

벤잘코니움, 미토마이신 C, 덤사메타존이 섬유주세포의 스트레스에 미치는 영향

Effect of Benzalkonium, Mitomycin-C and Dexamethasone on Stress in Trabecular Meshwork Cells

김병문 · 김재우

Byung Moon Kim, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: To investigate the effects of benzalkonium chloride (BAC), mitomycin C (MMC) and dexamethasone (DEX) on cellular stress in cultured human trabecular meshwork cell (HTMC) monolayers.

Methods: HTMCs were cultured in the inner Transwell chamber until confluence and then were exposed to BAC, MMC or DEX for 6 hours. The carboxyfluorescein permeability through the HTMC monolayer was measured using a spectrofluorometer at 532 nm after 2 hours in the outer chamber. The 3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to evaluate cellular viabilities.

Results: The carboxyfluorescein permeability through the HTMC monolayer increased and cell survival decreased with 0.002% BAC ($p < 0.05$). Increased permeability without decreasing cell survival occurred with 0.05 $\mu\text{g/mL}$ MMC. No effect on the permeability or cell survival was observed at 0.1 or 1.0 μM DEX ($p > 0.05$).

Conclusions: BAC and MMC induced cellular toxicity and stress at lower concentrations but did not affect survival of cultured HTMCs.

J Korean Ophthalmol Soc 2015;56(1):104-108

Key Words: Benzalkonium chloride, Carboxyfluorescein, Dexamethasone, Mitomycin C, Trabecular meshwork cells

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성 또는 손상으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있는 기전이 된다.^{1,2} 녹내장에서 사용하는 안압하강제는 농도에 따라 섬유주세포의 성장과 활동성에 많은 영향을 미친다.

또한 약제에 포함된 방부제와 첨가물들도 섬유주세포에 영향을 줄 수 있으며 섬유주절제술에 사용되는 항대사제들도 섬유주에 노출 시 영향을 줄 수 있다.^{3,4}

이러한 약제가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위한 방법으로 살아있는 토끼를 이용한 방법(the Draize test)이나 세포주를 이용하는 방법들이 있으나 민감도가 떨어지며,⁵⁻⁷ 세포배양을 하여 세포의 생존이나 독성을 측정하는 방법도 이용되고 있다.^{8,9} 최근 플루오레신 제제를 변형한 carboxy-fluorescein을 이용하여 단일세포층의 투과성을 측정하는 방법이 세포에 대한 독성이나 스트레스를 측정하는 방법보다 좀 더 민감한 방법으로 보고되었다.¹⁰⁻¹⁷

본 연구에서는 이러한 단층세포층의 투과도를 측정하는

■ Received: 2014. 3. 14. ■ Revised: 2014. 5. 19.

■ Accepted: 2014. 12. 19.

■ Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University
Medical Center, #33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu
705-718, Korea
Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

방법을 이용하여 안과 영역에서 흔히 사용되는 보존제인 벤잘코니움(Benzalkonium chloride, BAC)과 섬유주절제술의 보조제로 사용되는 미토마이신 C (Mitomycin C, MMC), 그리고 덱사메타손(Dexamethasone, DEX)이 섬유주세포의 스트레스에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

1. 세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적절한 안구의 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Thermochemical, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라난 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, CA, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

2. 약물처리

일차배양한 인체의 섬유주세포를 트립신 처리한 후 12-well의 Transwell (Corning, No.3460, MA, USA)의 inner chamber (insert diameter 12 mm, pore size 0.4 mm)에 2×10^4 cells/mL의 농도로 각 well에 세포를 분주하여 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 배양하여 역위상차현미경으로 섬유주세포가 단층으로 충만하게 자란 것을 확인하였다. 혈청에 포함된 단백질 등의 영향을 배제하기 위하여 1% 우태아혈청을 포함한 배지로 교환한 다음 0.0002%, 0.002%, 0.02% BAC (Sigma-Aldrich, MO, USA)과 0.005, 0.05, 0.5 µg/mL MMC (Kyowa, Japan), 그리고 0.1, 1.0 µM DEX (Sigma-Aldrich, MO, USA)에 6시간 동안 각각 노출시켰다. 또한 DEX를 녹일 때 사용한 vehicle의 영향을 알아보기 위하여 0.06% ethanol에도 함께 노출시켰으며, 대조군으로는 PBS (phosphate buffered saline, Gibco, Invitrogen, CA, USA)를 이용하였다.

3. MTT assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포증식과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 colorimetric test의 일종인 3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, MO, USA) assay를 이용하였다.^{8,9} 6시간 동안 각 농도의 약제에 노출시킨 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 µL씩 투여한 후 4시간 동안 정지

배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, MO, USA)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 µL씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

4. Carboxyfluorescein permeability assay

약물처리 6시간 후 세포가 자라고 있는 상층 inner chamber를 PBS로 3회 세척한 다음 50 µM carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 노출시켰다. 노출 2시간 후 Transwell을 통하여 하층 outer chamber로 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 532 nm에서 spectrofluorometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 측정하여 백분율로 나타내었다. 대조군은 PBS에 노출 시의 투과도를 이용하였다.

5. 통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 3회 이상 시행하였다. 실험군과 대조군의 비교는 측정된 형광치를 평균 ± 표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 비교하였으며 유의수준의 *p* 값을 0.05로 정하였다. 이때 대조군은 PBS에서의 carboxyfluorescein 투과도를 100%로 하여 백분율로 나타내었다.

결 과

1. 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

PBS에 비하여 BAC는 0.0002%에서는 섬유주세포의 생존

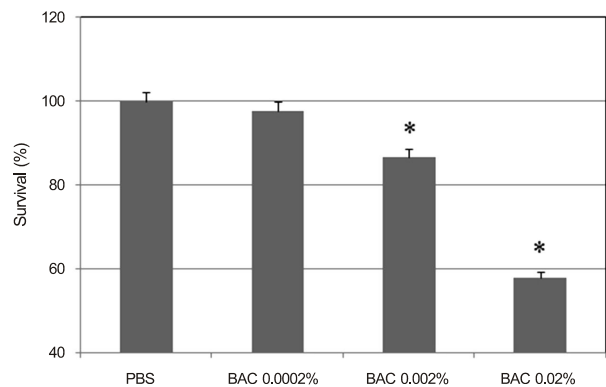


Figure 1. Effects of benzalkonium chloride (BAC) on the survival of trabecular meshwork cells. BAC concentrations more than 0.002% decreased cellular viability significantly (**p* < 0.05). PBS = phosphate buffered saline.

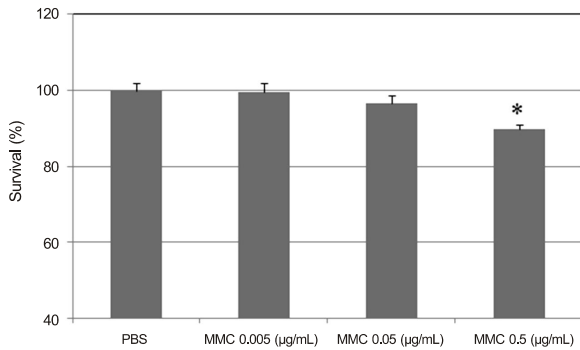


Figure 2. Effects of mitomycin C (MMC) on the survival of trabecular meshwork cells. 0.5 μg/mL MMC decreased cellular viability significantly ($p < 0.05$). PBS = phosphate buffered saline.

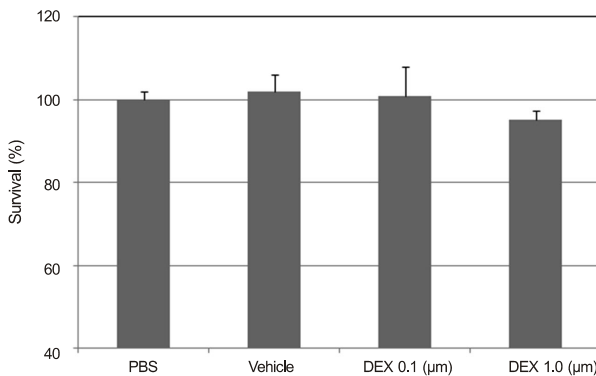


Figure 3. Effects of dexamethasone (DEX) or 0.06% ethanol (vehicle) on the survival of trabecular meshwork cells. Both 0.1 or 1.0 μm DEX showed no significant effects on the cellular viability ($p > 0.05$). PBS = phosphate buffered saline.

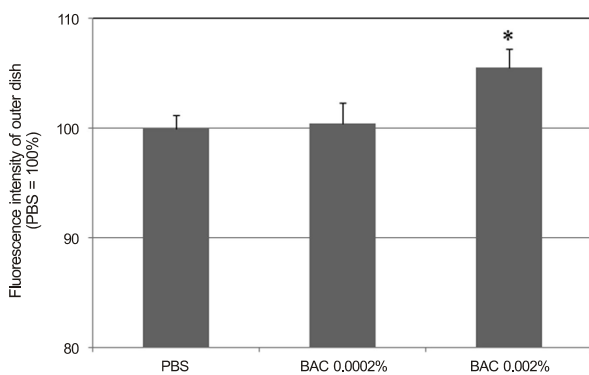


Figure 4. Effects of benzalkonium chloride (BAC) on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer. 0.002% BAC increased permeability of carboxyfluorescein significantly ($p < 0.05$). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using PBS (permeability 100%). PBS = phosphate buffered saline.

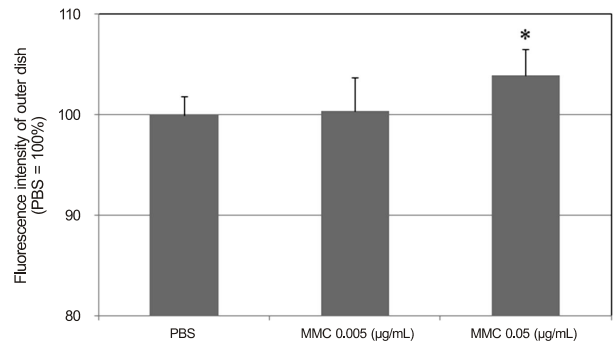


Figure 5. Effects of mitomycin C (MMC) on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer. 0.05 μg/mL MMC increased permeability of carboxyfluorescein significantly ($p < 0.05$). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using PBS (permeability 100%). PBS = phosphate buffered saline.

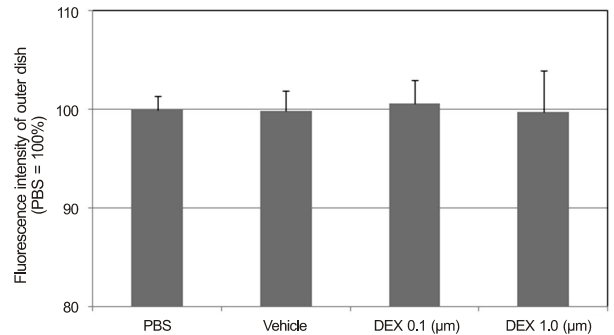


Figure 6. Effects of dexamethasone (DEX) on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer. Both 0.1 or 1.0 μm DEX showed no significant effects on the permeability of carboxyfluorescein ($p > 0.05$). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using PBS (permeability 100%). PBS = phosphate buffered saline.

에 영향을 미치지 않았으나($p=0.235$), 0.002% 이상의 농도에서는 세포의 생존을 유의하게 감소시켰으며($p=0.01$) (Fig. 1), MMC는 0.005 μg/mL와 0.05 μg/mL의 농도에서는 섬유주세포의 생존에 영향을 미치지 않았으나($p=0.847, 0.149$), 0.5 μg/mL의 농도에서는 세포의 생존을 유의하게 감소시켰다($p<0.05$) (Fig. 2). 0.06% ethanol vehicle과 0.1 μm DEX는 세포의 생존에 영향을 미치지 않았으며($p=0.513, 0.893$), 1.0 μm DEX는 세포의 생존율을 대조군인 PBS 100%에 비해 95.28%로 약간 저하시키는 하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.052$) (Fig. 3).

2. 섬유주세포의 스트레스에 미치는 영향

0.0002% BAC는 PBS에 비하여 carboxyfluorescein의 섬유

유주단층세포층의 투과도를 유의하게 증가시키지 않았으나($p=0.656$), 0.002% BAC는 carboxyfluorescein의 투과도를 유의하게 증가시켰으며($p=0.001$) (Fig. 4), 세포의 생존에 영향을 미치지 않았던 0.05 $\mu\text{g/mL}$ MMC는 carboxyfluorescein의 섬유주단층세포층 투과도를 유의하게 증가시켰다($p=0.017$) (Fig. 5). 0.06% ethanol vehicle과 0.1, 1.0 μm DEX는 각각 섬유주 단층세포층의 투과도에 영향을 미치지 않았다($p=0.25, 0.53$) (Fig. 6).

고 찰

세포에 대한 약제의 독성을 측정하는 방법으로 세포층을 투과하는 플루오레신의 농도를 측정하는 방법이 있으나 carboxyfluorescein을 이용한 방법이 보다 좋은 방법으로 제시되었다.¹⁰⁻¹⁷ Carboxyfluorescein은 플루오레신과 분자의 크기와 형광도는 유사하지만 플루오레신에 비해 약 1,000 배 정도 더 친수성이 있어서 세포층의 투과도를 측정하는 보다 민감한 방법인데 세포에 스트레스가 유발되면 세포층의 방어벽의 기능이 떨어져 세포층을 통한 carboxyfluorescein의 투과도가 증가하기 때문이다. 약제에 대한 세포의 스트레스를 측정하기 위해서는 6시간 동안 노출하는 것이 가장 적절한 노출시간으로 제시되었으며 이보다 오래 노출되면 세포손상을 유발할 수 있다고 한다.¹⁸ 이 방법의 또 다른 활용은 세포 스트레스를 유발하지 않는 저농도로 장기간 노출시킨 다음 투과도를 측정하면 혈액-안구장벽의 기능을 측정할 수도 있는데,^{15,17} 이를 이용하면 안압하강제가 섬유주의 투과도에 미치는 영향 즉 섬유주를 통한 방수 유출의 정도도 간접적으로 측정할 수 있는 방법의 하나가 될 수 있을 것으로 생각되지만^{18,19} 이에 대해서는 향후 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 이를 이용하여 섬유주세포를 단층으로 배양한 다음 BAC, MMC, DEX에 6시간 동안 노출시켜 세포 스트레스를 측정하였다. BAC의 경우 0.002%에서 섬유주세포의 생존을 감소시키고 투과도를 증가시켰다. 각막상피세포에서 carboxyfluorescein의 투과도를 이용하여 세포의 스트레스를 측정한 보고에서는 0.002% 이하의 농도에서는 BAC가 세포의 생존이나 투과도에 유의한 영향을 미치지 않는다고 하였으나²⁰ 본 연구의 결과에서 섬유주세포의 경우 0.002%의 농도에서 영향을 받는 것으로 보아 섬유주세포는 각막상피세포보다 저농도의 BAC에 노출된 경우에도 더 쉽게 스트레스를 받는다는 것을 짐작할 수 있다.

MMC는 세포의 생존에 영향을 미치지 않은 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 섬유주 단층세포층의 투과도가 증가되는 것으로 보아 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 섬유주세포의 스트레스

를 유발하는 것을 알 수 있었다. 따라서 세포의 생존을 측정하는 방법보다 carboxyfluorescein의 투과도를 측정하는 방법이 섬유주 세포에 대한 독성이나 스트레스를 측정하는 보다 민감한 방법임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 섬유주 절제술 시 소량의 MMC라도 전방으로 유입되지 않도록 주의해야 할 것임을 시사한다.

DEX는 섬유주세포의 생존이나 섬유주 단층세포층의 투과도에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 섬유주세포에는 스트레스를 유발하지 않는 것을 알 수 있다. 그러나 스테로이드 제제를 장기간 사용할 경우 안압이 상승될 수 있기 때문에 이에 대해서는 향후 DEX를 장기간 노출시킨 후 투과도를 측정하여 섬유주를 통한 방수 유출에 미치는 영향을 측정하는 연구가 추가적으로 필요할 것이다.²¹ 소에서 획득한 섬유주세포를 이용한 연구에서 MMC는 세포고사를 유발하였으나, DEX는 세포의 생존에는 영향을 미치지 않았고 형태학적 변화만을 유발하였다.²² 따라서 DEX의 경우 섬유주세포의 스트레스를 유발하지는 않더라도 장기간 노출될 경우 형태학적 변화가 유발될 가능성이 있다.

결론적으로 세포의 스트레스를 좀 더 민감하게 측정하는 것으로 알려진 carboxyfluorescein의 투과도를 이용한 방법으로 BAC, MMC 그리고 DEX의 섬유주세포에 대한 스트레스를 측정한 결과 BAC, MMC은 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 저농도로 섬유주세포에 노출된 경우에도 섬유주세포에 독성을 나타내어 섬유주세포의 스트레스를 유발할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 2) Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Flügel C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 3) Hamard P, Blondin C, Debbasch C, et al. In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:1037-43.
- 4) Yee RW. The effect of drop vehicle on the efficacy and side effects of topical glaucoma therapy: a review. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:134-9.
- 5) Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol* 2001;45:493-515.
- 6) Doucet O, Lanvin M, Thillou C, et al. Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicol In Vitro* 2006;20:499-512.
- 7) Khoh-Reiter S, Jessen BA. Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal

- epithelium using an organotypic 3-D model. BMC Ophthalmol 2009;9:5.
- 8) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
 - 9) Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. Appl Environ Microbiol 1999;65:3727-9.
 - 10) Grimes PA, Stone RA, Laties AM, Li W. Carboxyfluorescein. A probe of the blood-ocular barriers with lower membrane permeability than fluorescein. Arch Ophthalmol 1982;100:635-9.
 - 11) Araie M. Carboxyfluorescein. A dye for evaluating the corneal endothelial barrier function in vivo. Exp Eye Res 1986;42:141-50.
 - 12) Araie M. Barrier function of corneal endothelium and the intra-ocular irrigating solutions. Arch Ophthalmol 1986;104:435-8.
 - 13) Tsuboi S, Pederson JE. Permeability of the isolated dog retinal pigment epithelium to carboxyfluorescein. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986;27:1767-70.
 - 14) Blair NP, Rusin MM. Blood-retinal barrier permeability to carboxyfluorescein and fluorescein in monkeys. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1986;224:419-22.
 - 15) Grimes PA. Carboxyfluorescein transfer across the blood-retinal barrier evaluated by quantitative fluorescence microscopy: comparison with fluorescein. Exp Eye Res 1988;46:769-83.
 - 16) Grimes PA. Carboxyfluorescein distribution in ocular tissues of normal and diabetic rats. Curr Eye Res 1988;7:981-8.
 - 17) Kimura M, Araie M, Koyano S. Movement of carboxyfluorescein across retinal pigment epithelium-choroid. Exp Eye Res 1996;63:51-6.
 - 18) Lei Y, Stamer WD, Wu J, Sun X. Oxidative stress impact on barrier function of porcine angular aqueous plexus cell monolayers. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:4827-35.
 - 19) Burke AG, Zhou W, O'Brien ET, et al. Effect of hydrostatic pressure gradients and Na2EDTA on permeability of human Schlemm's canal cell monolayers. Curr Eye Res 2004;28:391-8.
 - 20) Nakagawa S, Usui T, Yokoo S, et al. Toxicity evaluation of anti-glaucoma drugs using stratified human cultivated corneal epithelial sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:5154-60.
 - 21) Razeghinejad MR, Katz LJ. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. Ophthalmic Res 2012;47:66-80.
 - 22) Sibayan SA, Latina MA, Sherwood ME, et al. Apoptosis and morphologic changes in drug-treated trabecular meshwork cells in vitro. Exp Eye Res 1998;66:521-9.

= 국문초록 =

벤잘코니움, 미토마이신 C, 덱사메타존이 섬유주세포의 스트레스에 미치는 영향

목적: 벤잘코니움, 미토마이신 C, 덱사메타존이 섬유주세포의 스트레스에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: Transwell의 상층 내부 chamber에 인체의 섬유주세포를 단층으로 층만하게 배양한 후 벤잘코니움과 미토마이신 C, 그리고 덱사메타존에 6시간 동안 각각 노출시킨 다음 상층 내부 chamber에 50 μ m carboxyfluorescein을 2시간 동안 노출시킨 후 하층 외부 chamber에 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 532 nm에서 측정하였다. 이때 세포의 생존은 MTT assay로 측정하였다.

결과: 벤잘코니움, 미토마이신 C는 저농도에서는 세포의 생존에 영향을 미치지 않았으나 각각 농도에 비례하여 섬유주 단층세포층의 투과성을 증가시켰으니 고농도에서는 세포의 생존을 감소시켰다. 0.1, 1.0 μ m 덱사메타존은 세포의 생존이나 투과도에 영향을 미치지 않았다.

결론: 벤잘코니움, 미토마이신 C는 섬유주세포의 생존에 영향을 미치지 않는 저농도에 노출된 경우에도 세포 독성을 나타내어 섬유주 세포에서 스트레스를 유발할 수 있을 것으로 생각한다.

<대한안과학회지 2015;56(1):104-108>