

마이토마이신씨에 의해 유도된 인간 테논낭 섬유아세포의 자가포식현상

박찬희^{1,2} · 박래길^{1,2} · 유성광³ · 이동욱³

남부대학교 청각학과¹, 원광대학교 전정와우기관연구센터², 전북대학교 의학전문대학원 안과학교실³

목적: 사람 테논낭 섬유아세포에서 마이토마이신씨에 의한 세포자멸사 과정 중 자가포식현상의 연관성을 확인하고자 하였다.

대상과 방법: 사람 테논낭 섬유아세포를 분리, 배양한 후 0.4 mg/ml의 마이토마이신씨 처리 후 자가포식현상이 일어나는지 관찰하였다. 자가포식현상은 아크리딘 오렌지 염색과 monodansylcadaverine을 사용한 유세포 분석으로 확인하였다. Western blotting으로 자가포식현상관련 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

결과: 아크리딘 오렌지 염색과 유세포분석에서 시간에 의존하여 세포내 산성 소포성 소기관이 증가하는 것을 확인하였으며 LC3-II 분절과 Beclin-1 같은 자가포식현상관련 단백질 발현도 증가하였다. 자가포식현상 억제제인 3-MA 전처리시, 세포내 산성 소포성 소기관의 발현이 억제되는 것도 확인하였다.

결론: 테논낭 섬유아세포에 0.4 mg/ml 마이토마이신씨 처리 후 초기에 세포내 자가포식현상을 확인하였으며, 그 결과는 세포자멸사를 유도하여 세포죽음에 관여할 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2011;52(11):1337-1343〉

세포의 죽음과 항상성 유지에 관한 연구는 지금까지 활발히 이루어져 오고 있다. 예정된 세포의 죽음(programmed cell death)은 Type I apoptosis와 Type II autophagic cell death로 분류할 수 있으며 세포자멸사(apoptosis)는 세포 스스로 죽음을 맞이하는 형태로 핵의 응축, 염색체의 분절이 관찰되고, 세포 소기관들은 모양을 유지하는 형태학적 특징을 보인다. 자가포식현상(autophagy)에 의한 세포 죽음은 세포질에서 공포(vacuoles) 축적과 소포체(endoplasmic reticulum, ER)와 골지체(Golgi body)의 거대화 및 미토콘드리아의 확장을 일으키며 세포자멸사와 구별되는 특징으로 caspase 활성화 없이 세포 죽음을 일으킨다는 점이다.¹ 환경변화에 대처하는 세포의 항상성 유지 기전은 크게 프로테오솜(proteosome)에 의한 단수명(short-lived) 단백질 분해와 자가포식현상에 의한 장수명(long-lived) 단백질의 소기관(organelle)의 분해로 구분할 수 있다.² 이때 자가포식현상은 영양분의 고갈, 병원균의 침입, 약물, 산화 스트레스 같은 외부 환경 변화에 유도되어 기본 세포질 구성요소를 분해하여 재순환 하여 세

포를 생존시키거나, 직접 자가포식에 의한 세포 죽음을 일으키거나 세포자멸사 기전을 유도하여 세포사 시키는 방법으로 세포의 운명을 결정하는 현상이다.³

자가포식현상의 기전에는 다양한 Atg (autophagy-related gene) 유전자가 관여하며, 이중막의 형태학적 특징을 갖는 오토파고솜(autophagosome) 또는 자가포식 액포(autophagic vacuole)가 세포질 내에서 생성된다. 이때 Atg-8으로 알려진 LC3 단백질은 이중막 형성에 중요한 성분이며, 생성된 오토파고솜은 리소솜(lysosome)과 융합하여 산성(acidic organelles) 환경을 구성하여 단백질 분해를 일으킨다.^{3,4}

안과 질환 치료 과정 중 섬유아세포의 증식 억제는 여러 질환에서 시도된다. 군날개 절제술, 녹내장 여과수술 등에서 섬유아세포의 증식은 안 좋은 수술 결과나 재발을 초래하는 것으로 알려져 있다.^{5,6} 이런 결과를 예방할 목적으로 마이토마이신씨는 수술 시 대사 억제제로 자주 사용되고 있다. 이때 마이토마이신씨의 사람 테논낭 섬유아세포에 대한 세포자멸사 기전은 잘 알려져 있으나,⁷ 이 과정 중 자가포식현상의 연관성에 대한 보고는 아직 없다. 이 연구에서는 마이토마이신씨에 의한 사람 테논낭 섬유아세포 세포독성 모델에서 자가포식현상이 참여하는지 알아보려고 하였다.

■ 접수 일: 2009년 10월 26일 ■ 심사통과일: 2011년 3월 8일
■ 게재허가일: 2011년 9월 20일

■ 책임저자: 이 동 욱

전북대학교병원 안과
전북 전주시 금암동 634-18
Tel: 063-250-1960, Fax: 063-250-1960
E-mail: ldw@jbnu.ac.kr

대상과 방법

재료

사람 태논낭 섬유아세포는 군날개 절제술 중 일부 절제된 정상 부위 태논낭에서 분리하여 계대배양한 세포를 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 Dubellco's minimum essential medium (DMEM)에서 3에서 5세대로 계대 배양된 세포를 실험에 사용하였다.

세포배양에 필요한 DMEM, 페니실린 지(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml), 트립신(trypsin) 및 FBS는 GIBCO BRL사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용기(24,48-well plate, 6 cm dish, 10 cm dish)는 Falcon (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입한 후 사용하였다. 아크리딘 오렌지(acridine orange), Monodansylcadaverin (MDC), 3-methyladenine (3-MA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Western blotting에 사용된 LC3, Beclin-1 및 b-actin의 항체들은 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA) 제품을, 그리고 Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham, England)를 사용하였다.

시약 처리

실험에 사용한 마이토마이신씨는 6 mg/ml 농도로 생리 식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)에 녹여 4°C에 보관하였고, 0.4 mg/ml 농도의 마이토마이신씨를 5분간 처리한 후 배지로 세척하고 DMEM으로 각각의 처리 시간 동안 배양하여 생화학 분석에 사용하였다. 이때 대조군은 PBS를 5분간 동일하게 처리한 후 배지로 교환하였다.

세포 배양

세포는 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% FBS, 100 IU/ml 페니실린 지와 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배양액으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 교체하여 대수증식기(expansional phase)에 있는 세포를 이용하였다.

산성 소포성 소기관(acidic vesicular organelles) 생성의 측정

마이토마이신씨에 의한 사람 태논낭 섬유아세포의 죽음의 형태에 자가포식현상이 관여하는지 확인하기 위해서 자가포식현상의 일반적인 특징인 산성 소포성 소기관의

생성 유무를 산성 성분을 선택적으로 염색하는 아크리딘 오렌지 염색과 MDC 염색 후 유세포분석기(FACS caliber, BD Bioscience)를 이용하는 두 가지 방법으로 조사하였다. 먼저 세포의 형태적 변화는 0.4 mg/ml 농도의 마이토마이신씨를 5분간 처리 후 배지를 교체하여 1, 3, 6, 12, 24시간까지 배양한 후 세포를 1 µg/ml의 아크리딘 오렌지와 15분 반응한 후 PBS로 세척하여 형광현미경(IX71, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 또 다른 방법으로는 산성 소포성 소기관 여부를 유세포분석기를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 24시간 배양 후 50 mM MDC를 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 포집하였다. FL1 parameter는 MDC에 의한 녹색 형광의 세기 정도를 나타낸 것으로 산성 소포성 소기관이 많을수록 형광세기가 증가한다.

Western blotting

자가포식현상 과정 중 오토파고솜 형성에 중요한 역할을 담당하는 LC3 (Atg8) 단백질은 두 가지 형태로 존재하는데, 18 kDa의 LC3-I 단백질은 세포질에 존재하고, 16 kDa의 LC3-II 단백질은 오토파고솜막(autophagosome membrane) 안에 위치한다. 또한 세포질에 광범위하게 존재하는 Beclin-1 (Atg-6) 단백질은 자가포식현상 과정을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다. 마이토마이신씨에 의한 사람 태논낭 섬유아세포 사멸에서 자가포식현상 관련 LC3-II와 Beclin-1의 발현 변화를 Western blot 방법으로 조사하였다. 0.4 mg/ml 마이토마이신씨 처리 후 24시간 배양한 세포를 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 2회 세척하였다. 세포는 RIPA용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 µg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포부유액은 buffer와 섞어 98°C에서 5분간 끓인 후 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 겔(gel)의 단백질은 4°C, 30 V에서 16시간 동안 nitrocellulose membrane에 옮겼다. LC3, Beclin-1 및 β-actin 등에 대한 항체를 tris-buffered saline (TBS)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였다. 이어서 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 상온에서 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)을 사용하여 필름에 노출하였다. LC3-I, LC3-II 및 Beclin-1 단백질의 발현을 β-actin과 상대적인 수치로 계산하였다.

자가포식현상 억제제인 3-MA 전처리 후 소포성 소기관 생성의 측정

사람 테논낭 섬유아세포에 25 mM의 3-MA를 30분 전처리 후 0.4 mg/ml 농도의 마이토마이신씨를 5분간 처리한 후 24 시간 배양하여 산성 소포성 소기관의 형성 여부를 아크리딘 오렌지 염색 후 형광현미경 관찰하고 MDC 염색 후 유세포분석기로 조사하였다

통계처리

표시된 결과는 최소3번 이상의 독립적인 실험결과이며 대조군과 실험군의 차이는 Origin 7.5의 통계프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 을 기준으로 평가하였다.

결 과

마이토마이신씨가 사람 테논낭 섬유아세포의 산성 소포성 소기관 생성에 미치는 영향

세포내의 산성 소포성 소기관의 증가는 세포의 자가포

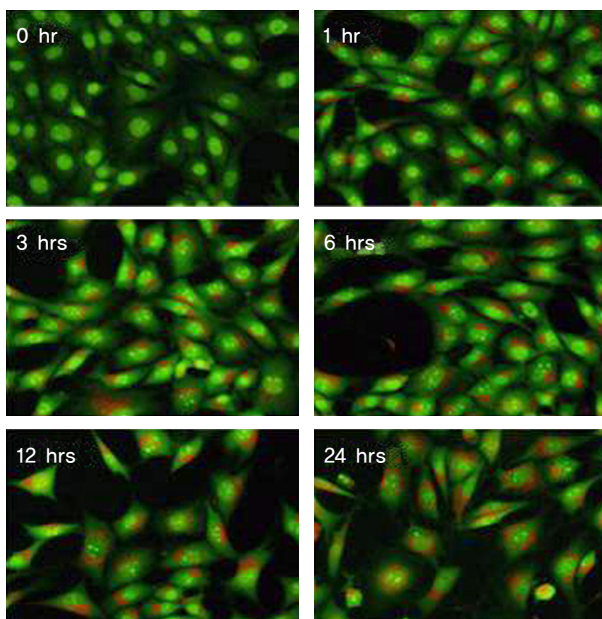


Figure 1. Mitomycin-C induced an increase of acidic vesicular organelle in human tenon's capsule fibroblasts in a time-dependent manner. Cells were treated with 0.4 mg/ml mitomycin-C for the indicated periods. Cells were stained with acridine orange for 15 min and then the fluorescence intensity of the cells was visualized under fluorescence microscope.

식현상때 나타나는 현상이다. 이 소기관 농도에 비례하여 증가하는 오렌지색 형광이 처리 1시간 후부터 확인되었으며 시간에 비례하여 증가되었다(Fig. 1). 또한, 산성 성분을 염색하는 시약인 monodansylcadaverin (MDC) 염색

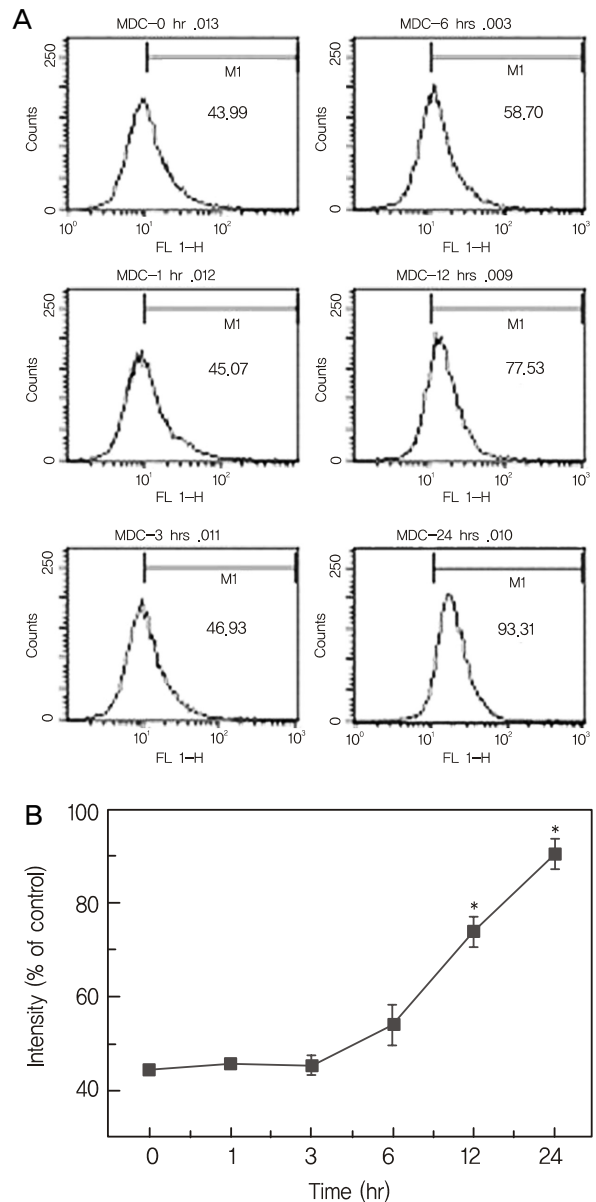


Figure 2. Mitomycin-C induced an increase of acidic vesicular organelle in human tenon's capsule fibroblasts in a time-dependent manner. (A) Cells were treated with 0.4 mg/ml mitomycin-C for the indicated periods. Cells were stained with monodansylcadaverine for 30 min and then the cells were harvested. After washing out the unbound dye, the cells were subjected to flow cytometric analysis for estimation of intracellular acidic vesicular organelle levels. (B) Relative intensities comparing the mitomycin-C treated group with the control group of the FACS analysis. (* $p < 0.001$ by one-way ANOVA).

시에 산성 소포성 소기관 생성은 마이토마이신씨 처리 1시간 후부터 증가하기 시작하여 대조군 $44.61 \pm 1.05\%$ 에 비교하여 6시간 후에는 $53.97 \pm 4.37\%$, 12시간 후에는 $73.98 \pm 3.67\%$ 그리고 24시간 후에는 $90.20 \pm 3.12\%$ 로 증가하였다($p < 0.001$, Fig. 2). 따라서, 마이토마이신씨에 의한 사람 테논낭 섬유아세포 사멸은 산성 소포성 소기관이 시간에 비례하여 증가하는 자가포식현상이 관여하는 것으로 판단되었다.

마이토마이신씨가 사람 테논낭 섬유아세포의 자가포식현상 관련 단백질 발현에 미치는 영향

마이토마이신씨(0.4 mg/ml)를 5분간 처리 후 다양한 시간동안 배양한 결과, LC3-I의 발현 분절은 마이토마이신씨 처리 6시간 후부터 감소하였고, LC3-II는 12시간 후부터 증가된 발현 양상을 보였다($p < 0.05$). 또한 Beclin-1 단백질의 발현은 마이토마이신씨 처리 1시간 후부터 증가하기 시작하여 시간 의존적으로 증가하는 양상을 보였다($p < 0.01$, Fig. 3). 전기영동에 사용한 단백질 양은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다.

3-MA가 마이토마이신씨에 의한 사람 테논낭 섬유아세포의 산성 소포성 소기관 형성에 미치는 영향

마이토마이신씨에 의한 사람 테논낭 섬유아세포의 자가포

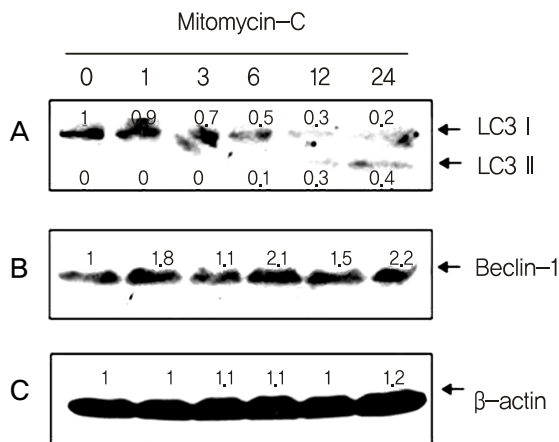


Figure 3. Mitomycin-C induced both LC3-II cleavage and Beclin-1 expression of human tenon's fibroblasts in a time-dependent manner. Cells were treated with 0.4 mg/ml mitomycin-C for the indicated periods. Cells were separated on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and immunoblotted with anti-LC3 (A), anti-Beclin-1 (B), and anti- β -actin (C) antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL kit. The protein levels of β -actin were used as the control.

식현상을 관찰하였으므로, 자가포식현상 억제제인 3-MA를 전처리하여 마이토마이신씨에 의한 자가포식현상을 재확인 하였다. 그 결과 마이토마이신씨에 의하여 증가하였던 MDC의 형광 세기가 3-MA 전처리에 의하여 대조군 수준으로 억제되었으며($90.64 \pm 8.05\%$: $56.58 \pm 4.49\%$, $p < 0.01$), 3-MA 단독 처리가 MDC 형광세기 변화에 미치는 효과는 없었다($47.39 \pm 4.26\%$, $p = 0.25$) (Fig. 4). 자가포식현상 억제제인 3-MA를 마이토마이신씨와 함께 전처리 후 아크리딘 오렌지 염색 후 세포내 산성 성분이 염색되는 것을 마이토마이신씨 처리만 한 대조군과 비교한 결과 오렌지 형광 물질이 3-MA 처리 시 형광 발현이 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

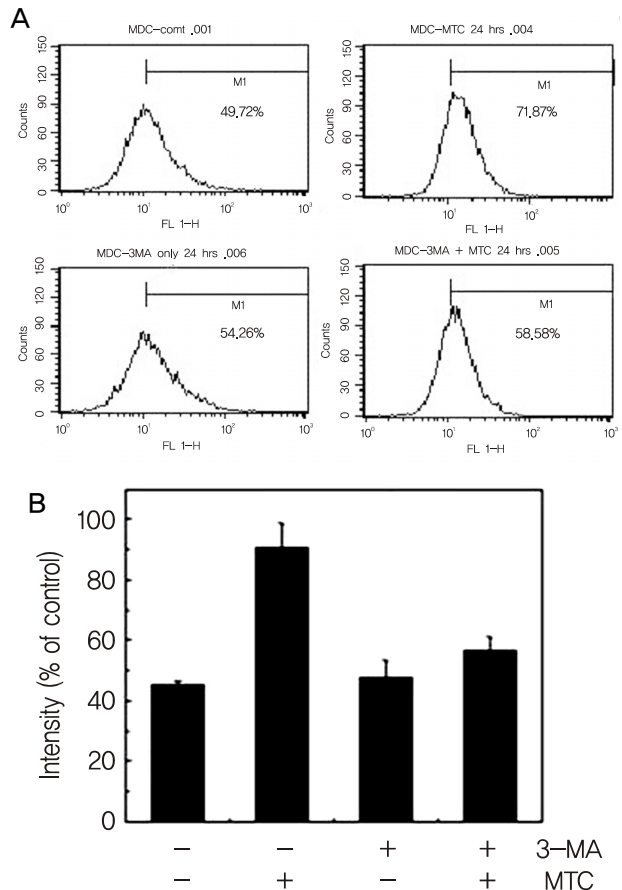


Figure 4. 3-MA inhibited the mitomycin-C induced increase of acidic vesicular organelle in HTCfs. (A) Cells were treated with 0.4 mg/ml mitomycin-C for indicated periods. Cells were stained with monodansylcadaverine for 30 min and then harvested. After washing out the unbound dye, the cells were subjected to flow cytometric analysis for estimation of intracellular acidic vesicular organelle levels. (B) Relative intensities of the FACS analysis. ($p < 0.01$ by one-way).

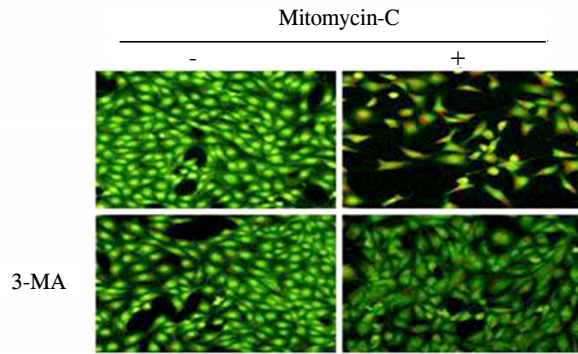


Figure 5. Fibroblasts were stained with acridine orange for 15 min and then the fluorescence intensity of the cells were visualized under fluorescence microscope. Anti-autophagy agents decreased acidic vesicular organelle.

고 찰

마이토마이신씨는 *Streptomyces caespitosus*에서 추출한 항암성 항생제로서 군날개 절제술, 녹내장 여과수술 등에서 섬유아세포의 증식과 혈관신생을 억제하여 수술 성공률을 높이기 위해 수술 중 또는 후에 국소적으로 이용된다. 마이토마이신씨는 결막, 테논낭 또는 다른 조직의 섬유아세포, 각막 상피세포, 모세혈관의 증식을 억제하는 효과가 알려져 임상적으로 많이 연구되며 사용되고 있다.^{6,8,9} 그러나 심한 세포 독성 때문에 이용이 제한되어 지금까지 적절한 농도와 노출 시간에 대한 임상적 연구가 많이 이루어지고 있으며, Seong et al⁷은 마이토마이신씨는 1.0 mg/ml 농도까지 농도와 처치 시간에 비례하여 테논낭 섬유아세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유발하며, 이는 caspase 경로, 그 중에서도 미토콘드리아 경로인 caspase 3 경로와 caspase 9 경로를 통해 생기며 JNK1 (c-Jun N-terminal kinases)의 활성화가 마이토마이신씨의 세포독성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

자가포식현상(autophagy)과 발암, 근육질병, 퇴행성 신경질환, 및 병원균 침입에 대한 방어 및 노화 등의 연관성 규명을 위한 여러 연구들이 이루어지고 있다. 자가포식현상이 관여한 세포자멸사는 type II programmed cell death (PCD)인데 반하여 세포질, 염색체 응축 및 DNA 분절 등의 특징으로 보여주는 세포자멸사는 type I PCD로 죽은 세포는 탐식세포(phagocytes)에 의해 분해되고 제거가 이루어진다. 자가포식현상에 의한 세포죽음은 다수의 세포 제거가 필요한 상황이나 탐식세포가 쉽게 접근하기 힘든 부위에서 잘 관찰되며 가장 큰 특징은 세포질내에 산성의 autophagy vesicle이 축적되어 lysosomal machinery가 관여한다는 것이다. 따라서 세포자멸사에서 이용

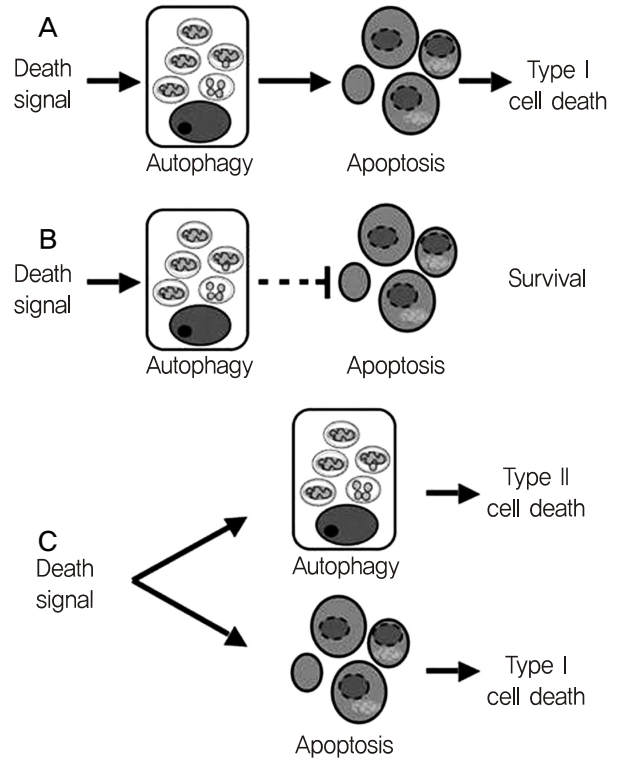


Figure 6. Apoptosis/autophagy connection in programmed cell death. (A) Autophagy may be indispensable for the occurrence of apoptosis. (B) Autophagy may antagonize apoptosis. (C) Apoptosis and autophagy may occur independently of each other. Inhibition of apoptosis may convert cell death morphology to autophagic and vice versa.

되는 리소좀 분해효소가 탐식세포에서 유래하는 것과 비교하여 오토파지에서는 내인성 분해효소라는 차이점이 있다. 그러나 자가포식현상에 의한 직접적인 세포사멸 기전에 대해서는 아직까지 증거가 부족하다.³ 최근 연구 결과에 의하면 caspase 억제제로 세포자멸사를 억제할때도 autophagic cell death가 관찰되며, 오토파지를 조절하는 Beclin-1과 Atg7의 세포내 발현 정도를 낮춘 결과 caspase 억제제 매개성 세포 죽음이 관찰되었다.¹⁰ 이는 자가포식현상이 세포죽음과 밀접한 관련이 있음을 알려주는 동시에 autophagic cell death와 apoptosis 또한 밀접하게 관련이 있음을 제시하고 있다(Fig. 6).¹¹ 일반적으로 낮은 수준의 세포 스트레스에 의한 자가포식현상 유도는 세포내의 항상성 유지와 생존에 필요한 기전으로 이해되나, 과도한 세포 스트레스는 자가포식현상으로 인한 type II PCD로 알려져 있다.¹² 이전 연구에서는 마이토마이신씨는 사람 테논낭 섬유아세포에서 농도와 시간의존적인 세포자멸사를 유도하였으며,⁷ 본 연구에서는 세포 사멸이 발생하지 않는 시점에 세포 내에 자가포식현상의 특징인 산성

소포성 소기관(acidic vesicular organelle)이 시간 의존적으로 형성되었다. 또한 자가포식현상 중 오토파고솜(autophagosome) 형성을 위해 증가되는 단백질인 LC3의 type 2 (LC3-II)와 Beclin-1이 마이토마이신씨 처리 후 시간 의존적으로 증가하였다. 특히 오토파고솜 형성 억제제로 잘 알려진 3-MA처리 시 자가포식현상의 특징적인 현상인 산성 소포성 소기관의 형성이 억제되었다. 따라서 마이토마이신씨에 의한 사람 테논낭 섬유아세포의 세포자멸사는 초기 자가포식현상에 의해 매개되었을 가능성이 있다고 추정된다.

세포자멸사의 과정은 크게 두 가지로 대별되어 왔는데, 즉 사망 수용체(death receptor, Fas/FasL, TNF- α 등)를 통한 수용체 매개성(외인성) 세포사멸 신호전달 기전과 항산화화제, 반응성 산소기(ROS) 등 다양한 인자들에 의해 유발되는 미토콘드리아 매개성(내인성) 세포사멸 신호전달 기전이 알려져 있다. 여기에 최근 소포체(endoplasmic reticulum, ER)의 자극(stress)에 의해 유도되는 제3경로가 제안되었다.¹³ 자가포식현상이 어떤 경로를 통해 세포자멸사를 유도하는지는 추가로 분자생물학적 연구가 필요할 부분이다.

이상의 결과를 종합하면, 마이토마이신씨는 사람 테논낭 섬유아세포의 산성 소포성 소기관 생성과 Beclin-1의 발현증가, LC3의 활성화에 따른 전형적인 자가포식현상을 유도했으며, 이 현상은 세포자멸사의 발현 전과 초기에 관찰되어 세포자멸사의 초기 반응을 매개하였을 것으로 생각한다. 그러나 자가포식현상과 세포자멸사 사이의 연관성과 신호전달 경로는 좀 더 연구가 필요한 부분이다. 이러한 연구결과들은 자가포식현상과 관련된 유전자 연구 및 활성화 약물 또는 억제 약물 등의 개발로 새로운 치료

법에 기초지식을 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Breiden DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature* 2006;443:796-802.
- 2) Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;6:463-77.
- 3) Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004;306:990-5.
- 4) Edinger AL, Thompson CB. Death by design : apoptosis, necrosis, and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:663-9.
- 5) Beckers HJ, Kinders KC, Webers CA. Five-year results of trabeculectomy with mitomycin C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:106-10.
- 6) Oh JH, Kim HK. The Effect of Preoperative Subconjunctival Injection of Mitomycin C and Triamcinolone in Recurrent Pterygium. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:1005-14.
- 7) Seong GJ, Park C, Kim CY, et al. Mitomycin-C induces the apoptosis of human tenon's capsule fibroblast by activation of c-Jun N-terminal kinase 1 and caspase-3 protease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3545-52.
- 8) Bergstrom TJ, Wilkinson WS, Skuta GL, et al. The effects of subconjunctival mitomycin-C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1725-30.
- 9) Choi JW, Kim TI, Tchah HW. Apoptosis of keratocytes induced by mitomycin C. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:490-9.
- 10) Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004;304:1500-2.
- 11) Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004;23:2891-906.
- 12) Meijer, A. Codogno JP. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2445-62.
- 13) Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000;403:29-30.

=ABSTRACT=

Autophagy of Human Tenon's Capsule Fibroblasts Induced by Mitomycin-C

Channy Park, PhD^{1,2}, Raekil Park, MD, PhD^{1,2}, Seong Kwang Ryu, MD³, Dong Wook Lee, MD, PhD³

Department of Audiology, Nambu University¹, Gwangju, Korea

VestibuloCochlear Research Center & Department of Microbiology, Wonkwang University², Iksan, Korea

Department of Ophthalmology, Chonbuk National University Medical School³, Jeonju, Korea

Purpose: The present study investigated whether an autophagic process is involved in the apoptotic death of human tenon's capsule fibroblasts (HTCFs) caused by mitomycin-C.

Methods: An autophagic phenotype was tested using fluorescence microscopy and flow cytometry with specific biological staining dyes including monodansylcadaverine and acridine orange and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3).

Results: Treatment with mitomycin-C (0.4 mg/ml) increased the acidic vesicular organelles of tenon's capsule fibroblasts in a time dependent manner. Mitomycin-C induced both LC3-II cleavage and beclin-1 expression. 3-MA, a pharmacological inhibitor of autophagy, inhibited the mitomycin-C induced increase of acidic vesicular organelles.

Conclusions: Autophagy was induced with 0.4 mg/ml mitomycin-C in tenon's capsule fibroblasts. And, autophagic mechanisms may be involved in the early stage of apoptosis of fibroblasts.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(11):1337-1343

Key Words: Autophagy, Fibroblast, Mitomycin-C

Address reprint requests to **Dong Wook Lee MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Chonbuk National University Hospital
#634-18 Geumam-dong, Deokjin-gu, Jeonju 561-712, Korea
Tel: 82-63-250-1960, Fax: 82-63-250-1960, E-mail: ldw@jbnu.ac.kr