

배양된 사람 코점막 섬유아세포에 대한 마이토마이신 C와 5-플루오로우라실의 효과

김근해¹ · 김인택²

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실¹, 경북대학교 의과대학 안과학교실²

목적: 항대사물질인 mitomycin C (MMC)와 5-fluorouracil (5-FU)이 각각 배양된 사람 코점막 섬유아세포의 증식에 미치는 효과에 대해 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 배양된 사람 코점막 섬유아세포를 여러 농도의 MMC와 5-FU에 각각 5분간 노출시키고, 대조군은 약물 처리 없이 DMEM 배지에만 노출시켰다. 위상차 현미경으로 섬유아세포의 형태학적 관찰 후 세포의 생존율은 MTT assay로, 세포 자가사멸은 Acridine orange/Hoechst (AO/HO) 염색법으로 평가하였다.

결과: MMC와 5-FU에 노출된 두 실험군 모두에서 섬유아세포는 정상적인 방추형 모양을 잘 유지하였고, MTT assay 결과상 약물 농도 의존적으로 섬유아세포의 증식을 억제시켰다. 또한, AO/HO 염색 시 두 실험군 모두에서 자가소멸 세포가 관찰되었다.

결론: MMC와 5-FU는 모두 생체 외 환경에서 섬유아세포에 대해 항증식 효과를 나타내었고, 세포 자가사멸이 그 기전에 연관성이 있는 것으로 보인다. 따라서 코경유 눈물주머니코안연결술 시 두 약물의 보조적 사용은 코점막 증식을 억제함으로써 수술 결과를 향상시킬 수 있을 것이다.

〈대한안과학회지 2011;52(2):233-240〉

코눈물관폐쇄 치료의 수술요법인 코경유 눈물주머니코안연결술은 Caldwell¹에 의해 처음 시도된 후 내시경의 발달로 1989년 McDonogh and Meiring²이 코내시경을 이용한 수술을 처음 보고하면서 본격적으로 시행되기 시작하여 현재는 보편적으로 시행되고 있다. 내안각 조직에 손상을 주지 않아 눈물펌프 기능의 손상 없이 수술이 가능하고 술 중 출혈이 적을 뿐만 아니라 수술시간이 짧으며 피부 흉터가 남지 않는다는 장점이 있지만, 수술 성공률이 술자의 숙련도에 따라 차이가 있어 여러 문헌에서 70~94%로 다양하게 보고되고 있다.³⁻⁶

수술 실패의 가장 흔한 원인은 코안 골공 부위의 폐쇄로 골공 부위에 점착적인 반흔이나 육아종 형성으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹ 골공 부위를 가능한 한 크게 만드는 것이 재발의 위험성을 감소시킬 수 있지만, 섬유아세포의 반응과 이로 인한 반흔 형성을 줄이는 것이 주요 관건이다.^{10,11} 그래서 수술 성공률을 높이기 위해 수술 중 0.4 mg/ml 마이토마이신 C (Mitomycin C, MMC)나 5 mg/ml

5-플루오로우라실(5-fluorouracil, 5-FU)을 코안 골공 부위에 5분간 처리하거나, 수술이 끝날 때 sodium hyaluronate와 sodium carboxymethylcellulose를 혼합하여 제조한 용액형 유착방지제를 골공 부위에 사용하기도 한다.¹²⁻¹⁴ 또한 수술 후 골공이 막히지 않도록 하기 위해 대부분 분무형 스테로이드제를 사용하며, 일부에서는 0.02% MMC 안약을 하루 두 번씩 일주일간 점안하기도 한다.¹⁵ 이 중 MMC를 이용한 눈물주머니코안연결술은 대부분의 연구에서 높은 성공률을 보고하였으며, 일부에서 효과가 없다고 보고하였다.^{12,13,16-18} 그러나 5-FU를 이용한 수술은 일부에서는 골공의 폐쇄를 지연시키거나 막는 것으로 보고하고 있고, 일부에서는 재발에 더 나은 결과를 보이지 않는다는 보고도 있어 그 결과에 논란이 많다.^{13,19,20} 또한 MMC를 배양된 사람의 코점막 섬유아세포에 짧은 시간 노출시켰을 때 세포의 증식이 억제되고 세포 자가사멸(apoptosis)을 일으켰다고 보고한 연구는 있었지만,²¹ 5-FU를 코점막 섬유아세포에 노출시킨 후의 효과에 대한 연구는 아직까지 없다.

본 연구는 코경유 눈물주머니코안연결술 중 흔하게 사용되고 있는 MMC가 코점막 섬유아세포에 대해 항증식 효과를 가지는지 확인하고, 수술 중 5-FU를 보조적으로 사용하는 것이 수술의 성공률을 높이는 데 MMC만큼 효과적인지 알아보기 위해 시행되었다. 이에 저자는 사람의 코점막 섬유아세포를 일차배양하여 여러 농도의 MMC와 5-FU에

■ 접수 일: 2010년 12월 27일 ■ 심사통과일: 2011년 1월 5일
■ 게재허가일: 2011년 1월 26일

■ 책임저자: 김 근 해
대구시 남구 대명 4동 3056-6
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4148, Fax: 053-627-0133
E-mail: kimkh@cu.ac.kr

각각 노출시킨 후 두 항대사물질이 섬유아세포의 증식에 대해 억제 효과를 가지는지 측정하고 그 이전에 세포 자가소멸 (apoptosis)이 관련되어 있는지에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법

사람 코점막 섬유아세포의 일차배양(Primary culture)

알레르기성 비염, 용종 등의 이비인후과적 질환이나 코 수술의 과거력이 없이 원발성 후천적 코눈물관폐쇄로 수술 할 예정인 10명의 환자에서 코내시경을 이용한 코경유 눈물 주머니코안연결술 도중 중간코선반의 부착지점 바로 앞쪽의 코점막 조직 일부를 절제하였다. 절제한 코점막 조직을 PBS (phosphate-buffered saline, Gibco, CA, USA) 용액으로 세척한 후 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, CA, USA)와 함께 1% 항생제와 항진균제(antibiotic-antimycotic, Gibco, CA, USA)가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, CA, USA) 배지에 고정하였다. 조직의 상부만 약간 노출될 정도로 배지를 넣어 세포가 바닥에 잘 부착될 수 있게 하고 5% 이산화탄소가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 3일 후 위상차 현미경으로 세포가 조직 주위로 바닥에 자라나오는 것을 확인한 후 조직을 제거하고 새 배지로 교환하였다. 이후 이틀에 한 번씩 배지를 교환하면서 세포가 100 mm 배양접시에 80%로 밀집하게 자랄 때까지 배양하였다.

계대배양(Subculture)

세포가 배양접시에 밀집하게 되면 배지를 제거하고 PBS를 이용해 1회 씻은 후 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, CA, USA)를 처리하여 세포가 배양접시에서 완전히 분리되도록 뒤섞은 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 넣어서 trypsin의 활성을 멈췄다. 1000 rpm에서 10분간 원심분리를 시행하고 세포 침전물(cell pellet)만 남긴 채 상층액을 제거하였다. 세포 침전물을 PBS로 씻은 후 다시 같은 조건으로 원심분리를 시행하였다. 세포 침전물만 남기고 상층액을 제거한 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 넣고 섞어서 이를 100 mm 배양접시에 담았다. 이런 식으로 계대배양을 반복하였고, 모든 실험에는 4차 계대 세포를 이용하였다.

약물처리

배양된 섬유아세포를 형태학적으로 확인한 다음 24 well plate의 각 well에 1×10^5 cells/ml의 농도로 분주한 후 10%

FBS와 함께 1% 항생제와 항진균제가 포함된 DMEM 배지를 공급하여 24시간 동안 5% 이산화탄소 배양기에 넣어 배양시켜서 세포를 바닥에 부착시켰다. 세포에 처리할 약물을 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 MMC는 0.4, 0.2, 0.1, 0.01 mg/ml의 농도로 단계별로 희석하고, 5-FU는 25, 10, 5, 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 준비하였다. 이때 실험에 사용된 약물의 각 농도는 실제 임상적으로 사용하는 농도를 기준으로 결정하였는데, 1.0 mg/ml 농도 이상의 MMC는 실험 중 세포 괴사가 심하여 실험에서 제외하였다.

세포를 24시간 배양시켜 바닥에 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 각 농도의 약물이 포함된 DMEM 배지를 500 μ l씩 넣어 5분간 처리한 후 PBS로 1회 세척하였다. 그리고 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지를 추가하여 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군은 약물 처리를 하지 않고 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지만 24시간 동안 배양하였다.

형태학적 관찰

MMC와 5-FU를 각각 여러 농도에 따라 섬유아세포에 5분간 노출시키고 24시간 배양한 후 세포의 형태학적 변화를 100배율의 위상차 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1, 2). 실험군 세포의 모양은 약물 처리를 전혀 하지 않은 대조군의 세포와 비교하여 관찰하였다.

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay (MTT assay)

각 농도의 MMC와 5-FU가 섬유아세포의 증식에 영향을 주는지 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다.²²⁻²⁴ 이는 노란색의 수용성 기질인 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 살아있는 세포에 있는 미토콘드리아 내 숙신산 탈수소효소에 의해 환원되어 보라색을 띠는 비수용성의 formazan 결정을 형성하는 것을 이용하는 방법이다.

여러 농도의 MMC와 5-FU로 5분간 처리한 섬유아세포를 24시간 배양한 후 각 well에 있는 상층액을 모두 제거하고 나서 PBS로 2회 세척하였다. Well당 5 mg/ml 농도의 MTT (Sigma, MO, USA) 100 μ l와 DMEM 배지 400 μ l를 넣고 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 버린 후 각 well을 다시 PBS로 1회 씻어낸 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma, MO, USA)를 well당 500 μ l씩 넣고 실온에서 24 well plate를 15분간 흔들어 반응이 잘 일어나게 하였다. 각 well에서 200 μ l씩을 96 well plate로 옮긴 후 분광광도계

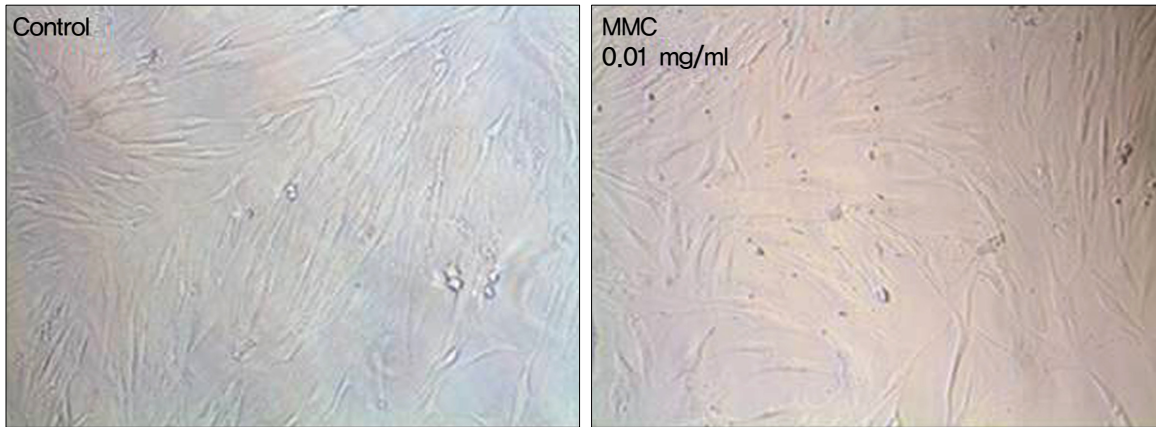


Figure 1. The morphology of cultured human nasal mucosa fibroblasts under phase-contrast microscope. Fibroblasts were treated with various concentrations of MMC for 5 minutes and then incubated. Images are representatives of day 1 of culture. The viable cells were spindle-shaped at all concentrations of MMC. Magnification, $\times 100$. MMC = mitomycin C.

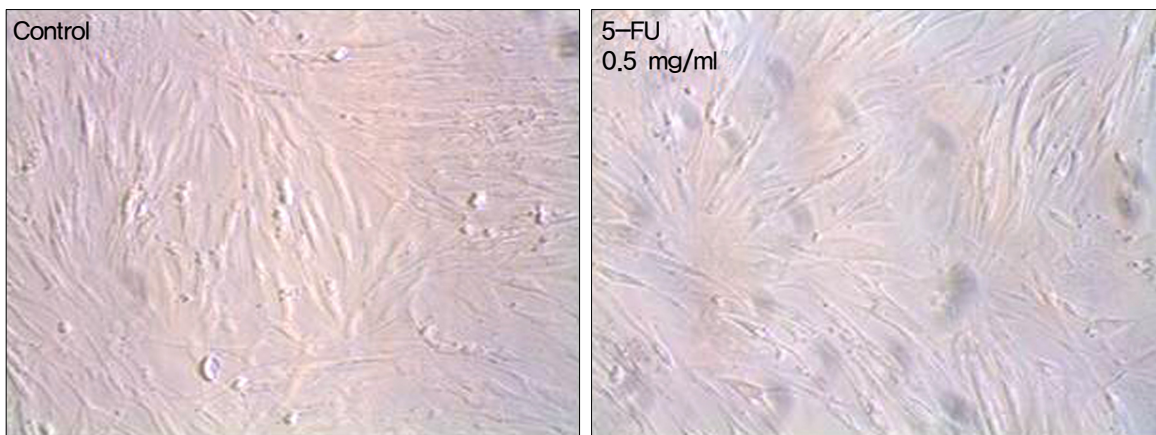


Figure 2. The morphology of cultured human nasal mucosa fibroblasts under phase-contrast microscope. Fibroblasts were treated with various concentrations of 5-FU for 5 minutes and then incubated. Images are representatives of day 1 of culture. The viable cells were spindle-shaped at all concentrations of 5-FU. Magnification, $\times 100$. 5-FU = 5-fluorouracil.

(FLUOstar OPTIMD, BMG LABTECH, Germany)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Acridine orange/Hoechst 염색(AO/HO 염색)

MMC와 5-FU가 세포 자가소멸(apoptosis)을 유발하는지 알아보기 위하여 Acridine orange (Sigma, MO, USA)와 Hoechst 33342 (Molecular probes, OR, USA)를 이용한 이중염색을 실시하였다.²⁵

0.4 mg/ml 농도의 MMC와 25 mg/ml 농도의 5-FU에 5분간 노출된 각각의 섬유아세포를 3시간 배양한 후 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 때와 마찬가지로 원심분리한 후 혈청이 포함되지 않은 배지를 섞어서 세포부유액을 만들었다. 세포부유액 10 μ l를 0.001% acridine orange와 0.001% Hoechst 33342로 만든 용액 10 μ l와 섞은 후 슬라이드에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮어서 청색 채널의

형광현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Japan)으로 400배율 하에 사진을 촬영하여 관찰하였다.

통계학적 처리

모든 실험은 총 3회 반복하여 시행하였다. 전체적인 통계적 처리는 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)을 사용하였고, 두 군간의 비교는 일원배치 분산분석을 이용해 Tukey HSD로 사후검정을 실시하였다. 통계학적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

형태학적 관찰

코점막 섬유아세포를 0.01, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml 농도의

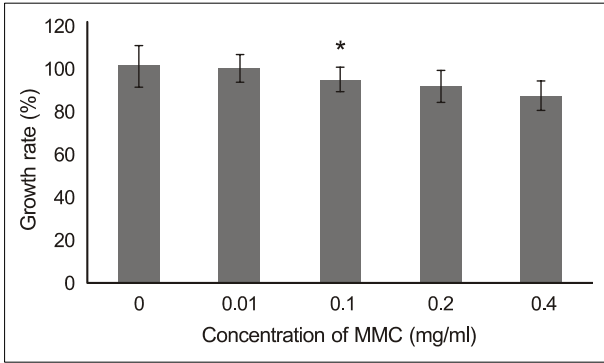


Figure 3. The viability of the cultured human nasal mucosa fibroblasts treated with various concentrations of MMC. Fibroblasts were treated for 5 minutes with MMC (0.01, 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml), washed and further incubated for 24 hr. Optical density (OD) of the fibroblasts was measured using MTT assay. Growth rates (%) were calculated as $[100 \times (\text{OD values of drug-treated cells} / \text{OD values of non-treated cells})]$. Values and bars represent means of growth rates and the SD, respectively. * $p < 0.05$ compared to non-treated control. MMC = mitomycin C.

MMC에 각각 5분간 노출시키고 24시간 배양하였을 때 모든 농도에서 세포는 섬유아세포의 전형적인 양상인 방추형 모양을 잘 유지하였고 세포의 크기도 별다른 차이를 보이지 않았다. 섬유아세포를 0.5, 5, 10, 25 mg/ml 농도의 5-FU에 각각 5분간 노출시키고 24시간 배양 시에도 MMC 노출 시와 마찬가지로 모든 실험 농도에서 섬유아세포의 방추형 모양이 정상적으로 잘 유지되고 크기도 정상적인 소견을 보였다(Fig. 1, 2).

MTT assay

MMC에 5분간 노출시키고 24시간 배양한 후 섬유아세포의 평균 증식률을 측정하였을 때, 0.01 mg/ml 농도에서 섬유아세포의 평균 증식률은 98.9%이었고, 0.1 mg/ml 농도에서 93.8%, 0.2 mg/ml 농도에서 90.6%, 0.4 mg/ml 농도에서는 86.4%로 각각 나타났다(Fig. 3). 5-FU에 5분간 노출시키고 24시간 배양 시 0.5 mg/ml 농도에서는 섬유아세포의 평균 증식률이 대조군과 비교해서 변화가 없었고, 5 mg/ml 농도에서는 95.3%, 10 mg/ml 농도에서는 92.5%, 25 mg/ml 농도에서는 90.9%로 나타났다(Fig. 4). MMC는 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml의 농도에서 약물처리를 하지 않은 대조군에 비해 섬유아세포의 생존을 통계학적으로 유의하게 감소시켰고, 5-FU는 5, 10, 25 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 섬유아세포의 생존을 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$). MMC와 5-FU 두 약물은 모두 낮은 농도에서는 대조군에 비해 유의한 변화를 보이지 않았으나 농도가 높아지면 통계학적으로 유의하게 섬유아세포의 증식을 억제시키는

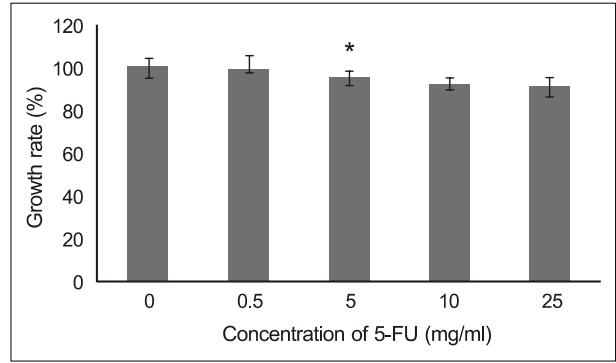


Figure 4. The viability of the cultured human nasal mucosa fibroblasts treated with various concentrations of 5-FU. Fibroblasts were treated for 5 minutes with 5-FU (0.5, 5, 10, 25 mg/ml), washed and further incubated for 24 hr. Optical density (OD) of the fibroblasts was measured using MTT assay. Growth rates (%) were calculated as $[100 \times (\text{OD values of drug-treated cells} / \text{OD values of non-treated cells})]$. Values and bars represent means of growth rates and the SD, respectively. * $p < 0.05$ compared to non-treated control. 5-FU = 5-fluorouracil.

농도 의존성 변화를 보였다.

Acridine orange/Hoechst 염색(AO/HO 염색)

AO와 HO로 이중염색을 시행한 후 형광현미경의 청색 채널로 관찰하면 살아있는 세포의 핵은 푸른색으로 빛나고, 자가소멸 중인 세포의 핵은 초기에는 밝은 노란색으로 나타나고 시간이 지나면서 주황색으로 염색된다. 살아있는 세포의 세포질 내 리소좀은 주황색의 과립으로 나타나며, 자가소멸 중인 세포의 세포질은 다홍색으로 보인다.

약물 처리를 하지 않은 대조군의 세포는 세포의 핵이 푸르게 염색되고 세포질 내에 상당한 주황색 과립이 관찰되었다. 섬유아세포를 0.4 mg/ml MMC에 5분간 노출시키고 3시간 배양한 후에 AO/HO 이중염색을 시행한 결과 대조군과 다르게 자가소멸하는 세포를 관찰할 수 있었는데, 그 세포의 핵은 밝은 주황색으로 염색되고 세포질은 다홍색을 나타내어 핵과 세포질을 명확히 구별할 수 없었으며, 현미경 시야(high power field) 당 평균 0.8개가 관찰되었다. 섬유아세포를 25 mg/ml 5-FU에 5분간 노출시키고 3시간 배양한 후 이중염색 시에도 MMC 노출 시와 마찬가지로 세포질과 핵의 구분이 정확히 안 되는 진한 주황색의 핵을 보이는 자가소멸 중인 세포를 현미경 시야당 평균 0.6개 비율로 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

눈물주머니코안연결술의 성공률을 높이기 위해 많은 술

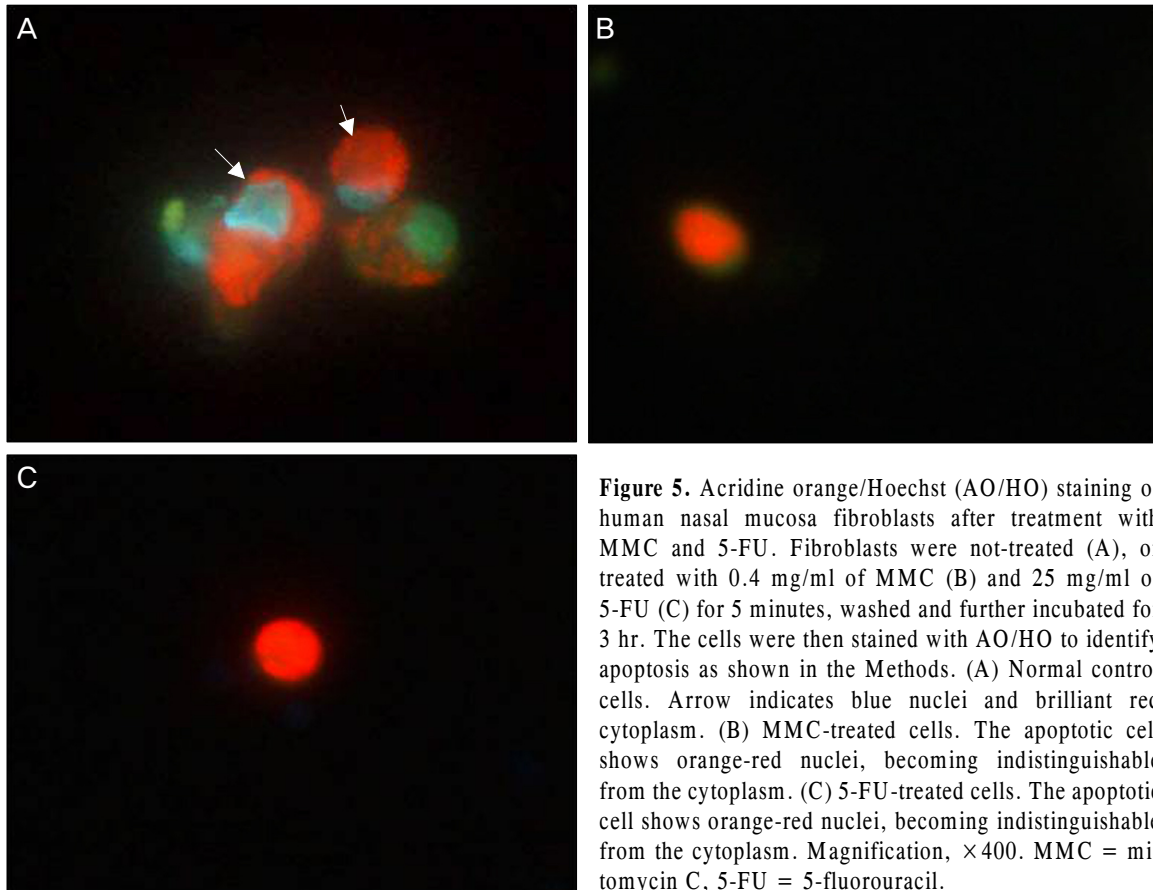


Figure 5. Acridine orange/Hoechst (AO/HO) staining of human nasal mucosa fibroblasts after treatment with MMC and 5-FU. Fibroblasts were not-treated (A), or treated with 0.4 mg/ml of MMC (B) and 25 mg/ml of 5-FU (C) for 5 minutes, washed and further incubated for 3 hr. The cells were then stained with AO/HO to identify apoptosis as shown in the Methods. (A) Normal control cells. Arrow indicates blue nuclei and brilliant red cytoplasm. (B) MMC-treated cells. The apoptotic cell shows orange-red nuclei, becoming indistinguishable from the cytoplasm. (C) 5-FU-treated cells. The apoptotic cell shows orange-red nuclei, becoming indistinguishable from the cytoplasm. Magnification, $\times 400$. MMC = mitomycin C, 5-FU = 5-fluorouracil.

자들이 수술 중 마이토마이신 C (mitomycin C, MMC)나 5-플루오로우라실(5-fluorouracil, 5-FU)을 코안 골공 부위에 보조적으로 도포하는 방법을 쓰고 있다.¹⁴⁻¹⁶

MMC는 안과영역에서 가장 흔히 사용되는 항대사물질로 1958년 Wakaki 등에 의해 *Streptomyces caespitosus*에서 추출된 항암항생제 기능을 가진 약제로 1962년부터 안과 영역에서 군날개 수술 후 육아조직의 증식을 막기 위하여 사용하였고, 그 기전은 DNA와 교차결합을 일으켜서 DNA 합성을 억제하고 DNA-의존성 RNA 형성을 억제하여 세포의 증식을 막는 것이다.^{17,26}

또 다른 항대사물질인 5-FU는 피리미딘 유사물(pyrimidine analogue)로 1957년 Dushinski et al²⁷이 최초로 합성하였고, 1982년 Blumenkranz et al²⁸이 안과영역에서는 처음 사용하여 실험적인 심한 증식성 망막피막에서 유리체강내와 결막하 주사를 시행해서 효과가 있다고 보고한 이후 사용되고 있다. 작용기전은 DNA 합성에 필요한 thymidylate synthetase의 활성을 억제함으로써 섬유아세포의 증식을 억제시켜 반흔을 막는 것으로 알려져 있다.²⁹

MMC와 5-FU는 모두 Yamamoto et al³⁰이 배양된 가토 결막하 섬유아세포를 이용한 실험에서 세포의 운동성보다는 세포 증식을 주로 억제함으로써 섬유아세포의 증식을

억제시킨다고 보고한 이후 녹내장 수술의 고위험군 환자에서 술후 결막하 반흔을 줄이기 위해 많이 사용되어 왔는데,³¹ 눈물길 수술 시에도 골공 부위 코점막의 육아종 형성과 반흔을 억제할 수 있다고 생각되어 현재 이용되고 있으며, 이 중 MMC가 더 흔하게 사용되고 있다. 눈물주머니코 안연결술 시 보조적으로 MMC를 사용하여 성공률이 향상되었다는 보고는 많이 발표되고 있다. Ugurbas et al¹⁶은 0.5 mg/ml의 MMC를 수술 중 2.5분간 골공 부위에 도포한 후 코점막의 밀도와 세포충실도가 감소하게 되어 수술의 성공률이 향상되었다고 보고하였다. Kao et al¹²은 수술 중 0.2 mg/ml 농도의 MMC를 30분간 골공 부위에 도포한 군이 대조군보다 수술 6개월 후 더 큰 골공 크기를 유지하였다고 보고하였다. Yalaz et al¹³은 피부경유 눈물주머니코안 연결술 도중 MMC와 5-FU 같은 항증식제를 도포하여 수술의 성공률이 향상되었는데, 항증식제를 사용한 군의 조직 소견상 세포수가 적었고, 핵의 분열이나 괴사, 핵응축 소견이 관찰되었다고 하였다. 그러나 일부 보고에서는 항증식제의 술중 도포가 성공률에 영향을 미치지 않는다고 하였는데, Zilelioğlu et al¹⁷은 수술 중 0.5 mg/ml 농도의 MMC를 2.5분간 골공의 점막 부위에 도포하였으나 대조군과 비교할 때 골공 크기와 수술 성공률의 증가에 대해 통계학적 유

의성이 없었다고 하였으며, Roozitalab et al¹⁸도 수술 성공률에 영향을 주지 않았다고 보고하였다. Hu et al²¹은 사람의 코점막 섬유아세포에 0.1~0.4 mg/ml 농도의 MMC를 1~5분간 처리하였을 때 약물 농도가 낮고 노출시간이 짧을수록 세포의 증식 억제율이 낮게 나타난다고 하였고, 특히 0.4 mg/ml MMC를 5분간 노출시킨 후 세포의 증식이 31.3%로 억제되고 세포 자가사멸(apoptosis)이 일어났다고 보고하였다. 또한 배양된 가토 골모세포와 배양된 사람의 골모세포에 대해서도 MMC를 고농도로 장시간 처리할 경우 가토와 사람의 골모세포 모두에서 세포의 증식이 효과적으로 억제되었다는 보고도 있다.^{32,33}

이에 반해 수술 중 5-FU를 보조적으로 사용한 보고는 MMC에 비해 많지 않다. 일부에서는 5-FU의 술중 보조적 사용이 골공의 폐쇄를 막을 수도 있다고 보았지만, 일부에서는 술후 더 나은 결과를 보이지 않는다는 보고가 있어 그 효과에 논란이 있는데,^{16,19,20} 최근 Huang et al³⁴이 켈로이드 섬유아세포에 낮은 농도 범위(~10 mg/ml)의 5-FU를 처리하였을 때 세포의 증식이 유의하게 억제되었고, 특히 세포주기 중 G2/M기의 arrest와 세포 자가사멸이 유발되었다고 보고한 바 있다.

이에 본 연구는 코경유 눈물주머니코안연결술 중 흔하게 사용되고 있는 MMC가 코점막 섬유아세포에 대해 항증식 효과를 가지는지 확인하고, 수술 중 5-FU를 보조적으로 사용하는 것이 수술의 성공률을 높이는데 MMC만큼 효과적인지 알기 위해 이루어졌다. 먼저 사람의 코점막 섬유아세포를 일차배양하여 여러 농도의 MMC와 5-FU에 5분간 노출시키고 24시간 배양한 후 섬유아세포를 위상차 현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하고, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay (MTT assay)를 시행하였다. 이때 혈청의 영향을 배제하기 위해 약물 처리 시 FBS가 포함되지 않은 배지를 이용하였다.

MMC와 5-FU에 각각 노출된 후 24시간 배양하고 나서 섬유아세포에 대한 형태학적 관찰상 두 실험군 모두에서 세포의 크기와 정상적인 방추형 모양이 비교적 잘 유지되었다. 약물 노출 직후가 아니라 24시간 배양한 후 세포의 형태를 관찰한 이유는 약물 노출로 인해 일정시간이 경과하였을 때 섬유아세포의 반응을 보기 위함이었다. 이때 두 약물이 각각 세포의 형태에 영향을 미치지 않은 것으로 결과가 나타난 이유는 실험에 사용된 약물의 농도가 비교적 높은 편이었지만, 약물에 5분이라는 매우 짧은 시간 동안 노출되었고 24시간 배양을 한 후에 관찰하였으므로 정상적인 세포의 증식이 함께 관찰되었기 때문으로 생각된다.

MTT assay는 색깔 변화를 측정하여 살아있는 세포의

성장률을 알아내는 검사로 살아있는 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소 활성을 측정하여 빠르고 정확하게 검사할 수 있다는 장점이 있다.²²⁻²⁴ MTT assay 결과에서 MMC는 Hu et al²¹이 보고한 것과 같이 낮은 농도에서는 섬유아세포의 증식을 적게 억제시켰고 농도가 높아지면서 점차 섬유아세포의 증식을 많이 억제시키는 농도 의존성 변화를 보였다. 그러나 본 연구에서는 0.4 mg/ml MMC에 5분간 노출 후 섬유아세포의 억제율이 13.6%로 Hu et al²¹의 31.3% 결과에 비해 억제율이 낮게 나타나서 실험결과에서 큰 차이를 보였다. 이런 결과는 MTT assay를 MMC에 5분간 약물 노출한 직후가 아니라 약물 노출 후 24시간 배양하고 나서 시행하였기 때문으로 생각하며, 본 연구에서 위 실험 조건의 이론적 배경은 실제 임상에서 골공 부위에 MMC를 도포한 직후의 섬유아세포의 반응보다 하루 이상 시간이 경과하였을 때의 코점막 상태가 중요하기 때문이었다. 또한 Hu et al²¹과 다르게 검사의 정확도를 더 높이기 위해 96 well plate가 아닌 24 well plate를 이용하여 세포를 많이 증식시킨 후 검사를 시행하였고, formazan 결정이 형성된 후 상층액을 제거할 때 예기치 않은 세포들과 formazan의 소실이 없도록 주의하였으며, DMSO 처리 시 15분간 94 well plate를 잘 흔들어서 formazan 결정이 충분히 녹도록 한 후 흡광도를 측정하였기 때문으로 생각된다. 5-FU의 경우도 0.5 mg/ml의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 유의한 변화를 보이지 않았으나 농도가 증가함에 따라 섬유아세포의 증식을 유의하게 억제시켰고 약물 농도의 증가에 따라 세포의 증식 억제율이 커짐을 알 수 있었으며, 이 경우에도 세포의 증식 억제율이 크게 높지 않은 것은 MMC의 경우와 마찬가지로 생각된다.

Acridine orange/Hoechst (AO/HO) 염색은 살아있는 세포에서 자가소멸 중인 세포와 정상 세포를 색깔 차이로 간편하고 빠르게 알아볼 수 있는 방법이다.²⁵ 약물 처리 후 24시간 배양하고 나서 이중염색을 시행하여 결과를 관찰하였을 때에는 세포의 자가소멸은 관찰하지 못하였다. 이는 약물 처리가 5분이라는 매우 짧은 시간 동안 이루어졌고, 약물 처리 후 24시간이나 배양하여 그동안 정상적인 세포 증식 과정이 충분히 일어났기 때문으로 생각되었다. 그래서 약물 처리 후 어느 정도 세포의 자가소멸이 일어날 수 있는 시간을 고려하여 3시간 배양한 후 다시 AO/HO 이중염색을 시행하였고, 그 결과 MMC와 5-FU에 각각 처리한 실험군 모두에서 자가소멸을 보이는 세포를 관찰할 수 있었는데, MMC 처리 시 현미경 시야당 평균 0.8개, 5-FU 처리 시 현미경 시야당 평균 0.6개로 나타났다. 자가소멸하는 세포는 AO/HO 이중염색 시 자가소멸의 초기 단계에서는 핵이 밝은 노란색을 띠다가 후기 단계가 되면 핵이 주황색을 나

타내어 리소솜으로 인해 붉은색을 띠는 세포질과 색깔 구분이 어려워지게 되는데, 본 연구에서는 후기 단계에 해당하는 자가소멸 세포를 관찰할 수 있었다.

본 연구의 제한점은 섬유아세포의 증식 억제에 대한 두 약물의 노출시간에 따른 차이를 측정하지 못하였고, 약물의 노출이 생체 밖에서 이루어졌으므로 생체 내에서 유효한 항대사물질의 적절한 농도와 노출시간에 대해 알아내지 못했다는 점이다. 앞으로 코경유 눈물주머니코안연결술 시 보조적으로 필요한 각 항대사물질의 노출농도와 노출시간에 대한 더 많은 연구와 함께 항대사물질의 항증식 작용과 연관된 것으로 밝혀진 세포 자가소멸이 어느 정도로 이루어지는지 밝히기 위하여 흐름세포측정(flow cytometry) 등의 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 특히 5-FU의 경우 MMC보다 높은 농도에서도 섬유아세포 증식을 억제시키는 효과는 적지만 수술 중 효과적으로 작용하는 약물농도와 노출시간에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 임상에서 많이 이용할 수 있을 것이다

결론적으로, 항대사물질인 MMC와 5-FU는 모두 생체의 환경에서 약물 농도에 비례하여 사람의 코점막 섬유아세포의 증식을 억제하였고, 이러한 두 약물의 항증식 효과에 세포의 자가소멸이 관계된 것으로 나타났다. 그러므로 코경유 눈물주머니코안연결술 중 MMC나 5-FU의 사용은 이들 약물이 섬유아세포에 대해 나타내는 항증식 효과로 인해 술후 육아종 형성과 반흔을 억제함으로써 수술 중 보조적으로 사용하는 것이 도움이 될 것이라 생각된다.

참고문헌

- 1) Caldwell GW. Two new operations for the radical cure of obstruction of the nasal duct with preservation of the canaliculi and an incidental description of a new lacrimal probe. *NY Med J* 1893;57:581.
- 2) McDonogh M, Meiring JH. Endoscopic transnasal dacryocystorhinostomy. *J Laryngol Otol* 1989;103:585-7.
- 3) Woog JJ, Kennedy RH, Custer PL, et al. Endonasal dacryocystorhinostomy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2001;108:2369-77.
- 4) Lee HC, Chung WS. Success rate of endonasal dacryocystorhinostomy. *J Korean Ophthalmol Soc* 1996;37:211-8.
- 5) Lee SH, Chung WS. Long term surgical efficacy of endonasal dacryocystorhinostomy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2000;41:307-13.
- 6) Lee TS, Kim JS, Kim JK. The effect of double silicone tube intubation on surgical outcome of endonasal dacryocystorhinostomy. *J Korean Ophthalmol Soc* 2002;43:2089-94.
- 7) Allen K, Berlin AJ. Dacryocystorhinostomy failure: association with nasolacrimal silicone intubation. *Ophthalmic Surg* 1989;20:486-9.
- 8) Zolli CL, Shannon GM. Dacryocystorhinostomy: a review of 119 cases. *Ophthalmic Surg* 1982;13:905-10.
- 9) McLachlan DL, Shannon GM, Flanagan JC. Results of dacryocystorhinostomy: analysis of the reoperation. *Ophthalmic Surg* 1980;11:427-30.
- 10) Tarbet KJ, Custer PL. External dacryocystorhinostomy. Surgical success, patient satisfaction, and economic cost. *Ophthalmology* 1995;102:1065-70.
- 11) Walland MJ, Rose GE. Factors affecting the success rate of open lacrimal surgery. *Br J Ophthalmol* 1994;78:888-91.
- 12) Kao SC, Liao CL, Tseng JH, et al. Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin C. *Ophthalmology* 1997;104:86-91.
- 13) Yalaz SC, Firinciogullari E, Zeren H. Use of mitomycin C and 5-fluorouracil in external dacryocystorhinostomy. *Orbit* 1999;18:239-45.
- 14) Kim JH, Kim KS, Yoon HC, et al. Anti-adhesive effect of GUARDIX-SL[®] after endoscopic sinus surgery. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2005;48:1478-83.
- 15) Lee TS, Lee KC. The effect of Mitomycin-C eyedrop on prevention of internal ostium obstruction after endonasal dacryocystorhinostomy. *J Korean Ophthalmol Soc* 1998;39:1915-20.
- 16) Ugurbas SH, Zilelioglu G, Sargon MF, et al. Histopathologic effects of mitomycin-C on endoscopic transnasal dacryocystorhinostomy. *Ophthalmic Surg Lasers* 1997;28:300-4.
- 17) Zilelioglu G, Ugurbas SH, Anadolu Y, et al. Adjunctive use of mitomycin C on endoscopic lacrimal surgery. *Br J Ophthalmol* 1998;82:63-6.
- 18) Roozitalab MH, Amirahmadi M, Namazi MR. Results of the application of intraoperative mitomycin C in dacryocystorhinostomy. *Eur J Ophthalmol* 2004;14:461-3.
- 19) Iliff CE. A simplified dacryocystorhinostomy. 1954-1970. *Arch Ophthalmol* 1971;85:586-91.
- 20) Watts P, Ram AR, Nair R, Williams H. Comparison of external dacryocystorhinostomy and 5-fluorouracil augmented endonasal laser dacryocystorhinostomy. A retrospective review. *Indian J Ophthalmol* 2001;49:169-72.
- 21) Hu D, Sires BS, Tong DC, et al. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 2000;16:119-25.
- 22) Givens KT, Kitada S, Chen AK, et al. Proliferation of human ocular fibroblasts. An assessment of in vitro colorimetric assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1856-62.
- 23) Senderoff RI, Weber PA, Smith DR, Sokoloski TD. Evaluation of antiproliferative agents using a cell-culture model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2572-8.
- 24) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 25) Mpoke SS, Wolfe J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: Application to macronuclear elimination in Tetrahymena. *J Histochem Cytochem* 1997;45:675-83.
- 26) Gilman AG, Goodman LS, Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th ed. New York: Macmillan Publishing Co., 1980;1295-300.
- 27) Dushinski R, Plevan E, Heidelberger C. The synthesis of 5 fluoro pyrimidines. *J Am Chem Soc* 1957;79:4559-60.
- 28) Blumenkranz MS, Ophir A, Clafflin AJ, Hajek A. Fluorouracil for the treatment of massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 1982;94:458-67.
- 29) Abraham LM, Selva D, Casson R, Leibovitch I. The clinical appli-

- cations of fluorouracil in ophthalmic practice. *Drugs* 2007;67:237-55.
- 30) Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR. Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 1990;97:1204-10.
- 31) Singh K, Mehta K, Shaikh NM, et al. Trabeculectomy with intra-operative mitomycin C versus 5-fluorouracil. Prospective randomized clinical trial. *Ophthalmology* 2000;107:2305-9.
- 32) Suh WJ, Chung WS. Effects of mitomycin C on cultured rabbit osteoblasts. *J Korean Ophthalmol Soc* 2001;42:1464-9.
- 33) Lee JH, Chung WS, Son JH. The effect of mitomycin C on cultured human osteoblasts. *J Korean Ophthalmol Soc* 2003;44:2122-7.
- 34) Huang L, Wong YP, Cai YJ. Low dose 5-fluorouracil induces cell cycle G2 arrest and apoptosis in keloid fibroblasts. *Br J Dermatol* 2010;163:1181-5.

=ABSTRACT=

Effect of Mitomycin C and 5-Fluorouracil on Cultured Human Nasal Mucosa Fibroblasts

Keun Hae Kim, MD¹, In Taek Kim, MD²

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine¹, Daegu, Korea

Department of Ophthalmology, Kyungpook National University School of Medicine², Daegu, Korea

Purpose: To investigate the effects of two antimetabolites, mitomycin C (MMC) and 5-fluorouracil (5-FU), on proliferation of cultured human nasal mucosa fibroblasts.

Methods: Human nasal mucosa fibroblasts were primarily cultured, and exposed to various concentrations of MMC and 5-FU for 5 minutes. Control fibroblasts were exposed to only DMEM media without the drugs. Effect of drugs on cell morphology was observed by phase-contrast microscopy. Cell viability and apoptosis were measured using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay and Acridine orange/Hoechst (AO/HO) staining, respectively.

Results: In both experimental groups exposed to MMC and 5-FU, fibroblasts maintained standard spindle shape. The MTT assay showed that both MMC and 5-FU inhibited fibroblast proliferation in a dose dependent manner. AO/HO staining showed apoptotic cells in both experimental groups.

Conclusions: Both MMC and 5-FU have an antiproliferative effect on fibroblasts *in vitro* at least through induction of apoptosis. Therefore, adjuvant use of either MMC or 5-FU during endonasal dacryocystorhinostomy may improve the clinical outcome by inhibiting proliferation of the nasal mucosa.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(2):233-240

Key Words: 5-fluorouracil, Mitomycin C, Nasal mucosa fibroblast

Address reprint requests to **Keun Hae Kim, MD**

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

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

Tel: 82-53-650-4148, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: kimkh@cu.ac.kr