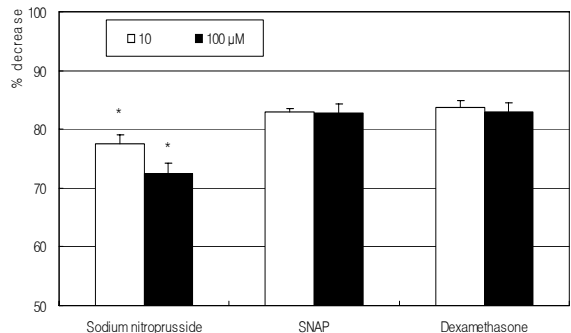


Figure 9. Effect of NO donor on the contraction of collagen gels after 5 days. Sodium nitroprusside augmented gel contraction significantly compared to non-exposed control. (*; $p<0.05$)

아보기 위하여 섬유아세포를 교원질 겔 내부에 봉입하여 배양한 다음 5일간 약물에 노출시킨 결과 약물을 처리하지 않은 대조군이 83.3% 감소한 데 비해서 SNP는 10, 100 μM 의 농도에서 각각 77.4%, 72.5%로 교원질 겔의 직경을 유의하게 감소시켜 SNP가 교원질 겔의 수축을 증가시킨다는 것을 알 수 있었으며($p<0.05$), SNAP과 dexamethasone은 대조군에 비해 교원질 겔의 직경감소에 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$, Fig. 9).

한편 교원질 겔의 수축이 교원질 자체의 감소에 의한 것인지 감별하기 위하여 각각의 약물에 5일간 노출시킨 교원질 겔을 대상으로 실시한 Bradford assay에서는 노출 전($218 \mu\text{g/ml}$)과 비교하여 노출 후 교원질의 양($202 \mu\text{g/ml}$)은 유의한 차이를 보이지 않아($p=0.558$) 교원질 겔의 크기의 감소는 교원질 겔의 수축에 의한 것이며 교원질 자체의 감소에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

고찰

NO는 저농도에서는 인체에서 중요한 생리적인 조절 인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발하기도 한다. 또한 NO는 창상치유에도 영향을 미치는 것으로도 알려져 있어^{10,11} 본 연구에서는 섬유주절제술 후 수술의 성공율에 큰 영향을 미칠 수 있는 NO 제공자가 섬유아세포의 이동과 섬유아세포에 의한 창상의 수축에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보았다. 또한 섬유주절제술 후 염증반응을 줄이기 위해 흔히 사용되는 dexamethasone과 그 효과를 비교해 보았다.

창상치유의 과정에 있어서 창상 후에 창상부위로의 섬유아세포가 이동하고 이후에 창상의 성숙이 일어나면서 수개월간 교원질이 성숙되면서 반흔이 형성되는 단계를 거치게 된다.^{2,16,17} 이에 본 연구에서는 NO 제공자가 창상치유의 각 단계에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 섬유아세포에 직접 NO 제공자를 노출시켜 NO의 생성 정도와 섬유아세포의 생존에 미치는 영향을 알아보았으며 다음 단계로 섬유아세포의 이동에 미치는 영향을 조사하였고 마지막으로 창상치유의 성숙단계에서 NO 제공자가 창상의 수축에 미치는 영향을 조사해 보았다.

세포의 생존에 미치는 영향은 NO의 농도와 세포의 종류 등에 의해 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며^{18,19} 일반적으로 고농도에서는 세포의 생존에 해로운 영향을 미친다. 본 연구의 결과에서 두 가지 NO 제공자 모두가 농도의 증가에 의해 세포의 생존을 감소시킨 것으로 나타났다. 이는 제2형 NO합성효소의 발현에 의해 NO가 단기간에 대량으로 생성되었을 경우 세포의 손상을 유발하여 생존을 감소시킨다고 보고한 연구결과와 유사하다고 할 수 있다.⁴ 따라서 NO 제공자를 결막하 섬유아세포에 직접 노출시킬 경우 고농도에서는 세포의 손상을 유발하여 세포의 생존을 감소시킬 수 있을 것이며 결과적으로 창상치유를 억제하는 효과를 나타낼 수 있을 것이다.

창상치유의 다음 과정으로 섬유아세포가 창상부위로 이동하는 단계가 있는데 이에 대한 NO 제공자의 영향을 알아 보기 위해 세포배양 상태에서 인공적으로 창상을 유발하는 조건을 유발하여 NO 제공자에 노출시켜 본 결과 NO 제공자의 종류에 따라 그 반응이 다르게 나타났다. 즉 SNAP은 섬유아세포의 이동거리와 이동속도에 유의한 영향을 미치지 않은 반면에 SNP는 섬유아세포의 이동거리와 이동속도를 모두 감소시켰다. 이를 기존의 연구와 비교해보면 SNP 또는 3-morpholin-*osydnomine*-N-ethylcarbamide가 세포의 이동성

을 억제한다는 보고와 일치하며 이러한 효과는 전형적인 NO의 작용경로와는 달리 cGMP에 의해 매개되지 않고 다른 반응성산소종(reactive oxygen species)의 생성이 관여한다고 하였다.¹¹ 이렇게 NO의 제공자의 종류에 따라 반응이 다르게 나타나는 이유는 SNP의 경우 NO 제공자의 역할 외에 세포에 해로운 시안화물을 형성하기 때문이며 3-morpholin-*osydnomine*-N-ethylcarbamide의 경우 NO의 제공 외에 peroxynitrite같은 반응성산소종을 동시에 생성하기 때문이라는 가설이 제시된 바 있는데, SNAP의 경우는 NO 제공자의 역할 외에 위에서 언급한 부가적인 효과가 적게 나타나기 때문으로 생각된다.^{11,20} 한편 dexamethasone은 섬유주세포의 생존에는 영향을 미치지 않지만 고농도에서 세포의 이동을 감소시켜 창상의 초기 단계에 창상을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

창상의 치유는 상피화, 결합조직의 침착과 수축의 단계로 일어나게 되는데 창상의 수축은 세포가 결합조직을 포함한 세포기질을 합성함과 동시에 일어나게 되며²¹ 창상의 수축조직에서는 액틴 필라멘트가 발현되어 평활근세포와 유사한 성질을 나타낸다고 한다.²² 또한 교원질 겔을 이용하면 단층세포배양과는 달리 조직과 유사한 성질을 나타나게 되어 실험실 내에서 창상의 수축과정을 연구하기 위해 많이 이용되고 있다.^{23,24} 교원질 겔에서 수축이 일어나는 기전은 세포가 기질 내에서 이동하려는 세포의 활동성에 의한다고 알려져 있는데 이를 tractional remodeling이라고 한다.²⁵ 따라서 섬유주절제술의 성공에 큰 영향을 미치는 인체의 결막하 섬유아세포를 교원질 겔 내에서 배양하면 섬유아세포가 수축성에 미치는 영향을 알 수 있을 것이며 이에 미치는 약제의 영향 또한 알 수 있을 것이다. 창상치유의 후반기에 교원질의 성숙과 수축에 의해 반흔을 형성하는 과정에 대한 NO의 영향을 알아 보기 위해 교원질 겔 내부에 섬유아세포를 배양하여 NO 제공자에 노출시켜 그 영향을 알아 보았다. 그 결과 SNAP은 교원질 겔의 수축에 유의한 영향을 미치지 않은데 반하여 SNP는 교원질 겔의 수축을 촉진하였다. 이는 다른 NO 제공자와는 달리 SNP가 교원질 겔의 수축을 촉진한다는 기존의 결과와 일치하며 SNP에 의한 이러한 수축은 전형적인 NO의 작용경로인 cGMP에 의해 매개되지 않고 PGE₂의 생성이 억제되어 창상의 수축이 나타난다고 하였다.¹⁴ 따라서 창상치유의 후기 단계에 SNP를 사용할 경우 반흔형성을 촉진하는 효과가 있을 수 있다는 것을 고려해야 할 것이다. 한편 dexamethasone은 교원질 겔의 수축에 유의한 영향을 미치지 않았는데 스테로이드제제가 PGE₂의 생성을 억제해서 교원질 겔의 생성을 촉진한다는 보고도 있으므로²⁶ NO 제공자가

PGE의 생성에 미치는 영향은 종과 세포의 종류, 그리고 배양조건 등에 의해 다르게 나타날 수 있다는 점을 고려해야 할 것이다.¹⁴ 본 연구에서 3회의 실험에서 나타난 결과, SNP가 교원질의 수축을 유발한 데 반하여 SNAP과 dexamethasone은 교원질의 수축에 통계학적으로 유의한 미치지 않았으나 그 차이가 크지 않았으므로 이에 관해서는 향후 서로 다른 NO 제공자와 서로 다른 세포를 이용한 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

본 연구의 결과는 섬유주절제술 후 섬유아세포에 의해 매개되는 창상치유의 과정에 NO가 관여할 수 있다는 것을 보여 주는 데 술후 사용하는 약제의 종류에 따라 창상의 형성에 다양한 영향을 미칠 것으로 보이며, 약제에 포함된 보존제 역시 NO에 의해 매개되어 섬유아세포의 증식에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되어 있다.²⁷ 또한 현재 임상적으로 베타차단제의 작용과 함께 신경보호작용을 나타내는 NO를 제공하는 역할을 하는 안압하강제인 nipradilol도 사용되고 있는데^{28,29} 본 연구의 결과에 따르면 NO 제공자의 특성에 따라 창상치유에 미치는 영향이 다르게 나타날 수 있으므로 이러한 약제가 섬유아세포의 증식에 대해 순수하게 NO 제공하는 역할 외에 다른 기전에 의해 어떤 영향을 미치는 데 대해 약제의 특성에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 세포의 이동이나 교원질 겔의 수축에 미치는 NO 제공자의 영향은 NO 제공자의 종류와 창상치유의 단계에 따라 다르게 나타나는데 본 연구에서 결막하 섬유아세포의 경우에는 SNP가 농도에 비례하여 세포의 생존을 억제하고 이동속도와 거리를 감소시키는 반면 교원질 겔의 수축을 촉진시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과는 NO 제공자가 순수하게 NO를 제공하는 역할 외에 다른 기전 및 작용에 의해 반응이 다르게 나타난다는 것을 시사해 주고 있다. 따라서 NO 제공자를 이용하여 창상치유에 관한 연구를 할 경우 각각의 NO 제공자가 가지는 특성을 자세히 파악하여야 할 것이며 향후 그 작용기전에 관한 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robin AL. Histologic characteristics of filtering blebs. Arch Ophthalmol 1983;101:795-8.
- 2) Skuta GL, Parrish RK. Wound healing in glaucoma filtering surgery. Surv Ophthalmol 1987;32:149-70.
- 3) Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. Progr Retin Eye Res 2002;21:75-89.

- 4) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43:109-42.
- 5) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem 1994;63:175-95.
- 6) Park GC, Kwon NS, Kim YM, Kim JC. The role of nitric oxide in ocular surface diseases. Korean J Ophthalmol 2001;15:59-66.
- 7) Haefliger IO, Dettmann E, Liu R, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. Surv Ophthalmol 1999;43:S51-8.
- 8) Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:1765-73.
- 9) Nathanson JA, McKee M. Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:1774-84.
- 10) Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, et al. Nitric oxide regulates wound healing. J Surg Res 1996;63:237-40.
- 11) Kivilito T, Watanabe S, Hirose M, et al. Nitric oxide donors retard wound healing in cultured rabbit gastric epithelial cell monolayers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;281:G1151-7.
- 12) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- 13) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982;126:131-8.
- 14) Liu XD, Skold CM, Umino T, et al. Sodium nitroprusside augments human lung fibroblast collagen gel contraction independently of NO cGMP pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;278:L1032-8.
- 15) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
- 16) Grierson I, Joseph J, Miller M, Day JE. Wound repair: The fibroblast and the inhibition of scar formation. Eye 1988;2:135-48.
- 17) Khaw PT, Occeleston NL, Schultz G, et al. Activation and suppression of fibroblast function. Eye 1994;8:188-95.
- 18) Grant MD, Jones RC, Wilson SE, et al. Single dose cephalosporin prophylaxis in high risk patients undergoing surgical treatment of the biliary tract. Surg Gynecol Obstet 1992;274:347-54.
- 19) Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. Circ Res 1999;84:253-6.
- 20) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, bad, and ugly. Am J Physiol 1996;271:1424-37.
- 21) Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. Am J Med Sci 1993;306:42-8.

- 22) Gabbiani GB, Hirschel GB, Ryan PR, et al. Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J Exp Med* 1972;135:719-33.
- 23) Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972;54:626-37.
- 24) Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1274-8.
- 25) Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981;290:249-51.
- 26) Skold CM, Liu X, Zhu YK, et al. Glucocorticoids augment fibroblast mediated contraction of collagen gels by inhibition of endogenous PGE production. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:249-58.
- 27) Kim JW, Kim KH, Cho BJ. Effect of nitric oxide on the proliferation of cultured human Tenon capsule fibroblasts exposed to benzalkonium chloride. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;1908-13.
- 28) Kanno M, Araie M, Koibuchi H, Masua K. Effects of topical nipradilol, a β blocking agent with α blocking and nitroglycerin like activities, on intraocular pressure and aqueous dynamics in humans. *Br J Ophthalmol* 2000;84:293-9.
- 29) Mizuno K, Koide T, Yoshimura M, et al. Neuroprotective effect and intraocular penetration of nipradilol, a β -blocker with nitric oxide donative action. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:688-94.

=ABSTRACT=

Effect of Nitric Oxide on the Migration and Fibroblast-mediated Contraction of Collagen Gels

Jeong Il Lee, M.D., Soo Yoon Lee, M.D., Jae Woo Kim, M.D.

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: To investigate the role of nitric oxide (NO) on the migration of cultured human Tenon's capsule fibroblasts (HTCF) and contraction of collagen gel.

Methods: After artificial wounding, the primarily cultured HTCF were exposed to an NO donor such as sodium nitroprusside (SNP), S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), or dexamethasone at various concentrations. The cellular migration was measured up to five days. After embedding the cells in the collagen gels, the amount of contraction by the gels was also measured. Cellular survival and NO production were measured with MTT assay and Griess assay, respectively.

Results: Cellular survival was decreased by both NO donors but not by dexamethasone. SNP inhibited migration of HTCF in a dose-dependent manner and enhanced contraction of collagen gels. However, SNAP had no effect on the cellular migration or gel contraction. Dexamethasone inhibited cellular migration but did not affect the contraction of collagen gels.

Conclusions: Among the NO donors, only SNP inhibited migration of HTCF and enhanced contraction of collagen gels in vitro. Thus, the effects between the two NO donors on fibroblast induced wound healing differ.

J Korean Ophthalmol Soc 49(4):661-668, 2008

Key Words: Contraction, Fibroblast, Migration, Nitric oxide, Wound healing

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine

#3056-6 Daemyung-4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr