

인간 섬유아세포에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 독성과 항섬유화효과

Cytotoxicities and Anti-Fibrotic Effects of Pirfenidone and Mitomycin C on Human Fibroblasts

박경수¹ · 홍사민² · 이주카요코² · 김찬윤² · 성공제²

Kyoung Soo Park, MD¹, Sa Min Hong, MD², Yoko Iizuka, MD, PhD², Chan Yun Kim, MD², Gong Je Seong, MD²

실로암안과병원¹, 연세대학교 의과대학 안과학교실 시기능개발연구소²

Department of Ophthalmology, Siloam Eye Hospital¹, Seoul, Korea

The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine², Seoul, Korea

Purpose: The cytotoxicities and anti-fibrotic effects of mitomycin C and pirfenidone on human dermal fibroblast were evaluated.

Methods: Initially, 24-hour cell cultures were exposed to transforming growth factor (TGF)- β 1, different concentrations of mitomycin C, and pirfenidone solutions in order to evaluate cytotoxicity. Expressions of fibronectin, collagen type 1, α smooth muscle, and β -actin were evaluated by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot in mitomycin C solutions at concentrations of 4 μ g/mL and 20 μ g/mL, and in pirfenidone solutions at 250 μ g/mL and 500 μ g/mL.

Results: In comparison to cell cultures exposed to TGF- β 1 solutions, cytotoxicities were increased in solutions of mitomycin C at 4 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL and pirfenidone at 500 μ g/mL, 750 μ g/mL, 1,000 μ g/mL ($p < 0.05$, Mann Whitney U -test). The results of real-time RT-PCR show that expressions of fibronectin, collagen type 1, and α smooth muscle were significantly more decreased in all concentrations of mitomycin C and pirfenidone compared to those in TGF- β 1 solution. In western blot analysis, expressions of fibronectin and α smooth muscle were decreased in all concentrations of mitomycin C and pirfenidone compared to TGF- β 1 solution.

Conclusions: Both drugs have cytotoxicities and anti-fibrotic effects, but pirfenidone was found to have less cytotoxicity and mitomycin C was found to have more anti-fibrotic effects when compared to each other.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(7):1077-1083

Key Words: Anti-fibrotic effect, Cytotoxicity, Mitomycin C, Pirfenidone

안과영역에서 창상치유와 관련된 과정은 각막, 결막 등 해부학적 구조와 녹내장, 사시 등 질병 영역의 경과 관찰,

치료, 수술 등과 관련하여 매우 중요한 영역이라고 할 수 있다. 특별히 결막, 테논낭 부위의 섬유아세포의 병태생리와 각종 약물과의 반응이 중요하다고 할 수 있다. 특히 녹내장여과수술 시 성공적인 여과포 형성을 위한 창상 치유 과정은 수술 후 안압 조절을 위한 중요한 요소이다. 여과포가 잘 형성되려면 창상치유, 반흔 형성이 과도하게 되지 않도록 조절해야 하는데 마이토마이신 C, 5-fluorouracil (5-FU) 같은 약제가 대표적으로 사용된다. 하지만 약제가 가지는 독성으로 인해 각막 등 손상이 발생할 수 있어 독성을 줄일 수 있는 대체 또는 보조 약물이 필요하다.

피르페니돈은 호흡 곤란, 비가역적인 폐기능 손상을 특

■ Received: 2013. 12. 13. ■ Revised: 2014. 2. 4.

■ Accepted: 2014. 6. 9.

■ Address reprint requests to **Gong Je Seong, MD**
Department of Ophthalmology, Gangnam Severance Hospital,
#211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea
Tel: 82-2-2019-3441, Fax: 82-2-3463-1049
E-mail: gjseong@yuhs.ac

* Part of this study was presented as an e-poster at the 108th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2012.

© 2014 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

징으로 하는 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)의 치료를 위해 개발된 경구 투여약제이다. 기전이 명확하지는 않지만 섬유아세포의 증식, 섬유화 관련 단백질, 사이토카인, 세포외기질 생성을 약화시키는 역할을 한다고 알려졌다. 아직 국내에는 도입되지 않았지만 유럽, 일본에서 특발성 폐섬유증 환자를 대상으로 판매되고 있는 신약으로 세포, 동물 실험과 전임상시험을 통해 안전하면서도 탁월한 항섬유화 효과가 보고되었으며 현재는 특발성 폐섬유증 환자를 대상으로 하는 임상시험 단계에 있다.^{1,2} 이 약제는 transforming growth factor (TGF)- β ,³ connective tissue growth factor (CTGF),⁴ platelet-derived growth factors (PDGF),⁵ tumor necrosis factor (TNF)- α ,⁶ lung basic-fibroblast growth factor (b-FGF)⁷ 등의 염증성 사이토카인과 전교원질 생성에 대한 억제조절 효과를 나타내며,⁸ 활성산소종을 제거하는 항산화 효과도 보인다고 알려졌다.⁹ 피르페니돈은 특발성 폐섬유증을 나타내는 폐뿐만이 아니라, 신장,⁴ 간,¹⁰ 심장¹¹ 등 다양한 조직에서 항섬유화 효과를 보여주고 있다.

피르페니돈과 관련된 안과 연구로는 망막색소상피세포에서 TGF- β 1에 의한 섬유결합소 합성을 억제한다는 보고,¹² 테논하 섬유아세포의 증식, 이동, 교원질 수축을 억제하며,¹³ 갑상선 안병증 환자의 안와 섬유아세포에서 interleukin-1이 유발하는 tissue inhibitors of metalloproteinase-1 증가 효과를 억제한다는 보고 등이 있었다.¹⁴ 토끼를 이용한 실험적인 녹내장 수술 모델에서 0.5% 농도의 피르페니돈 안약이 섬유주절제술 여과포의 성공률을 높이고 안전하게 사용되었다는 보고도 있었다.¹⁵

기존 연구에서는 주로 피르페니돈을 단독으로 사용하여 망막색소상피세포에서 섬유결합소 합성 억제, 테논하 섬유아세포의 증식, 이동, 교원질 수축 억제 작용, 갑상선 안병증 환자의 안와세포에서의 항섬유화 효과 등을 살펴보았다.¹²⁻¹⁴ 단독 적용시에 피르페니돈이 가진 항섬유화 효과는 확인되었지만 기존 약제와 직접 비교연구는 많지 않았다. 기전에 대해서도 각종 사이토카인 억제 효과, 항염증, 항섬유화, 항산화작용이 보고되었지만 명확한 결론이 나타나지 않아 기존 약제와 어떠한 작용을 할 것인가도 예측하기 어려운 상황이다. 마이토마이신 C는 세포 분열단계 S, G1 단계에 작용하여 증식을 억제하는 기전이 알려졌다. 5-FU는 섬유아세포에 더 독성이 있고 내피세포는 보존하는 경향이 있음에 비해 마이토마이신 C는 둘 다 독성이 있어서 더 강한 효과를 나타낸다. 그리하여, 실험적으로 5-FU가 7일 정도 효과를 보인 반면, 마이토마이신 C는 1달까지 섬유아세포를 억제하였다는 보고가 있었고 또한 마이토마이신 C는 여과포 생성에서 더 얇고 무혈관의 여과포를 만드는 경향이 있다.¹⁶ 피르페니돈은 기전이 아주 명확하지는 않으나

섬유아세포 억제, 섬유화 관련 단백질 생성, 사이토카인, 세포외기질 합성 등을 억제하는 역할을 하여 항섬유화 효과를 유도하는데² 마이토마이신 C, 5-FU와 비교하였을 때 세포독성, 효과, 그리고 병용 효과가 어떠한지에 대한 연구는 계속 필요한 상황이다.

대상으로 피부 진피 섬유아세포를 선택하였는데 이는 사람의 진피 섬유아세포는 상용화되어 있어 환자에게 유해한 조작을 가하지 않고 실험이 가능하기 때문이다. 테논하 섬유아세포와 동일하지는 않지만 결막이 피부, 진피에서 일어나는 창상 치유의 특성을 많이 가지고 있는 것을 고려할 때¹⁶ 테논하 섬유아세포 실험의 선행 실험으로 두 약제에 대한 반응을 볼 수 있을 것으로 생각했다.

본 연구의 목적은 배양한 사람의 진피 섬유아세포를 마이토마이신 C와 피르페니돈에 각각 노출시켜 두 약제의 섬유아세포에 대한 세포독성과 항섬유화 효과를 비교하고자 하며, 이를 통해 피르페니돈이 안과영역에서 효율적으로 사용될 수 있는지를 예측해 보려는 것이다.

대상과 방법

세포 배양 및 섬유화 유도

사람의 진피 섬유아세포주(dermal fibroblast, neonatal foreskin)는 상용화된 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)을 이용하였다. 사람의 진피 섬유아세포를 10% 우태아혈청(fatal bovine serum, FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL 페니실린(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 μ g/mL 스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium배지(DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 넣어 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 섬유아세포를 혈청에 의한 영향을 배제하기 위해 FBS를 포함하지 않은 세포배양액으로 옮겨 24시간 동안 배양한 후 각각의 실험을 진행하였다. 섬유화 유도를 위해 recombinant human TGF- β 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 세포배양액에 5 ng/mL 농도가 되도록 첨가하였다.

사람 섬유아세포의 생존에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 효과 비교(세포독성 평가, LDH assay)

준비된 섬유아세포를 배양용액, 5 ng/mL TGF- β 1만 첨가된 배양용액, 5 ng/mL TGF- β 1과 다양한 농도(0.0004, 0.004, 0.4, 4, 20, 40 μ g/mL)의 마이토마이신 C (Korea united pharmacy, Seoul, Korea) 또는 다양한 농도(10, 100, 250, 500, 750, 1000 μ g/mL)의 피르페니돈(Sigma-Aldrich, Milan, Italy)이 각각 첨가된 배양용액에서 24시간 동안 배양하였다. 각 실험군에서 섬유아세포로부터 세포배양액으로 유리되는

lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 colorimetric assay system (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 측정 한 후, 전체세포를 얼려(deep freezing) 사멸시키고 세포배양액에서 측정된 LDH의 양과 비교하여 세포사멸의 정도, 즉 세포독성(cytotoxicity)을 평가하였다. 세포독성은 세포배양액으로 유리되는 LDH의 양을 전체사멸 후 세포배양액으로 유리되는 LDH의 양으로 나누어 백분율로 표현하였다.

TGF-β1에 의해 유발되는 세포외기질의 합성에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 효과 비교(항섬유화 효과 평가)

상기 LDH assay 결과에서 얻어진 값 중 세포독성이 40% 미만인 2개의 농도, 마이토마이신 C (4, 20 μg/mL), 피르페니돈(250, 500 μg/mL)을 선택하여, 24시간 배양하였다.

각각 약물을 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 세포의 세포외기질 합성과 관련된 messenger ribonucleic acid (mRNA) 발현 정도를 비교하였다. SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제작자의 권장 매뉴얼에 따라 추출한 total RNA로부터 complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)를 합성하였다. 이후 real time RT-PCR은 QuantiTect SYBR green PCR kit (Quiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 혼합액을 만들어 시행하였다. 각 mRNA level은 비교항존유전자(reference house-keeping gene)로 β-actin을 사용하여 계산하였다. 정량 분석은 2 delta delta Ct 방법으로 분석하였다(gene sequence, Table 1).

각각 약물을 western blot을 이용하여 세포의 세포외기질 단백질 합성 정도를 비교하였다. 세포 단백질을 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel을 이용하여 분리한 후, polyvinylidene difluoride membrane으로 이동시켜 fibronectin에 대한 1차 항체(anti-human rabbit antibody) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), collagen type 1에 대한 1차 항체(anti-human mouse antibody) (Santa Cruz, CA, USA),

Table 1. Primer sequences for real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Gene name	Sequence
Fibronectin	F 5'- CCG TGG GCA ACT CTG TC-3'
	R 5'- TGC GGC AGT TGT CAC AG-3'
Collagen type 1	F 5'- CAG CAA TCA CCT GCG GTA CAG AA-3'
	R 5'- CAC ATC ACG TCA TCG CAC AAC-3'
α smooth muscle	F 5'- GTG TTA TGT AGC TCT GGA CTT TGA AAA-3'
	R 5'- GGC AGC GGA AAC GTT CAT T-3'
β-actin	F 5'- GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T-3'
	R 5'- GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG-3'

F = forward; R = reverse.

α smooth muscle에 대한 1차 항체(anti-human rabbit antibody) (Santa Cruz, CA, USA), β-actin에 대한 1차 항체(anti-human mouse antibody) (Santa Cruz, CA, USA)와 반응시켰다. 이후 horse radish peroxidase가 접합된 2차 항체(anti-rabbit antibody, anti-mouse antibody)를 처리하고 면역 반응 밴드를 확인하였다.

Western blot의 밴드를 정량 분석하기 위해 Image J 프로그램을 사용하였다(ImageJ software; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

통계적 처리

3회 이상 반복하여 유의한 결과가 나온 실험 결과를 가지고 통계 분석을 시행하였다. 통계방법은 비모수적 검정 방법인 Mann Whitney U-test를 수행하고 p값이 0.05 미만 일 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다. 통계적 분석은 SPSS 17.0 프로그램을 사용하였다(SPSS 17.0 software; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

결 과

사람 섬유아세포의 생존에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 효과 비교(세포독성 평가, LDH assay)

LDH assay를 이용하여 각각 약물에 대한 세포 독성을 구하였다(Fig. 1). 평균 세포독성은 마이토마이신 C의 경우

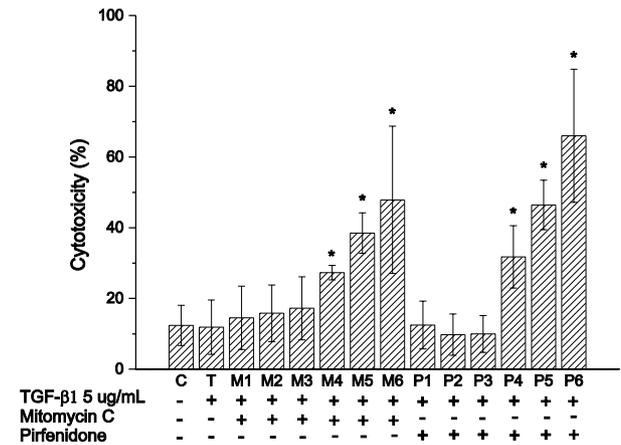


Figure 1. Result of lactate dehydrogenase (LDH) assay. M4, M5, M6, P4, P5, P6 solutions increased cytotoxicity significantly (*p < 0.05, Mann Whitney U-test). Sample C: only Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM); T-P6: add transforming growth factor (TGF)-β1 5 ng/mL; M1-M6: add Mitomycin C, 0.00004 (M1), 0.004 (M2), 0.4 (M3), 4 (M4), 20 (M5), 40 μg/mL (M6; P1-P6: add Pirfenidone, 10 (P1), 100 (P2), 250 (P3), 500 (P4), 750 (P5), 1,000 μg/mL (P6). TGF = transforming growth factor; C = control; T = TGF-β 1; M = mitomycin C; P = pirfenidone.

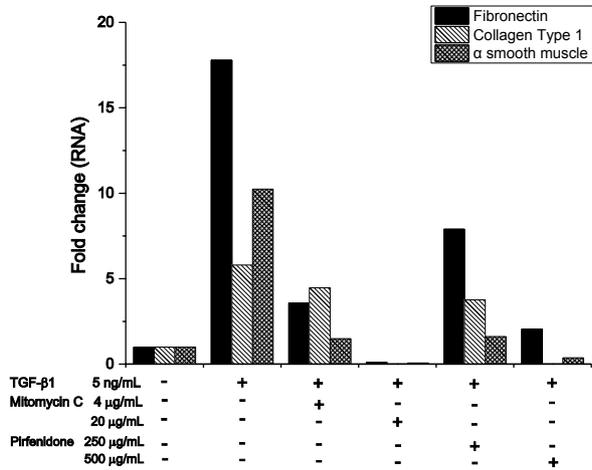


Figure 2. Result of real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Mitomycin C and pirfenidone solution decreased ribonucleic acid (RNA) expression of fibronectin, collagen I, α smooth muscle, which compared to the only transforming growth factor (TGF)-β1 solution.

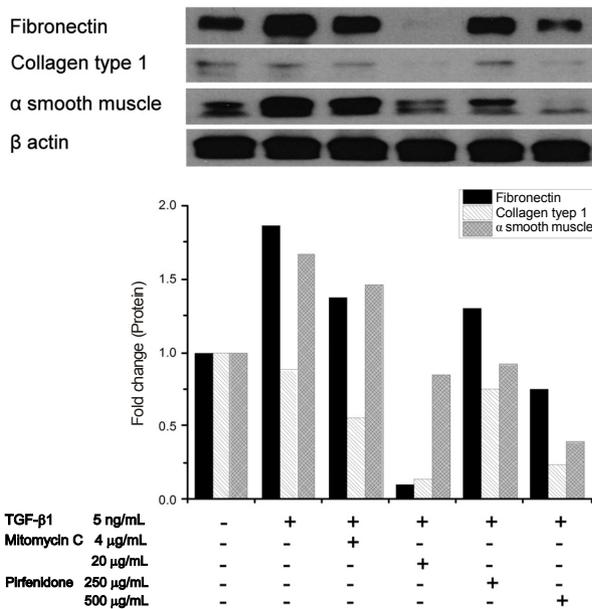


Figure 3. Result of western blot. Mitomycin C and pirfenidone solution decreased protein expression of fibronectin, α smooth muscle, which compared to the only transforming growth factor (TGF)-β1 solution. Protein expression of collagen type I was too weak.

0.00004, 0.004, 0.4, 4, 20, 40 μg/mL 농도 용액에서 각각, 14.53 ± 8.96, 15.82 ± 8.01, 17.22 ± 8.92, 27.30 ± 2.06, 38.51 ± 5.72, 47.88 ± 20.84%이었다. 피르페니돈의 경우 10, 100, 250, 500, 750, 1000 μg/mL 농도 용액에서 각각, 12.50 ± 6.73, 9.76 ± 5.85, 9.96 ± 5.23, 31.75 ± 8.83, 46.45 ± 7.00, 66.02 ± 18.81%이었다. TGF-β1만 처리한 군과 비교 시, 마

이토마이신 C 4, 20, 40, 피르페니돈 500, 750, 1000 μg/mL의 농도에서는 통계적으로 유의한 차이로 세포독성이 증가됨을 보여 주었다($p < 0.05$, Mann Whitney U-test). 다른 농도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$, Mann Whitney U-test).

TGF-β1에 의해 유발되는 세포외기질의 합성에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 효과 비교(항섬유화 효과 평가)

각각 농도에서 real time RT-PCR을 통하여 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle, β-actin의 RNA를 구하여 이들의 발현양상을 살펴보았다. 배양용액만 사용한 군에 비해 TGF-β1만 처리된 군에서 β-actin으로 보정된 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle 발현이 증가함을 알 수 있었다. 마이토마이신 C나 피르페니돈을 처리한 군에서 β-actin으로 보정된 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle 발현이 TGF-β1만 처리된 군에 비해 감소하였다. fibronectin, α smooth muscle의 경우, 마이토마이신 C 20 μg/mL의 농도에서 가장 많이 감소하였고 피르페니돈 250 μg/mL에서 가장 덜 감소하였다. 단, collagen type I의 경우, 마이토마이신 C 4 μg/mL보다 피르페니돈 250 μg/mL농도에서 더 많이 발현이 감소하였다(Fig. 2).

각각 농도에서 western blot을 통하여 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle, β-actin의 발현 정도를 살펴보았다. 배양용액만 사용된 군에 비해 TGF-β1만 처리된 군에서 fibronectin, α smooth muscle에서 발현이 증가함을 알 수 있었다. 마이토마이신 C나 피르페니돈을 처리한 군에서는 각각 약물처리 후 fibronectin, α smooth muscle 발현이 TGF-β1만 처리된 군에 비해 감소하였다. 농도가 더 높음에도 불구하고 피르페니돈보다 마이토마이신 C가 첨가될 경우 fibronectin, α smooth muscle 발현 감소가 더 크게 나타났다. 하지만 collagen type I은 전체적으로 유의하게 발현되지 않았다. fibronectin의 경우 제일 강한 억제제는 마이토마이신 20 μg/mL에서 나타났고 그 다음이 피르페니돈 500 μg/mL, 250μg/mL, 마지막이 마이토마이신 C 4 μg/mL였다. α smooth muscle의 경우, 피르페니돈 500 μg/mL, 마이토마이신 C 20 μg/mL, 피르페니돈 250 μg/mL, 마이토마이신 C 4 μg/mL의 순서로 나타났다(Fig. 3).

고찰

마이토마이신 C는 적은 농도로도 강력한 항섬유화 효과를 나타내므로 현재까지 효과적으로 사용되고 있으나 효과가 강력한 만큼 심각한 부작용의 우려가 있어 부작용을 줄이는 방법, 대체 약물들이 필요하여^{17,18} 이번 연구를 통해

피르페니돈과 마이토마이신 C의 세포독성, 항섬유화 효과를 비교하여 피르페니돈이 대체 약물로서 가능한지를 알아 보았다.

마이토마이신 C와 비교할 경우에는 여러 방법이 있는데 보통 임상에서 사용되는 것처럼 4-5분간 고농도의 마이토마이신 C를 적용했다가 씻어내고 배양하는 방법이 사용된다.¹⁹ 하지만 피르페니돈은 기존 보고에서 수 분간의 적용보다 세포실험 시 24-72시간 배양, 수술 후 동물 모델에서는 안약으로 하루 6번 점안하여 1, 3, 7, 10, 14, 28일간 적용 등의 방법이 사용되었다.^{13,15} 그리하여 이번 연구에서는 마이토마이신을 저농도로 연속 적용시켜 배양하여 피르페니돈 배양과 유사한 상황에서의 세포독성, 항섬유화 효과를 보고자 하였다. 대신 그 농도는 다른 실험에서 사용된 4, 0.4, 0.04, 0.004, 0.0004 mg/mL를 희석하여, 0.00004, 0.004, 0.4, 4, 20, 40 µg/mL로 정하였고 다른 실험에서 연속 배양 시에는 7일 이내에 모든 농도에서 세포들이 다 죽었으므로 24시간만 배양하도록 하였다.²⁰ 이 농도는 임상에서 사용될 때 마이토마이신 C를 0.04, 0.02% 농도로 4-5분 배양하기 때문에 다른 실험에서도 설정한 것으로 생각한다. 피르페니돈은 과거 실험 시 테논나 섬유아세포 실험에서는 MTT assay 결과에서 0.15, 0.3 mg/mL의 농도로 24시간 배양하는 것이 생존에 심각한 영향을 주지 않다고 보고된 적이 있어, 10, 100, 250, 500, 750, 1,000 µg/mL (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL)의 농도로 결정하였다.¹³

LDH assay 결과에서, 마이토마이신 C는 14.53-47.88%에 이르는 세포독성이 관찰되었고, 피르페니돈은 9.76-66.02%에 이르는 세포독성이 관찰되었다. 피르페니돈의 경우 다른 보고에서는 24시간 배양 후 Trypan blue exclusion test에서 87.40-90.03%의 살아있는 세포 확인이 된 것이 비교한다면 생존율이 낮은 편이었다.¹³ 이는 배지, 용액 제조 등 실험 환경이 다르고 다른 보고에서는 테논나 섬유아세포를 사용하였으나 이번 연구는 진피섬유아세포를 사용한 차이라고 할 수 있다. 그럼에도 불구하고 마이토마이신 C보다 수십-수백 배 고농도에서도 세포독성이 높지 않았다. 마이토마이신 C는 기존 보고처럼 피르페니돈보다 적은 양임에도 불구하고 24시간 배양 시에는 세포독성이 높게 나타났다. 특히 마이토마이신 C는 임상에서 사용 시 단기간 사용 후 씻어냄에도 불구하고 결정(crystal) 형태로 결막, 공막에 남아 공막 용해 등 합병증을 유발하는 경우가 있다. 이에 비해 피르페니돈은 극히 높은 농도가 아니면 세포독성이 많이 높지 않으므로 피르페니돈은 마이토마이신 C보다 안전하게 사용이 가능할 것이라는 예측을 할 수 있었다.

항섬유화 효과에 대한 western blot, real time RT-PCR 결과로 보아 두 약물 fibronectin, α smooth muscle에 대한 항

섬유화 효과를 보여주었으나 collagen type I의 경우는 western blot에서는 명확한 효과를 보여주지는 못하였다. 두 약물 모두 항섬유화 효과가 있으나 효율성, 강도는 마이토마이신 C가 피르페니돈보다 훨씬 강함을 보여주었다. 세포독성에서 차이가 적게 나는 농도인 마이토마이신 C 4, 20 µg/mL, 피르페니돈 250, 500 µg/mL의 농도로 실험하였는데 피르페니돈은 마이토마이신 C보다 약 62, 25배 높은 농도였는데 효과는 비슷하게, 때로는 마이토마이신 C가 더 높게 나타나는 경향이 있었다. α smooth muscle의 경우, 기준점으로 삼은 농도들에서는 때로 마이토마이신 C보다 피르페니돈이 더 강한 효과를 보이는 것처럼 보이지만 비슷한 세포독성을 나타내는 독성으로 정한 농도 자체가 마이토마이신 C가 훨씬 희석된 농도이므로 나타나는 결과이다. 동일 농도로 비교해 본다면 항섬유화 효과는 피르페니돈에 비해 마이토마이신 C가 더 뛰어남을 유추할 수 있다.

마이토마이신 C는 항증식 효과와 세포자멸사(apoptosis)를 유도하는 효과를 통해 결막, 창상치유에 영향을 미친다. 마이토마이신 C는 세포 분열단계에 작용하여 증식을 억제하고 p53, nuclear factor (NF)- κ B 등의 활성화와 관련하고, DNA와 교차 결합하여 DNA 손상 유도하는 등의 반응을 통해 세포자멸사를 일으킴이 알려졌다.^{16,21-23} 이런 과정을 통해 다양한 세포, 특히 섬유아세포들에 영향을 주는데, 다른 연구에서는 안구의 여러 부위, 맥락막, 공막, 테논나, 안와 지방 등에서 얻어진 섬유아세포의 collagen I, III, VI, TGF- β 1 관련 실험에서 섬유아세포를 억제하는 효과가 있음을 보여주기도 하였다.²⁴ 반면, 피르페니돈은 항섬유화 효과를 나타내는데 TGF- β , CTGF, PDGF, TNF- α , b-FGF 등의 염증성 사이토카인과 전교원질 생성에 대한 억제조절 효과, 활성산소종을 제거하는 항산화 효과를 통해 기능한다.^{3,8} 다른 신독성관련 실험에서는 피르페니돈 사용 시 사이클로스포린 A (cyclosporine A) 처리된 쥐의 신장에서 발현되는 p53, Fas-ligand의 mRNA 발현을 억제하고 Bcl-xL의 발현은 증가시키는 것으로 보아 세포자멸사를 억제하여 얻어지는 항섬유화 효과가 있을 것으로 예측되었다.²⁵ 이러한 보고들은 마이토마이신과 피르페니돈의 기전이 다를 수 있게 해주는데, 그리하여 이번 실험에서도 마이토마이신은 피르페니돈보다 훨씬 약한 농도임에도 불구하고 세포독성이 높았다는 점에서 이러한 효과를 다시 확인해 볼 수 있었다.

피르페니돈은 독성은 약했지만 항섬유화 효과도 약했다는 한계를 가지고 있다. 특히 collagen I의 경우 쥐의 간세포에서 100, 1000 µM로 억제효과가 나타났다는 과거 보고와 달리 이번 실험에서는 효과가 약하여서 유의한 변화로 판단하기 어려웠다.¹⁰ 두 약물의 collagen I에 미치는 효과에

대해서는 추가 연구가 필요하다.

이번 연구의 제한점으로는 직접 테논낭 섬유아세포를 사용하지 않고 진피섬유아세포를 사용했다는 한계가 있다. 테논하 섬유아세포와 동일하지는 않지만 결막이 피부, 진피에서 일어나는 창상 치유의 특성을 많이 가지고 있는 것을 고려할 때¹⁶ 테논낭하 섬유아세포와 안검, 각막 등 다른 부위 섬유아 세포에 대한 선행 실험으로 두 약물의 반응을 보는 데 이용될 수 있을 것으로 보아 본 연구를 진행하였다. 이후에는 테논낭하 섬유아세포, 안검, 각막 등 특정 부위 섬유아세포를 가지고 동일한 실험을 하여 비교하는 추가 연구가 필요하다.

또 다른 제한점으로는 세포에 대한 약물 적용에 대한 부분이다. 마이트마이신 C는 항섬유화 효과, 세포독성이 모두 강력하여 결막, 각막에서 사용 시 수 분간 사용 후 씻어내는 방식을 사용하므로 이번 실험보다 높은 농도로 임상에서는 이용되고 있다. 하지만 씻어내는 방식의 경우 실험 결과의 변동폭이 클 수 있고 씻어내는 것만으로도 세포에 미치는 독성 등이 커서 두 약물 자체의 효과, 독성만을 비교하기 위해서는 같은 방식으로 씻지 않고 배양하는 방식이 필요하다고 생각되어 이번 연구를 진행하였다. 그러므로 이후에는 실제 임상에서 쓰는 방식대로 마이트마이신 C는 수분 적용 후 씻어내고 피르페니돈은 세포독성이 약하므로 직접 배양하는 방식으로 두 약물을 비교하는 연구도 필요하다.

또한 이번 연구에서는 두 약물을 각각 비교하였으나 추후 두 약물의 병용에 대한 연구가 필요하다. 고찰에서 이야기하였듯이 두 약물은 기전이 달라 마이트마이신 C는 세포자멸사를 유도하고, 피르페니돈은 세포자멸사를 억제하여 얻는 항섬유화 효과가 있으므로 두 약물을 병용한다면 항섬유화 효과가 더 높게 또는 더 낮게 나타날 수 있다. 만약 적절한 방식을 찾아 상승작용을 유도할 수 있다면 각종 의학 영역에서 마이트마이신 C의 부작용을 줄이며 충분한 항섬유화 효과를 얻기 위한 사용법을 개발할 수 있을 것이다.

결론적으로 이번 연구를 통해 마이트마이신 C와 피르페니돈이 진피 섬유아세포에 대해 세포 독성을 가지고 있으나 피르페니돈이 독성이 덜하고, 두 약물 모두 항섬유화 효과를 가지고 있는데 세포자멸사와 관련된 마이트마이신 C의 효과가 더 크음을 알아보았다. 피르페니돈은 마이트마이신C에 비해 독성이 약해 더 안전한 면이 있다. 또한, 항섬유화효과는 약하지만 농도를 높일 경우 항섬유화 효과를 충분히 얻을 수 있다. 강한 농도를 일시적으로 주거나 일정 농도를 점안약 또는 서방형제제 형태로 지속적으로 사용하는 방법으로 활용할 수 있다면 독성 약한, 항섬유화 약물로서 쓰일 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Carter NJ. Pirfenidone: in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 2011;71:1721-32.
- 2) Richeldi L, Yasothan U, Kirkpatrick P. Pirfenidone. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:489-90.
- 3) Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:367-73.
- 4) Hewitson TD, Kelynack KJ, Tait MG, et al. Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis. *J Nephrol* 2001;14:453-60.
- 5) Gurujeyalakshmi G, Hollinger MA, Giri SN. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *Am J Physiol* 1999; 276:L311-8.
- 6) Oku H, Nakazato H, Horikawa T, et al. Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock. *Eur J Pharmacol* 2002;446:167-76.
- 7) Oku H, Shimizu T, Kawabata T, et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2008;590:400-8.
- 8) Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289:211-8.
- 9) Mitani Y, Sato K, Muramoto Y, et al. Superoxide scavenging activity of pirfenidone-iron complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:19-23.
- 10) Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, et al. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol* 2002;37:584-91.
- 11) Yamazaki T, Yamashita N, Izumi Y, et al. The antifibrotic agent pirfenidone inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res* 2012;35:34-40.
- 12) Zhang S, Shiels IA, Ambler JS, Taylor SM. Pirfenidone reduces fibronectin synthesis by cultured human retinal pigment epithelial cells. *Aust NZ J Ophthalmol* 1998;26 Suppl 1:S74-6.
- 13) Lin X, Yu M, Wu K, et al. Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3763-70.
- 14) Kim H, Choi YH, Park SJ, et al. Antifibrotic effect of Pirfenidone on orbital fibroblasts of patients with thyroid-associated ophthalmopathy by decreasing TIMP-1 and collagen levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3061-6.
- 15) Zhong H, Sun G, Lin X, et al. Evaluation of pirfenidone as a new postoperative antiscarring agent in experimental glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3136-42.
- 16) Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003;48:314-46.
- 17) Palanca-Capistrano AM, Hall J, Cantor LB, et al. Long-term outcomes of intraoperative 5-fluoro uracil versus intraoperative mitomycin C in primary trabeculectomy surgery. *Ophthalmology* 2009; 116:185-90.
- 18) Franks WA, Hitchings RA. Complications of 5--fluorouracil after trabeculectomy. *Eye (Lond)* 1991;5:385-9.

- 19) 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.
- 20) Chen T, Kunnavatana SS, Koch RJ. Effects of mitomycin-C on normal dermal fibroblasts. Laryngoscope 2006;116:514-7.
- 21) Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, et al. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:11527-31.
- 22) Yao KS, O'Dwyer PJ. Involvement of NF-kappa B in the induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) by hypoxia, oltipraz and mitomycin C. Biochem Pharmacol 1995;49:275-82.
- 23) Baldassarre F, Mallardo M, Mezza E, et al. Regulation of NF-kappa B through the nuclear processing of p105 (NF-kappa B1) in Epstein-Barr virus-immortalized B cell lines. J Biol Chem 1995;270:31244-8.
- 24) Stahnke T, Löbler M, Kastner C, et al. Different fibroblast subpopulations of the eye: a therapeutic target to prevent postoperative fibrosis in glaucoma therapy. Exp Eye Res 2012;100:88-97.
- 25) Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Effect of pirfenidone on apoptosis-regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation 2005;79:419-26.

= 국문초록 =

인간 섬유아세포에 대한 마이토마이신 C와 피르페니돈의 독성과 항섬유화효과

목적: 인간 진피 섬유아세포를 마이토마이신 C, 피르페니돈에 노출시켜 세포독성과 항섬유화 효과를 비교하기 위해 실험하였다.

대상과 방법: 섬유화 유도를 위해 transforming growth factor (TGF)- β 1을 처리하였고 여러 농도의 마이토마이신 C, 피르페니돈을 첨가하여 24시간 배양하여 세포독성을 보았다. 마이토마이신 C 4, 20 μ g/mL, 피르페니돈 250, 500 μ g/mL에서 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 western blot으로 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle, β -actin의 발현을 살펴보았다.

결과: TGF- β 1만 처리한 군과 비교 시, 마이토마이신 C 4, 20, 40 μ g/mL, 피르페니돈 500, 750, 1,000 μ g/mL의 농도에서는 통계적으로 유의하게 세포독성이 증가되었다($p < 0.05$, Mann Whitney U-test). Real time RT-PCR에서 fibronectin, collagen type I, α smooth muscle 발현이 TGF- β 1만 처리한 군보다 감소하였다. Western blot 실험에서 fibronectin, α smooth muscle 발현이 TGF- β 1만 처리한 군보다 감소하였으나 collagen type I은 유의한 변화를 보이지 않았다.

결론: 진피 섬유아세포에 대해 약물 모두 세포 독성과 항섬유화 효과가 나타났는데 피르페니돈은 독성이 적었고, 마이토마이신 C는 항섬유화 효과가 크게 나타났다.

〈대한안과학회지 2014;55(7):1077-1083〉
