

## 섬유아세포의 생존에 대한 베바시주맙과 마이토마이신 C의 효과 비교

김신후 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

**목적:** 섬유아세포의 생존에 대한 베바시주맙의 효과를 마이토마이신 C와 비교해보고, 일산화질소의 생성과의 관련성을 알아보고자 하였다.

**대상과 방법:** 일차배양한 섬유아세포에 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 베바시주맙과 마이토마이신 C에 각각 노출시킨 후 5일간 정치배양한 다음 MTT assay와 Griess assay를 이용하여 세포의 생존과 일산화질소의 생성을 각각 측정하였다.

**결과:** 베바시주맙은 200 µg/mL의 고농도에서만 섬유아세포의 생존을 유의하게 저하시켰으며, 마이토마이신 C에 비해 세포증식억제효과가 적게 나타났다. 또한 베바시주맙은 일산화질소의 생성에도 유의한 영향을 미치지 않았다.

**결론:** 섬유아세포에 대한 베바시주맙의 항증식효과는 마이토마이신 C에 비해 유의하게 낮았다.

(대한안과학회지 2011;52(3):345-349)

혈관생성을 촉진하는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 억제하기 위하여 재조합 인간화 단클론 항체인 베바시주맙을 유리체강 내에 주입하여 신생혈관의 생성억제 또는 소멸에 이용하고 있는데 베바시주맙은 원래 암 치료를 위해 미 식품의약청의 사용 허가를 받았으나<sup>1</sup> 안과영역에서 노인성황반변성, 당뇨망막증 등의 안구 혈관질환의 치료에 흔히 사용되어 효과적으로 이용되고 있다.<sup>2-4</sup> 녹내장의 경우 신생혈관녹내장에서 수술 전에 앞방 내의 신생혈관을 퇴행시켜 수술을 안전하게 시술하기 위해 사용하기도 하는데<sup>5</sup> 대개 유리체강 내에 베바시주맙을 주입하여 사용하지만 술자에 따라 앞방 내에 바로 주입하여 사용하는 경우도 있다.

섬유주절제술의 실패는 여과포의 반흔형성이 주된 원인인데 이를 억제하기 위하여 많은 보조약제가 연구되어 왔으며<sup>6,7</sup> 현재까지 임상적으로 가장 많이 사용되는 항증식제제는 마이토마이신 C (MMC)이다.

VEGF가 녹내장 환자의 방수 내에 고농도로 존재하며 토끼를 이용한 동물실험에서 베바시주맙이 섬유아세포의 증식을 억제하여 수술의 성공률을 높인다는 보고가 최근 발

표 되었다.<sup>8</sup> 그러나 실제 인체의 테논낭 섬유아세포에 대해 베바시주맙이 MMC와 비교하여 어느 정도의 항증식효과가 있는지는 아직 자세히 알려져 있지 않다. 또한 베바시주맙의 작용 기전으로 일산화질소(Nitric oxide, NO)를 억제하는 것이 알려져 있으나<sup>9,10</sup> 섬유아세포에서는 NO의 생성에 미치는 영향이 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 일차배양한 인체의 섬유아세포에 섬유아세포에 베바시주맙과 MMC를 각각 노출시켜 두 약제의 항증식효과를 비교하고자 하였고 베바시주맙이 NO의 생성에 미치는 영향도 함께 알아보려고 하였다.

### 대상과 방법

#### 세포배양

환자의 허락하에 다른 안질환이나 안수술력이 없었던 53세 남자 환자의 백내장 수술 도중 테논낭 일부를 절제하여 일차배양하였다. 먼저 테논낭 조직을 염류용액(phosphate buffered saline, Gibco, Rockville, MD, USA)으로 세척한 후 10%의 혈청이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco, USA)을 배지로 하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 일차배양하였다. 세포가 조직 주위로 자라나오는 것을 확인한 후 조직을 제거하고 배양을 계속하여 세포가 배양접시에 충만해지면 0.05% trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 계대배양하였다.

■ 접수 일: 2010년 8월 17일 ■ 심사통과일: 2010년 10월 4일  
■ 게재허가일: 2011년 1월 17일

■ 책임저자: 김 재 우

대구시 남구 대명4동 3056-6

대구가톨릭대학교병원 안과

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133

E-mail: jwkim@cu.ac.kr

## 약물처리

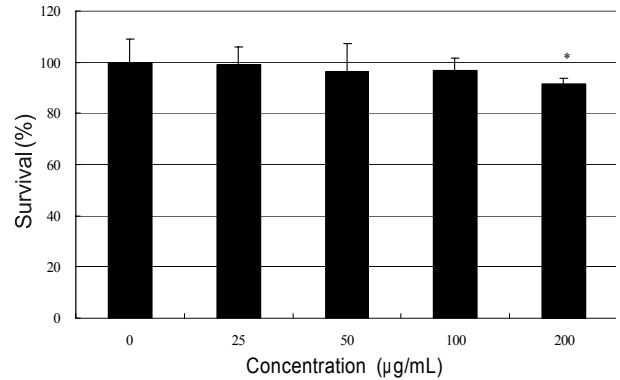
일차배양한 사람의 섬유아세포를 24 well 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청이 항증식효과에 미치는 영향을 배제하기 위하여<sup>11</sup> 1% 혈청이 포함된 DMEM배지로 교환한 다음 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml의 베바시주맙(Avastin, Genetech, South San Francisco, CA, USA)에 5일간 노출시켰다. MMC (Kyowa, Tokyo, Japan)는 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 5분간 노출시킨 후 염류용액으로 씻어낸 다음 5일간 정치배양하였다.

## MTT assay와 Griess assay

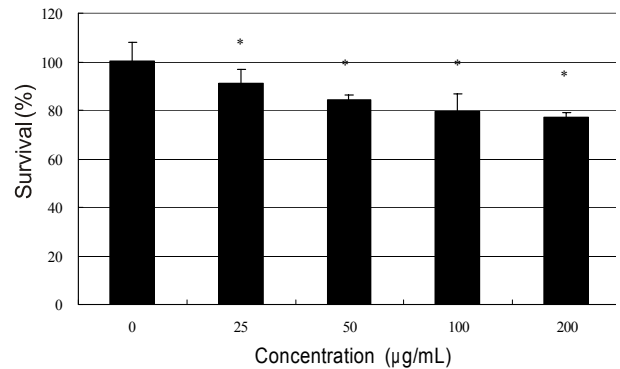
세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 선별검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St Louis, MD, USA) assay를<sup>12</sup> 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를<sup>13</sup> 이용하였다. MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 µl씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 µl씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Offenberg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma)를 섞은 후 96-well 배양접시에 옮겨 NO생성의 반응물인 아질산염의 양을 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

## 통계적 처리

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



**Figure 1.** Effect of bevacizumab on the survival of human Tenon's capsule fibroblasts. bevacizumab inhibited survival of fibroblasts at high concentration (\**p* < 0.05).



**Figure 2.** Effect of mitomycin C on the survival of human Tenon's capsule fibroblasts. Mitomycin C inhibited cellular survival significantly from low concentration (\**p* < 0.05).

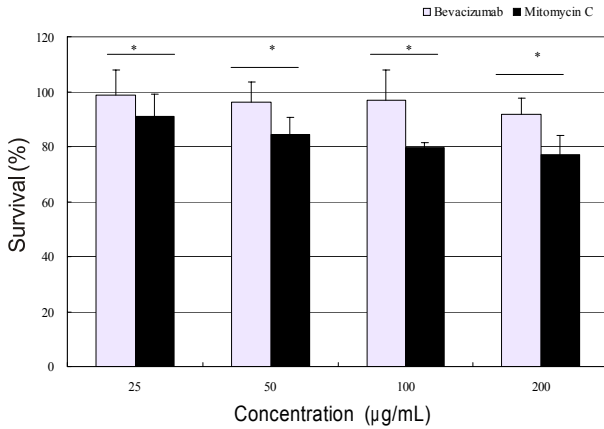
## 결 과

### 베바시주맙과 MMC가 섬유아세포의 생존에 미치는 영향

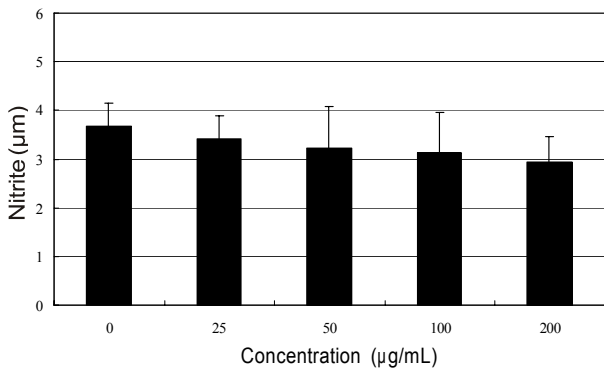
베바시주맙은 100 µg/ml의 농도까지는 섬유아세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았으며 200 µg/ml의 농도에서 약물에 노출되지 않은 대조군에 비하여 유의하게 섬유아세포의 생존을 감소시켰다(Fig. 1). 이와 대조적으로 MMC는 25 µg/ml의 농도에서부터 섬유아세포의 생존을 감소시켰으며 농도에 비례하여 생존이 감소하였다(Fig. 2). 이때 동량의 농도에서 베바시주맙과 MMC의 효과를 각각 비교해보면 MMC는 25 µg/ml의 농도에서부터 베바시주맙에 비해 유의하게 세포의 생존을 감소시켰다(Fig. 3).

### 베바시주맙이 섬유아세포의 NO의 생성에 미치는 영향

베바시주맙이 섬유아세포에서 NO의 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도에 따른 NO의 생성량을 배지



**Figure 3.** Comparison of the anti-proliferative effects between bevacizumab and mitomycin C on the survival of human Tenon's capsule fibroblasts at the same concentrations. Mitomycin C showed more anti-proliferative effect than bevacizumab each concentration (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Effect of bevacizumab on the production of nitric oxide in Tenon's capsule fibroblasts. Bevacizumab did not significantly affect on the production of nitrite ( $p < 0.05$ ).

에서 측정하였다. 베바시주맵은 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도로 갈수록 NO의 생성을 감소시키는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의하게 NO의 생성을 감소시키지는 않았다(Fig. 4).

## 고 찰

본 연구의 결과는 섬유아세포에 대한 베바시주맵의 항증식효과가 MMC에 미치지 못한다는 것을 보여준다.

VEGF는 당뇨망막증과 망막정맥폐쇄에 의한 신생혈관을 촉진하는 작용과 혈관투과성을 촉진하는 작용을 하며 그 작용기전에 NO가 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>14,15</sup> 즉 VEGF의 작용기전을 NO가 매개하는 것으로 알려져 있는데, 베바시주맵을 사용할 경우 NO의 생성을 저하시켜 신생혈관을 억제하고 혈관투과성을 저하시킬 수 있다고 한다.

여러 종류의 세포에서 베바시주맵이 미치는 세포독성에 관한 연구와 유리체 내에 주입했을 경우의 약동학에 대한 연구들이 보고되어 있다.<sup>16-19</sup> 대개의 경우 베바시주맵은 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있으나 최근 베바시주맵이 섬유아세포에 대해 항증식 효과를 나타내어 여과수술의 성공률을 높일 수 있다는 보고가 있었다.<sup>8</sup>

만일 베바시주맵이 섬유아세포에 대해 현재 많이 사용하고 있는 MMC에 상응할만한 항증식효과를 나타낸다면 적은 세포 독성과 신생혈관 억제 및 출혈 억제 효과 등에 의해 섬유주절제술에서 매우 유용한 약제로 고려될 수 있을 것이다. 그러나 본 연구의 결과에서는 베바시주맵이 고농도로 노출된 경우를 제외하고는 세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다. 또한 임상적으로 많이 사용되고 있는 MMC와 비교하여 베바시주맵의 항증식 효과는 미미한 것으로 나타났다. 더구나 베바시주맵을 고농도로 사용하였을 때 약간의 항증식 효과를 보였으나 안구 내 다른 세포에서는 세포독성을 나타낼 수 있으므로<sup>20</sup> 섬유아세포에 대한 항증식 효과를 목적으로 고농도의 베바시주맵을 사용하는 것은 위험할 가능성도 있다.

또한 베바시주맵은 고농도로 5일간 지속적으로 노출시켜 항증식 효과를 보인 데 비하여 MMC는 5분간만 노출시켰음에도 불구하고 섬유아세포에 대한 항증식 효과는 저농도에서부터 베바시주맵에 비해 지속적이고 강한 항증식 효과를 나타내었다.

정상적인 창상 치유과정에서 NO의 발현이 증가되어 창상 치유를 촉진하는 데<sup>21</sup> 베바시주맵의 효과가 NO의 생성 저하에 의해 매개되어 나타날 수 있기 때문에 본 연구에서는 다양한 농도로 섬유아세포에 노출시켜 본 결과 NO의 생성에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과 역시 베바시주맵이 섬유아세포에서 세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않는다는 사실을 뒷받침한다.

기존의 연구에서 베바시주맵이 항증식효과를 나타낸다는 보고가 있었지만<sup>22</sup> 기존의 연구에 사용한 세포는 혈관내피세포 또는 망막색소상피를 이용한 결과이기 때문에 실제 창상의 치유에 활동적으로 관여하는 섬유아세포에 대한 항증식효과와는 그 정도가 다르게 나타날 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 세포배양을 이용한 실험실 내의 조건이어서 실제 동물실험이나 인체 실험에서의 결과와 차이가 날 수 있다. 그 이유는 베바시주맵에 의한 신생혈관의 생성 억제가 실제 창상의 치유를 억제할 수도 있기 때문이다. 또한 실제 생체 내에서는 여러 가지 cytokine이 창상 치유에 관여하기 때문에 항증식 효과나 NO의 생성에 대한 효과가 다르게 나타날 수 있다. 그럼에도 불구하고 세포 배양을 이용한 본 연구에 의하면 베바시주맵은 MMC에 비해 섬유아

세포에 대한 직접적인 항증식 효과는 매우 미미한 것으로 나타났으며 NO의 생성에도 영향을 미치지 않아 향후 임상적으로 사용해 볼 때 세포배양에 의한 결과를 참조해보아야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 세포배양하에서 베바시주맙이 섬유아세포의 생존에 미치는 효과는 MMC에 비해 매우 적게 나타났으므로 실제로 녹내장 여과수술에 사용해서 수술의 성공률을 높이는 데 사용하기 위한 임상적 유용성에 대해서 향후 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 1) Midgley R, Kerr D. Bevacizumab--current status and future directions. *Ann Oncol* 2005;16:999-1004.
- 2) Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-72.
- 3) Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-8.
- 4) Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:352-4.
- 5) Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina* 2006;26:354-6.
- 6) Skuta GL, Parrish RK 2nd. Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol* 1987;32:149-70.
- 7) Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003;48:314-46.
- 8) Li Z, Van Bergen T, Van de Veire S, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5217-25.
- 9) Bouloumié 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.
- 10) Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, et al. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996;270:H411-5.
- 11) Crowston JG, Wang XY, Khaw PT, et al. Human serum reduces mitomycin-C cytotoxicity in human tenon's fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:946-52.
- 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) Bouloumié 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.
- 15) Dulak J, Józkowicz 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.
- 16) Spitzer MS, Yoeruek 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.
- 17) Iriyama A, Chen YN, Tamaki Y, Yanagi Y. Effect of anti-VEGF antibody on retinal ganglion cells in rats. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1230-3.
- 18) Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855-9.
- 19) Kernt M, Welge-Lüssen U, Yu A, et al. Bevacizumab is not toxic to human anterior- and posterior-segment cultured cells. *Ophthalmology* 2007;114:965-71.
- 20) Kim SH, Kim JW. Effect of bevacizumab on survival and production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:1404-8.
- 21) Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* 2002;7:1-10.
- 22) Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, et al. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1316-21.

**=ABSTRACT=**

## Comparison of the Effects Between Bevacizumab and Mitomycin C on the Survival of Fibroblasts

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

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

**Purpose:** To compare the antiproliferative effects between bevacizumab, a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), and mitomycin C in human Tenon's capsule fibroblasts.

**Methods:** Primarily cultured human Tenon's capsule fibroblasts were exposed to 0, 25, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/ml}$  bevacizumab and mitomycin C, and incubated for 5 days. Cellular survival and production of nitric oxide were assessed by MTT assay and Griess assay, respectively.

**Results:** Bevacizumab showed antiproliferative effects only at high concentrations (200  $\mu\text{g/ml}$ ) and revealed much less effect on the cellular survival compared to mitomycin C. In addition, bevacizumab did not affect the production of nitric oxide.

**Conclusions:** The antiproliferative effect of bevacizumab is much lower than mitomycin C in human Tenon's capsule fibroblasts.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(3):345-349

**Key Words:** Antiproliferation, Bevacizumab, Fibroblast, Mitomycin C

---

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

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

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

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