

베바시주마이 섬유주세포의 생존과 일산화질소의 생성에 미치는 영향

김신후 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 신생혈관의 치료에 사용하는 혈관내피성장인자에 대한 단클론 항체인 bevacizumab이 인체의 섬유주세포의 생존과 일산화질소(NO)의 생성에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 하였다.

대상과 방법: 인체의 섬유주세포를 일차배양하여 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 mg/ml의 bevacizumab에 24시간 노출시킨 후 세포의 생존과 NO의 생성을 MTT assay와 Griess assay로 각각 조사하였다.

결과: Bevacizumab는 저농도에서는 NO의 생성저하와 함께 세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았으나 0.1 mg/ml의 고농도에서는 세포의 생존을 유의하게 감소시켰다.

결론: 고농도의 bevacizumab에 섬유주세포가 직접 노출될 경우 섬유주세포에 심각한 손상을 유발할 수 있으므로 주의를 요한다. <대한안과학회지 2009;50(10):1404-1408>

섬유주를 통한 방수유출을 조절함에 있어서 자유유리기인 일산화질소(nitric oxide, NO)가¹⁻⁴ 중요한 역할을 하며 섬유주세포에서도 NO합성효소가 발현될 뿐만 아니라⁵⁻⁷ 녹내장이 있는 경우에는 NO합성효소의 활성이 감소되어 있는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹¹

혈관생성을 촉진하는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 작용기전에 일산화질소(Nitric oxide, NO)가 관여하는 것으로 알려져 있으며,^{12,13} 이를 억제하는 재조합 인간화 단클론 항체인 bevacizumab을 유리체강 내에 주입하여 신생혈관의 생성억제 또는 소멸에 이용하고 있는데 bevacizumab은 원래 암 치료를 위해 미 식품의약청의 사용 허가를 받았으나 안과영역에서 노인성황반변성, 당뇨병망막증 등의 안구 혈관질환의 치료에 흔히 사용되어 효과적으로 이용되고 있다.¹⁴⁻¹⁷ 녹내장의 경우 신생혈관녹내장에서 수술 전에 앞방 내의 신생혈관을 퇴행시켜 수술을 안전하게 시술하기 위해 사용하는 경우도 있다.¹⁸ 대개 유리체강 내에 bevacizumab을 주입하여 사용하지만 술자에 따라 앞방 내에 바로 주입하여 사용하는 경우도 있다. 그러나 어떤 경우든 bevacizumab이 앞방 내의 섬유주세포의 생존에 미치는 영향에 대한 실험적 연구는 아직 알려져 있지 않으며 앞방 내에 주입하여 사용할 경우 세포에 손상을 주지 않는 안전한 적정 농도에 대해서도 알려져 있

지 않다.

본 연구에서는 인체의 섬유주세포를 일차배양하여 bevacizumab에 노출시켜 농도에 따라 인체의 섬유주세포의 생존과 NO의 생성에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 하였다.

대상과 방법

세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 전방각 주위 조직을 제거한 후 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리아이신(Sigma, USA)로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, USA)와 10% 우태아혈청(Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

약물처리

일차배양한 사람의 섬유주세포를 24 well 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청 단백질에 의한 항산화효과를 배제하기 위하여 1%의 저농도 혈청과 5 mM의 저농도 포도

■ 접 수 일: 2009년 4월 21일 ■ 심사통과일: 2009년 6월 23일

■ 책임저자: 김 재 우

대구시 남구 대명4동 3056-6
대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

당이 포함된 DMEM배지로 교환하여 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 mg/ml의 bevacizumab (Avastin, Genetech, USA)에 24시간 동안 노출시켰다. 이때 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NO의 생성을 억제하는 0.5 mM L-NAME에도 함께 노출시켰다.

MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 선별 검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) assay를¹⁹ 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를²⁰ 이용하였다. MTT assay는 약물 처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 μ l씩 옮겨 분광광도계 (FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma, USA)를 섞은 후 96-well 배양접시에 옮겨 NO생성의 반응물인 아질산염의 양을 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주 세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주 조직의

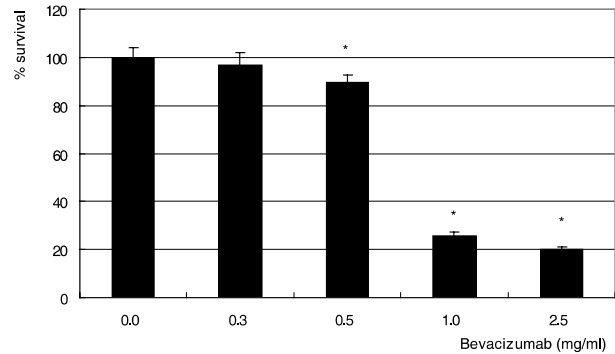


Figure 1. Bevacizumab decreased survival of trabecular meshwork cells significantly from 0.5 mg/ml and decreased markedly from 1.0 mg/ml of concentration. (**p*<0.05)

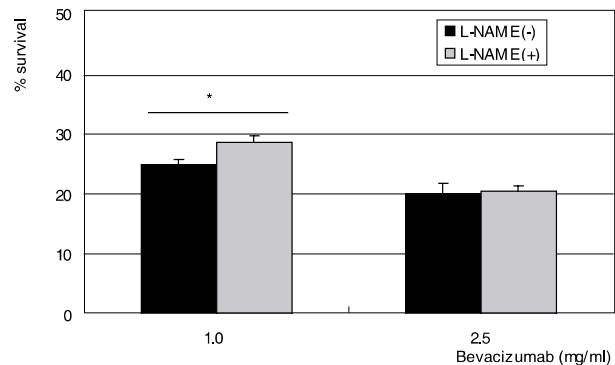


Figure 2. Effect of L-NAME on the bevacizumab-induced decreased survival of trabecular meshwork cells. 0.5 mM L-NAME did not affect the survival significantly at high concentration. (**p*<0.05)

이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{21,22}

Bevacizumab이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

Bevacizumab는 0.25 mg/ml의 농도까지는 유의한 영향을 미치지 않았으나 0.5 mg/ml에서부터 섬유주세포의 생존을 저하시키기 시작하여 1.0 mg/ml의 농도에서부터 생존을 급격하게 감소시켰다. L-NAME는 1.0 mg/ml의 농도에서는 세포의 생존을 증가시켰으나 2.5 mg/ml의 농도에서는 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1, 2).

Bevacizumab이 섬유주세포의 NO의 생성에 미치는 영향

Bevacizumab는 0.5 mg/ml의 농도에서 NO의 생성을 감소시켰으나 1.0 mg/ml의 농도에서부터 섬유주세포의 생존저

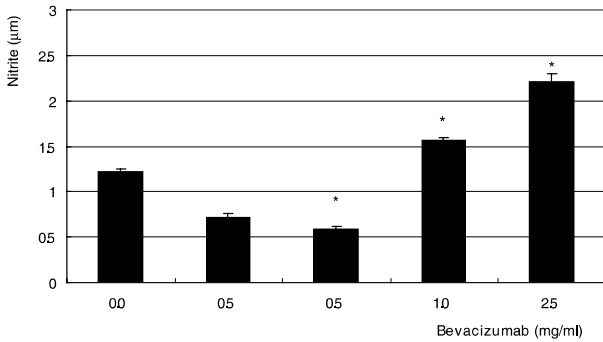


Figure 3. Bevacizumab decreased NO production at lower concentrations but significantly increased at high concentrations in trabecular meshwork cells. (* $p < 0.05$)

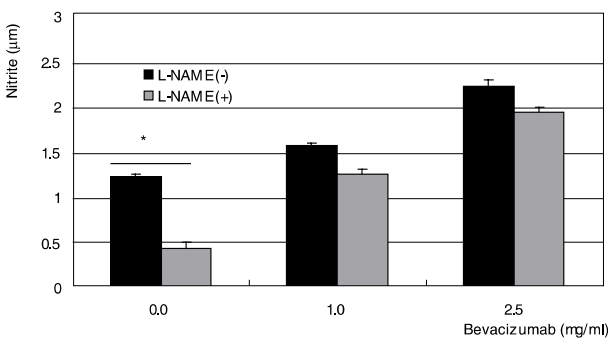


Figure 4. 0.5 mM L-NAME did not affect the bevacizumab-induced production of nitric oxide significantly at high concentrations in trabecular meshwork cells. (* $p < 0.05$)

하와 함께 NO의 생성이 급격하게 증가하였다. L-NAME는 약물처리를 하지 않은 경우 NO의 생성을 저하시켜 섬유주 세포의 NO생성을 나타냈지만 1.0 mg/ml의 농도에서부터는 NO의 생성에 유의한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3, 4).

고 찰

본 연구의 결과는 bevacizumab의 농도에 따라 섬유주 세포의 생존과 NO의 생성에 유의한 영향을 미치는 것을 보여 주고 있다.

VEGF는 당뇨망막증과 망막정맥폐쇄에 의한 신생혈관을 촉진하는 작용과 혈관투과성을 촉진하는 작용을 하며 그 작용기전에 NO가 관여하는 것으로 알려져 있다.^{12,13} 이러한 안구 내의 여러 가지 신생혈관질환에 대해 다양한 종류의 항VEGF 항체를 개발하여 치료에 이용하고 있는 데 그 중 한 가지인 bevacizumab도 임상에서 많이 사용하고 있는데 술자에 따라 유리체 내에 직접 주사하거나 앞방 내에 직접 주사하는 경우도 있다. 지금까지 bevacizumab은 비교적 사용하기에 안전하다는 보고가 있기는 하지만^{23,24} 아직까지

투여경로와 용량에 대한 실험적 임상적 결과는 명확하게 확립되어 있지 않다.

VEGF의 작용기전을 매개하는 물질인 NO는 bevacizumab을 사용할 경우 NO의 생성을 저하시켜 신생혈관을 억제하고 혈관투과성을 저하시킬 수 있으며 여러 종류의 세포에서 세포독성에 관한 연구와 유리체 내에 주입했을 경우의 약동학에 대한 연구가 보고되어 있다.²³⁻²⁵ 그러나 bevacizumab이 섬유주세포에 노출되었을 경우 섬유주세포에 미치는 영향은 자세히 알려지지 않았으므로 섬유주세포의 독성과 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구를 시행한 결과 bevacizumab을 다양한 농도로 섬유주세포에 노출시켜 본 결과 저농도에서는 세포의 생존에 영향을 미치지 않고 NO의 생성을 저하시켰으나 고농도에서는 섬유주세포에 유의한 세포독성을 나타내면서 NO의 생성이 급격하게 증가되었는데 이러한 결과는 NO가 저농도에서는 VEGF의 작용을 매개하는 것처럼 인체에서 중요한 생리적인 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성 산화물로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발하기 때문으로 생각된다.²⁻⁴ 또한 저농도로 bevacizumab을 사용할 경우 bevacizumab은 생리적인 NO합성 저해제로 작용하여 그 작용을 나타내는 것으로 보이며 NO합성 저해제인 L-NAME도 NO의 생성을 저하시켰다. 그러나 비록 저농도에서 bevacizumab이 섬유주세포에 세포독성을 유발하지 않더라도 섬유주에서 NO의 생리적 생성감소는 섬유주를 위축시킴으로써 방수유출을 저하시켜 안압 상승을 초래할 수도 있을 것이다.

비록 실험실 내의 조건에서는 bevacizumab이 일차 배양된 안구 세포의 생존에는 유해한 영향을 미치지 않는다는 보고도 있었으나²⁶ 본 연구의 결과에 의하면 고농도로 bevacizumab을 사용한 경우 생리적인 작용에도 중요한 역할을 하는 VEGF의 과다한 억제는 세포에 유해할 수 있을 뿐만 아니라 유해한 영향을 줄 수 있는 NO의 급격한 증가와 동반하여 세포독성을 유발할 가능성이 있다. 또한 L-NAME도 고농도에서는 NO 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 세포독성과 동반한 NO의 급격한 증가는 앞방 내에 심각한 염증반응 같은 병적인 상태를 유발할 수 있으므로²⁷ 특히 앞방 내에 bevacizumab을 직접 주사할 경우 주의를 요해야 할 것이며 이러한 농도에 따른 세포독성의 가능성은 bevacizumab뿐만 아니라 다른 종류의 항VEGF 제재도 마찬가지일 것으로 생각된다.

결론적으로 실험실내 세포배양의 조건에서 bevacizumab은 저농도에서는 섬유주세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않고 NO의 생성을 저하시켜 생리적인 약리작용을 나타내지만 고농도에서는 섬유주세포의 생존을 유의하게 저하시켰다. 따라서 bevacizumab을 인체 안구 내에 주사하여

사용할 때 고농도로 섬유주세포에 직접 노출될 경우에는 섬유주세포에 심각한 손상을 야기할 가능성이 있으므로 주의할 요하며 섬유주세포의 생존에 영향을 주지 않으면서 신생혈관억제의 효과를 나타내기 위한 적절한 농도와 안전한 주입 경로에 대한 더 자세한 생체내 연구가 향후 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Wiederholt M. Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin Ophthalmol* 1998;9:46-9.
- Moncada S, Palmer RMJ, 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.
- Brüne B, Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1765-73.
- Geyer O, Podos SM, Mittag T. Nitric oxide synthase activity in tissues of the bovine eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:786-93.
- Meyer P, Champion C, Schlotzer-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 ocular facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
- Wana 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. Alteration of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1774-84.
- Matsuo T. Basic nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
- Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999;41:773-80.
- Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:659-66.
- Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:331-5.
- Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-72.
- Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-8.
- Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:352-4.
- Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina* 2006;26:354-6.
- 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, Glogoski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biologic 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.
- Spitzer MS, Yoeuruek E, Sierra A, et al. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1837-42.
- Iriyama A, Chen Y-N, Tamaki Y, Yanagi Y. Effect of anti-VEGF on retinal ganglion cells in rats. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1230-3.
- Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Am J Ophthalmol* 2007;114:855-9.
- Kernt M, Welge-Lüssen U, Yu A, et al. Bevacizumab is not toxic to human anterior- and posterior-segment. *Ophthalmologie* 2007;104:965-71.
- Roberts DD, Isenberg JS, Ridnour LA, Wink DA. Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007;13:795-8.

=ABSTRACT=

Effect of Bevacizumab on Survival and Production of Nitric Oxide in Trabecular Meshwork Cells

Sin Hoo Kim, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

Purpose: To investigate the effect of bevacizumab, a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), on the survival and production of nitric oxide (NO) in human trabecular meshwork cells (HTMC).

Methods: Primarily cultured HTMC were exposed to 0, 0.25, 1.0, and 2.5 mg/ml bevacizumab for 24 hours. Cellular survival and production of NO were assessed by MTT assay and Griess assay, respectively.

Results: Bevacizumab did not affect the cellular survival at low concentrations but decreased cellular survival significantly at high concentrations (>1.0 mg/ml) accompanied with increased NO production.

Conclusions: High concentrations of bevacizumab may be toxic to HTMC.
J Korean Ophthalmol Soc 2009;50(10):1404-1408

Key Words: Bevacizumab, Nitric oxide, Trabecular meshwork cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu College of Medicine

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

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