

섬유주세포에서 아스코르빈산이 산화스트레스에 대한 세포노화에 미치는 영향

김재우 · 강선희 · 이근우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 섬유주세포에서 아스코르빈산이 산화스트레스에 의한 세포노화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포를 일차배양한 뒤 0, 10, 100 μ M의 과산화수소에 노출시켜 7일간 배양하였으며 동시에 아스코르빈산에도 노출시켰다. 세포생존과 일산화질소의 생성을 MTT assay와 Griess assay로 조사하였으며, 세포노화의 정도를 SA- β -gal 염색을 시행하여 조사하였다.

결과: 과산화수소는 섬유주세포의 생존과 일산화질소의 생성을 감소시켰으나 고농도의 아스코르빈산을 동시에 처리한 경우 세포생존과 일산화질소의 생성이 증가되었으며 과산화수소에 의한 세포노화가 6.8% 감소되었다($p < 0.05$).

결론: 섬유주세포에서 아스코르빈산은 과산화수소에 의한 산화스트레스에 대해 세포노화를 억제하는 효과를 나타낼 수 있을 것이다. (대한안과학회지 2013;54(3):490-495)

안구 내에서는 항상 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되며 방수 내에도 다량의 ROS가 존재하고 이에 따른 조직의 손상을 막기 위한 다양한 형태의 항산화 방어체계가 존재한다. 방수 내에서도 ROS가 지속적으로 생성되므로 방수유출의 중요한 경로인 섬유주는 항상 유해한 ROS에 노출되어 있으며 이러한 ROS에 의해 유발되는 산화스트레스를 받을 가능성이 높은 조직이다. 섬유주가 산화스트레스에 의해 손상을 받을 경우 섬유주의 기능이 저하되어 방수유출로의 저항이 증가되어 결과적으로 안압이 상승될 가능성이 있다.¹ 또한 산화스트레스는 세포의 노화를 유발하는 것으로 알려졌는데² 세포의 노화는 개방각녹내장의 특징적인 소견의 하나이다. 방수 내에서 항산화제로 작용하는 것으로 알려진 아스코르빈산은 비교적 높은 농도로 방수 내에 존재하는데^{3,4} 아스코르빈산은 혈관내피세포뿐만 아니라 섬유주세포에서도 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 촉진하는 것으로 알려졌다.^{5,6} NO는 자유 유리기로서 생체막을 투과하여 내피세포에서의 이완작용, 신경계에서의 조절작용, 면역계에서의 면역매개물질 등의 생체에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌는데⁵⁻⁸ 섬유주에서도

NO합성효소가 발현되며⁹⁻¹¹ 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하는 역할을 하지만 녹내장이 있는 경우 이러한 NO의 합성에 장애가 일어나는 것으로 알려졌다.¹²⁻¹⁵

그러나 섬유주에 유발된 산화스트레스가 세포의 노화에 미치는 영향과 이에 대한 항산화제의 효과는 아직 자세히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 섬유주세포를 과산화수소에 노출시켜 산화스트레스를 유발한 후 세포노화의 정도를 살펴보고 아스코르빈산이 이러한 산화스트레스에 의한 세포노화에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양

안구은행에서 특이한 병력이 없는 사후 6시간 이내에 적출한 인체의 안구를 이용하여 섬유주세포를 일차배양하였다. 먼저 전방각 주위 조직을 제거한 후 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신 B가 포함된 항생제(Antibiotic-Antimycotic, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양을 시작하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을

■ 접수 일: 2012년 4월 6일 ■ 심사통과일: 2012년 4월 20일
■ 게재허가일: 2013년 1월 16일

■ 책임저자: 김 재 우

대구광역시 남구 두류공원로 17길 33
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

확인한 후 섬유주 조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속 하였으며 세포가 배양접시에 증만해지면 트립신 처리하여 10% 우태아혈청(Gibco, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 계대배양하였다.

약물처리

과산화수소에 의한 산화스트레스가 섬유주세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일차배양된 섬유주세포를 트립신으로 처리하고 나서 24-well plate에 분주하여 6시간 동안 부착시킨 후 0, 10, 100 μ M의 과산화수소(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 노출시켜 일주일간 배양하였는데 이때 혈청단백이 과산화수소의 작용에 미치는 영향을 피하기 위하여 무혈청배지를 사용하였다. 이때 항산화제인 아스코르빈산(L-ascorbic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)이 과산화질소에 의한 산화스트레스에 대해 미치는 영향을 알아보기 위하여 과산화질소에 노출시키기 1시간 전에 0, 10, 100 μ M의 농도로 아스코르빈산에 미리 노출시킨 후 아래의 실험을 시행하였다.

MTT assay와 Griess assay

MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well당 0.5 ml 씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 μ l씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG labtech, Offenberg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁶ 이때 세포의 증식 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. NO의 생성은 NO의 대사물인 아질산염의 양을 측정하는 Griess assay를¹⁷ 이용하였는데 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 섞은 후 96-well plate에 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 구하였다.

세포노화의 측정

세포의 노화를 측정하기 위하여 노화된 세포의 특징인 β -galactosidase의 활성 정도를 상용의 senescence-associated β -galactosidase kit (SA- β -gal, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. SA- β -gal은 세포의 노화과정에서

나타나는 비정상적인 효소의 활성도를 측정하는데 이용된다. SA- β -gal 염색액을 추가하여 두 시간 동안 배양한 후 현미경에 격자가 있는 둥근 광학유리를 부착하여 각 영역마다의 세포수를 세어 푸르게 염색된 노화된 세포수와 전체 세포의 수를 세어 퍼센트로 나타내었다.

통계적 처리

모든 실험은 4계에서 6계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였고 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 이용하였으며 유의수준은 0.05% 이하로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 2주째부터 섬유주 조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 형태학적인 특징적 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{18,19}

과산화수소와 아스코르빈산이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

과산화수소는 100 μ M 농도에서 섬유주세포의 생존율을 대조군에 비해 8% 감소시켰다($p < 0.05$) (Fig. 1). 산화스트레스에 대한 아스코르빈산의 세포보호작용을 알아보기 위

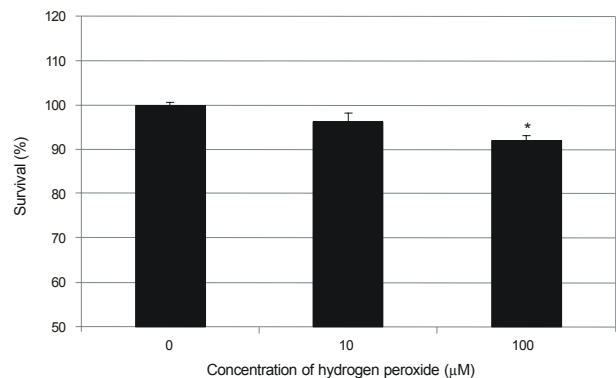


Figure 1. Effect of hydrogen peroxide on the survival of human trabecular meshwork cells. Exposure to 100 μ M hydrogen peroxide decreased cellular proliferation significantly compared to non-exposed control ($p < 0.05$).

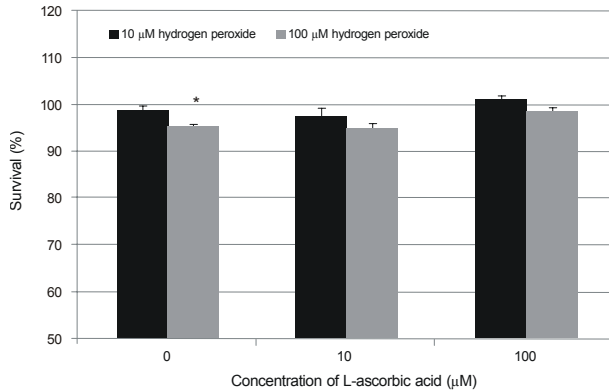


Figure 2. Effect of L-ascorbic acid on the survival of human trabecular meshwork cells against the hydrogen peroxide-induced oxidative stress. 100 μM hydrogen peroxide decreased cellular survival significantly ($p < 0.05$) which were abolished by L-ascorbic acid ($p > 0.05$).

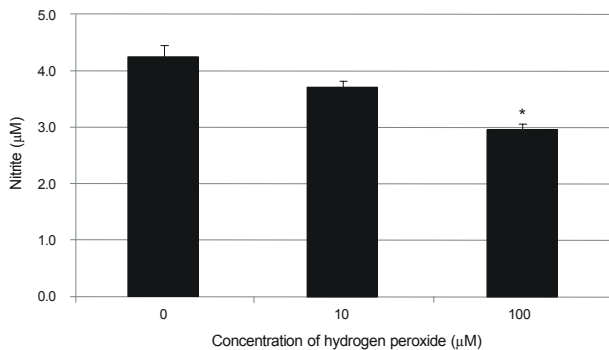


Figure 3. Effect of hydrogen peroxide on the production of nitric oxide (NO) in primarily cultured human trabecular meshwork cells. Exposure to 100 μM hydrogen peroxide decreased production of NO significantly compared to non-exposed control ($p < 0.05$).

하여 과산화수소에 섬유주세포를 노출시켰을 경우 과산화수소에 노출되지 않은 대조군에 비해 100 μM의 과산화수소는 세포의 생존율을 4.6% 감소시켰으나($p < 0.05$), 10 μM 아스코르빈산을 10 μM과 100 μM의 과산화수소에 노출시킨 경우 97.2%, 94.9%의 생존율을 나타내었고, 100 μM 아스코르빈산을 10 μM과 100 μM의 과산화수소에 노출시킨 경우 101.1%, 98.59%의 생존율을 나타내어 대조군에 비해 유의한 생존율의 차이를 보이지 않았으므로 아스코르빈산이 과산화수소에 의한 세포의 생존감소를 억제하는 것으로 나타났다($p > 0.05$)(Fig. 2).

과산화수소와 아스코르빈산이 섬유주세포에서의 NO 생성에 미치는 영향

과산화수소는 약물에 노출시키지 않은 대조군의 4.3 μM

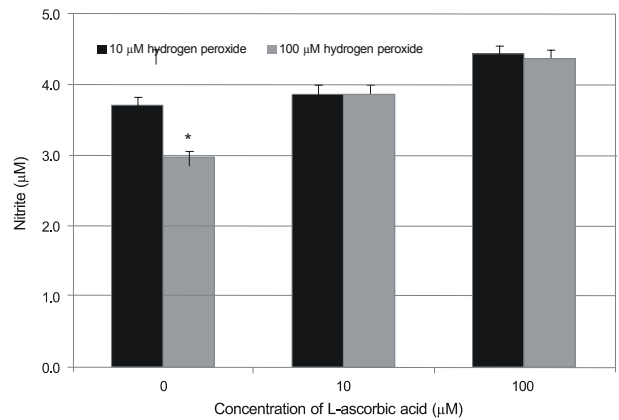


Figure 4. Effect of L-ascorbic acid on the production of nitric oxide (NO) in human trabecular meshwork cells against the hydrogen peroxide-induced oxidative stress. L-ascorbic acid increased production of NO compared to non-exposed control ($p < 0.05$).

에 비해 10 μM 농도부터 NO의 생성을 감소시키기 시작하여 100 μM에서는 2.9 μM로 유의하게 NO의 생성을 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$)(Fig. 3). 아스코르빈산이 과산화수소에 의한 NO 생성저하에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 과산화수소와 함께 노출시켰을 때, 아스코르빈산에 함께 노출시키지 않았을 경우 100 μM의 과산화수소는 대조군에 비해 유의하게 NO의 생성을 억제하였으나($p < 0.05$), 10 μM 아스코르빈산을 10 μM과 100 μM의 과산화수소에 노출시킨 경우 NO의 생성은 3.87 μM로 증가되어 대조군과 차이를 보이지 않았고, 100 μM 아스코르빈산을 10 μM과 100 μM의 과산화수소에 노출시킨 경우에도 대조군에 비해 유의한 생존율의 차이를 보이지 않아 아스코르빈산이 과산화수소에 의한 NO 생성저하를 상쇄하는 것으로 나타났다($p > 0.05$)(Fig. 4).

산화스트레스에 의한 세포노화와 아스코르빈산의 역할

산화스트레스가 섬유주세포의 노화에 미치는 영향을 알기 위해 SA-β-gal 염색을 시행하였다. 노화된 세포는 푸르게 염색되는데 과산화수소에 의해 산화스트레스가 유발된 경우 섬유주세포에서 더 많은 세포가 푸르게 염색되었다(Fig. 5). 과산화수소는 0, 10, 100 μM의 농도에 노출된 경우 각각 11.4%, 18.7%, 23.5%의 세포가 푸르게 염색되어 노화된 양상을 나타내었다. 이때 100 μM의 아스코르빈산에 함께 노출시킨 경우에는 과산화수소에 의해 유발된 산화스트레스에 의한 섬유주세포의 노화를 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$)(Fig. 6).

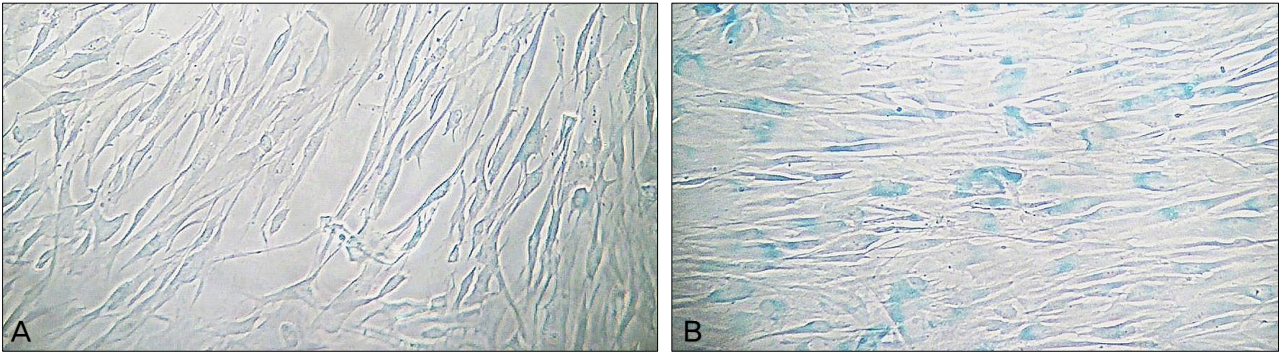


Figure 5. Senescence-associated β -galactosidase staining of trabecular meshwork cells after exposure to hydrogen peroxide. 100 μ M hydrogen peroxide increased the number of senescent cells, which stained blue (B), compared to non-exposed control (A) (Magnification, $\times 100$).

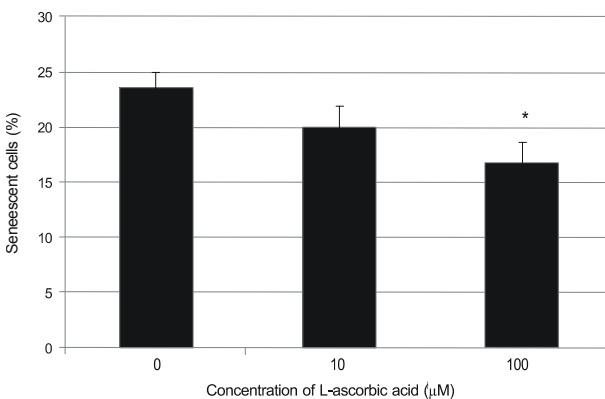


Figure 6. Effect of L-ascorbic acid on the oxidative stress-induced senescence of human trabecular meshwork cells. 100 μ M L-ascorbic acid decreased cellular senescence (* $p < 0.05$).

고 찰

섬유주세포는 섬유주를 통한 방수유출을 정상적으로 유지하는 중요한 역할을 하며 따라서 섬유주세포가 손상을 받으면 섬유주의 방수유출기능이 저하되어 녹내장이 유발되거나 악화될 수 있다. 방수내에는 다량의 ROS가 발생하고 이에 의한 산화스트레스에 의해 섬유주를 비롯한 다양한 안구조직이 손상받을 수 있으며 이에 대한 방어체계가 다양하게 존재하는 것으로 잘 알려졌는데 아스코르빈산은 혈액에 비해 방수 내에서 매우 고농도로 존재하며 중요한 항산화물질로 작용한다.^{3,4} 또한 아스코르빈산은 이미 잘 알려진 항산화작용 뿐만 아니라 적절한 양의 NO의 생성장애에 의해 유발되는 혈관내피세포의 기능장애에 대하여²⁰ 혈관내피세포에서의 NO합성을 촉진하여 내피세포의 기능장애를 방지하는 역할을 하는 것으로도 알려졌다²¹ 그 기전은 혈관내피세포의 경우 NO합성의 필수적인 요소인 tetrahydrobiopterin을 화학적으로 안정화시켜 ROS에 의한 NO의 산화적 변성을 방지하여 NO를 유지하는 것으로 알려졌다.^{22,23}

섬유주세포는 섬유주를 통한 방수유출을 능동적으로 조절하며 endothelin과 NO가 이에 관여한다.²⁴ 인체의 섬유주세포에서 NO의 생성저하는 섬유주를 위축시켜 결과적으로 섬유주를 통한 방수유출을 저하시킬 뿐만 아니라 NO의 생리적 활성을 저하시켜 다양한 병적 결과를 초래할 수 있다. 즉 NO의 생성감소는 NO의 생리적 활성을 저하시킬 뿐만 아니라 매우 유해한 peroxynitrite와 같은 ROS의 생성을 증가시키게 되는데^{7,8,5,25} 섬유주에서 NO의 생성이 저하되면 섬유주를 수축시켜 방수유출을 감소시킴으로써 안압을 상승시킬 수 있으며, 또한 NO의 활성저하는 ROS의 생성을 촉진하여 결과적으로 산화스트레스를 유발하여 섬유주를 손상시킬 수 있을 것이며 이러한 산화스트레스에 의한 섬유주의 손상은 세포고사를 유발할 수 있다.²⁶ 또한 ROS는 산화스트레스를 유발하여 세포의 노화도 초래하는 것으로 알려졌다²⁷⁻³⁰ 섬유주에서 산화스트레스가 유발될 경우 섬유주세포의 손상과 함께 섬유주세포의 변성을 유발하며 섬유주세포의 노화시킬 수 있을 것이다.^{10,27} 이러한 산화스트레스에 의해 야기된 세포노화에 대해 아스코르빈산이 세포의 노화를 늦추는 작용이 있는 것으로 알려졌다.^{31,32}

본 연구의 결과에 의하면 과산화수소는 섬유주세포의 생존을 저하시키는 동시에 NO의 생성을 저하시켰고 이와 대조적으로 아스코르빈산은 산화스트레스에 대해 섬유주세포의 세포보호효과를 나타내면서 NO의 생성도 어느 정도 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 특히 과산화수소와 아스코르빈산을 고농도로 노출시켰을 때 뚜렷이 나타났다.

또한 과산화수소에 의해 유도된 산화스트레스는 농도에 비례하여 세포의 노화를 증가시켰으며 이에 대해 아스코르빈산은 고농도에서 세포의 노화를 감소시켰다. 이러한 아스코르빈산의 효과에 대해 주목할 점은 어느 정도 이상의 농도 이상에서만 그 효과를 나타내므로 실제 아스코르빈산에 의한 효과를 얻기 위해서는 상당한 농도의 아스코르빈산을 투여할 필요가 있다는 점을 시사하고 있다.

ROS에 지속적 노출되어 있는 섬유주세포의 경우 산화스트레스에 대한 방어체계는 섬유주의 노화를 방지하여 그 기능을 정상적으로 유지하는 데 매우 중요할 것으로 생각한다. 따라서 새로운 치료방법의 하나로 항산화제를 이용하여 NO의 생성을 유지시키고 산화스트레스를 억제함으로써 섬유주세포의 노화를 방지하여 정상적인 기능을 회복하려는 시도와 연구가 활발히 행해지고 있으며, 녹내장의 경우에도 활성산소와 관련하여 섬유주의 기능을 유지하고 노화를 방지하기 위한 연구가 앞으로 많이 이루어질 것으로 예상된다.³³

결론적으로 과산화수소에 의한 산화스트레스는 섬유주세포의 생존과 NO의 생성을 억제하였으며 섬유주세포의 노화를 촉진하였다. 이에 대하여 아스코르빈산은 고농도로 사용할 경우 세포의 노화를 억제하는 작용을 나타내었다. 향후 산화스트레스에 의한 세포노화를 늦추기 위한 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005;123:458-63.
- von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:99-110.
- BECKER B. Chemical composition of human aqueous humor; effects of acetazaleamide. *AMA Arch Ophthalmol* 1957;57:793-800.
- Erb C, Nau-Staudt K, Flammer J, Nau W. Ascorbic acid as a free radical scavenger in porcine and bovine aqueous humour. *Ophthalmic Res* 2004;36:38-42.
- Heller R, Münscher-Paulig F, Gräbner R, Till U. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8254-60.
- Kim JW. Ascorbic acid enhances nitric oxide production in trabecular meshwork cells. *Korean J Ophthalmol* 2005;19:227-32.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-95.
- 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.
- Geyer O, Podos SM, Mittag T. Nitric oxide synthase activity in tissues of the bovine eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:786-93.
- Meyer P, Champion C, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res* 1999;18:375-80.
- Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
- Wang RF, Podos SM. Effect of the topical application of nitroglycerin on intraocular pressure in normal and glaucomatous monkeys. *Exp Eye Res* 1995;60:337-9.
- Nathanson JA, McKee M. Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1774-84.
- Matsuo T. Basal nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- Polansky JR, Weinreb RN, Baxter JD, Alvarado J. Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:1043-9.
- Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med* 2000;28:1421-9.
- Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2000;275:17399-406.
- Heller R, Unbehauen A, Schellenberg B, et al. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2001;276:40-7.
- 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.
- Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-20.
- Brüne B, Von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dörmeling S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000;87:540-2.
- Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 11):2417-26.
- von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:99-110.
- Furumoto K, Inoue E, Nagao N, et al. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 1998;63:935-48.
- Roques SC, Landrault N, Teissède PL, et al. Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid. *Free Radic Res* 2002;36:593-9.
- Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.

=ABSTRACT=

Effect of Ascorbic Acid Against the Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence in Trabecular Meshwork Cells

Jae Woo Kim, MD, PhD, Sun Hee Kang, MD, Keun Woo Lee, MD

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

Purpose: To investigate the effect of L-ascorbic acid (LAA) on oxidative-stress-induced cellular senescence in trabecular meshwork (TM) cells.

Methods: Primarily cultured human TM cells were exposed to 0, 10, or 100 μ M hydrogen peroxide for 7 days with or without co-exposure of LAA. Cellular survival and nitrite production were assessed with MTT and Griess assays, respectively. SA- β -gal staining was performed to quantify cellular senescence.

Results: Hydrogen peroxide decreased cellular survival, accompanied by decreased nitric oxide (NO) production. These decreases of cellular survival and NO production were abolished by co-exposure of 100 μ M LAA. Analysis of SA- β -gal staining revealed that LAA inhibited hydrogen peroxide-induced cellular senescence by 6.8% ($p < 0.05$).

Conclusions: LAA may have a protective effect against the oxidative-stress-induced cellular senescence in TM cells.
J Korean Ophthalmol Soc 2013;54(3):490-495

Key Words: Ascorbic acid, Oxidative stress, Senescence, Trabecular meshwork cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center
#33 17-gil Duryugongwon-ro, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea
Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr