

황화수소가 섬유아세포의 생존과 교원질 겔의 수축에 미치는 영향

Role of Hydrogen Sulfide in the Survival of Fibroblasts and Fibroblast-mediated Contraction of Collagen Gel

박현진 · 김재우

Hyeon Jin Park, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: To investigate the role of hydrogen sulfide in the survival and collagen gel contraction of cultured human Tenon's capsule fibroblasts (HTCFs).

Methods: Primarily cultured HTCFs were exposed to 0, 100, 200, or 300 μ M hydrogen sulfide (sodium hydrogen sulfide, NaHS) for 2 days. Cellular survival was assessed by MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Degree of apoptosis was assessed with flow cytometry using annexin-V/propidium iodide double staining. To evaluate the effect of NaHS on cellular transdifferentiation, HTCFs were stimulated with 5 ng/mL TGF- β 1 and the level of expression of α -smooth muscle actin (SMA) mRNA was assessed using reverse-transcription polymerase chain reaction. The cells were embedded in collagen gel, and the amount of gel contraction was measured.

Results: NaHS at 300 μ M reduced HTCF survival ($p = 0.013$); NaHS at both 200 and 300 μ M increased apoptosis in a dose-dependent manner ($p = 0.013$ and $p = 0.016$). TGF- β 1 increased the expression of α -SMA mRNA ($p = 0.041$); co-treatment with 100 μ M NaHS decreased TGF- β 1-induced α -SMA mRNA expression ($p = 0.039$) and inhibited collagen gel contraction.

Conclusions: NaHS at high concentration reduced cellular survival and increased HTCF apoptosis. NaHS decreased TGF- β 1-induced increases in α -SMA mRNA expression and collagen gel contraction. Thus, hydrogen sulfide may suppress scar formation by inhibiting HTCF transdifferentiation and contraction of collagen gels.

J Korean Ophthalmol Soc 2019;60(10):975-981

Keywords: Apoptosis, Hydrogen sulfide, Survival, Transdifferentiation, Tenon capsule fibroblasts

녹내장여과수술 실패의 가장 흔한 원인은 반흔 형성으로 결막의 창상치유 과정을 잘 조절하면 수술의 성공률을 높일 수 있다. 이를 위해 기존에 사용하는 5-fluorouracil과

마이토마이신C 같은 항대사물질은 효과적으로 반흔 형성을 억제하지만 심각한 부작용을 유발할 수 있다.^{1,2} 결막에 존재하는 섬유아세포는 반흔형성에 중심적 역할을 하므로 섬유아세포의 증식이나 세포외기질의 생산, 세포고사를 조절하는 약제에 대한 연구가 시행되어 왔다. 그중 반흔 형성과 창상치유의 매개 물질로 작용하여 섬유아세포의 활성을 조절하는 전환성장인자(transforming growth factor, TGF)에 작용하는 약제들도 연구되고 있다.³⁻⁵

황화수소(hydrogen sulfide, H₂S)는 과거 독성물질로 알려졌으나 근래 일산화질소와 일산화탄소에 이어 제3의 기체전달체(gasotransmitter)로서 인체 내 여러 조직에서

■ Received: 2019. 1. 24. ■ Revised: 2019. 2. 26.

■ Accepted: 2019. 9. 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
42472, Korea
Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2019 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.

L-cysteine과 homocysteine을 기질로 하여 내인적으로 합성되어 중요한 생리적, 병적 조절 작용을 한다.^{6,7} H₂S는 만성 염증과 조직의 섬유화를 유발하는 독성 물질로 여겨졌으나,^{8,9} 사람의 심장과 폐 조직의 섬유화 과정에서 H₂S가 섬유아세포의 이동과 증식을 억제할 뿐만 아니라 근섬유아세포로의 전환분화를 억제하는 것으로 알려져^{10,11} 인체 조직의 섬유화 과정에서 H₂S의 생리적 역할이 주목받고 있다. 최근 세포의 성장에 대한 H₂S의 약리적 작용이 밝혀졌는데, 내인적으로 생성되거나 외부에서 H₂S를 투여한 경우 세포의 증식에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타나 조절되지 않는 세포의 성장에 대한 새로운 약물로 연구되고 있다.¹²⁻¹⁴ 섬유아세포의 비정상적인 증식이나 근섬유아세포로의 전환은 섬유화 과정의 전형적인 특징으로 과도한 세포 외기질의 생산을 유발한다.^{11,14,15}

이전의 심폐질환 연구에서 H₂S가 섬유아세포의 증식과 분화를 억제한다는 보고가 있었으나¹¹ 인체의 테논낭 섬유아세포(human Tenon's capsule fibroblasts, HTCFs)에서의 효과는 아직 자세히 알려지지 않았다. 이에 따라 본 연구에서는 HTCFs에 대해 H₂S가 세포의 증식에 미치는 영향과 TGF-β1에 의한 분화에 미치는 영향을 알아보고자 하였고, 콜라겐 겔의 수축에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회(IRB)의 승인을 받았고(승인 번호: CR-18-007-L) 헬싱키선언을 따라 시행되었다. 환자 동의하에 다른 안질환이나 안수술력이 없었던 45세 남자 환자의 백내장수술 도중 테논낭 일부를 절제하여 10%의 혈청(Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 배지로 하여 5% CO₂ 배양기에서 섬유아세포를 일차배양하였다. 세포가 조직 주위로 자라나 오는 것을 확인한 후 조직을 제거하고 배양을 계속하여 세포가 배양접시에 층만해지면, 트립신 처리하여 계대배양하였다. 섬유아세포가 배양접시에 부착된 후 H₂S 공여자인 sodium hydrogen sulfide (NaHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0, 100, 200, 300 μM의 농도로 이틀간 처리하였다. 이때 전환분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전환분화의 지표인 α-smooth muscle actin (SMA)의 생성을 유도하는 5 ng/mL TGF-β1 (Sigma-Aldrich)을 추가하였다.¹⁶⁻¹⁸

세포의 생존에 대한 효과는 MTT (3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) assay를¹⁹ 이용하여 측정하였다. 약물 처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μL씩 투여한 후 4시간 동안 정치

배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 μL씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물 처리하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

세포고사의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 상용의 kit (TACS Annexin V-FITC apoptosis detection kit, R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 Annexin-V와 propidium iodide (PI) 이중염색을 이용한 유세포 분석을 시행하였다. 트립신을 처리한 세포를 원심분리한 후 염료용액으로 세척한 다음 5 μL의 annexin V와 1 μL의 Annexin-propidium iodide (PI)를 100 μL의 세포부유액에 넣고 상온에서 15분간 배양해서 400 μL의 완충액에서 섞은 후 유세포 분석기(Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 fluorescence emission 530 nm와 575 nm 이상의 파장에서 유세포 분석을 시행하였다.

섬유아세포에서 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 5분간 변성시키고 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA에 2XGoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA)와 10 pmol의 forward primer (ATAGAACATGGCATCATCACCAAC), reverse primer (GGGCAACACGAAGCTCATTGTA)를 각각 혼합하고 DNAEngine cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 총 30 cycles를 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. 이때 β-actin을 internal standard로 사용하였다.

쥐 꼬리 힘줄에서 추출한 교원질 섬유에 0.1% glacial acetic acid (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 콜라겐 용액을 만들어 교원질 겔 수축성 실험을 시행하였다.²⁰ 섬유아세포가 포함된 교원질 겔을 만들기 위하여 교원질 용액과 4배 농도의 DMEM 배지, 혈청, 그리고 세포부유액을 4:2:1:1의 비율로 섞은 후 24-well 배양접시에서 수분간 정치배양하여 굳힌 다음(gelatinization) 12 well 배양접시로 옮긴 후 섬유아세포의 증식에 의한 영향을 배제하기 위하여 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 넣고 나서 약물에 노출시켰다. 노출 후 1일과 2일에 교원질 겔의 직경을 각각 네 군데에서 측정하여 평균치를 기록하여 교원질 겔의 직경이 감소한 정도를 %로 나타내었다.

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 3회

이상 반복하여 시행하였다. 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

100, 200 μ M NaHS는 각각 섬유아세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았으나($p=0.275$, 0.112), 300 μ M NaHS는 약물 노출되지 않은 대조군에 비해 93.7%의 생존율을 나타내어 세포의 생존을 유의하게 억제하였다($p=0.013$) (Fig. 1). 따라서 NaHS는 비교적 고농도에서 섬유아세포의 생존을 억제하는 것으로 나타났다.

정상적인 살아있는 세포는 annexin-V 음성이면서 PI 음성, 세포고사의 경우 annexin-V에 양성인면서 PI에 음성으로, 그리고 세포고사가 일어나게 되면 annexin-V에 양성인면서 PI에도 양성으로 나타난다. 대조군에서는 21.7%에서 세포고사가 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았으며 200 μ M과 300 μ M NaHS는 각각 24.7%와 24.9%로 세포고사의 정도가 증가하였다($p=0.013$, 0.016) (Fig. 2).

NaHS가 전환분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay에서 세포의 생존에 영향을 주지 않는 것으로 나타난 100 μ M NaHS의 농도에서 5 ng/mL TGF- β 1으로 전환분화의 지표인 α -SMA의 발현을 유도하였다. TGF- β 1이 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행한 MTT assay에서 약물 노출되지 않은 대조군에 비하여 TGF- β 1은 세포의 생존을 117.5%로 유의하게 증가시켰으며($p=0.015$), 100 μ M NaHS에 함께 노출시킨 경우에는 세포의 생존이 101.1%로 감소하였다($p=0.601$) (Fig. 3). 100 μ M NaHS와 TGF- β 1에 함께 노출시킨 경우에는 TGF- β 1에 단독으로 노출시킨 경우에 비해 세포의 생존이 유의하게 감

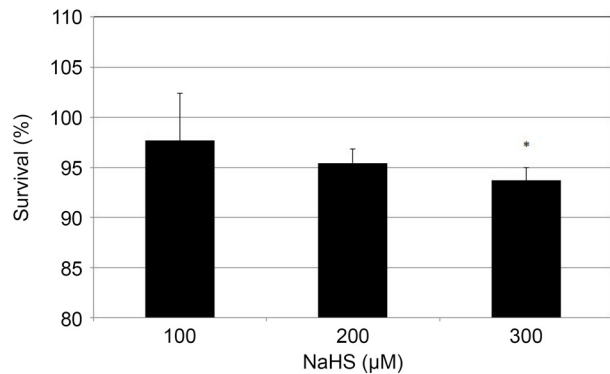


Figure 1. Effect of NaHS on the survival of human Tenon's capsule fibroblasts. Exposure to 300 μ M NaHS decreased cellular survival significantly compared to non-exposed control (* $p < 0.05$). NaHS = sodium hydrogen sulfide.

소하였다($p=0.026$).

100 μ M NaHS는 약물에 노출되지 않은 대조군에 비해 α -SMA mRNA의 발현에 유의한 영향을 미치지 않았으나($p=0.674$) (Fig. 4), TGF- β 1에 단독으로 노출시킨 경우에는 117.2%로 발현이 유의하게 증가하였으며($p=0.041$), NaHS와 TGF- β 1에 함께 노출시킨 경우에는 98.16%로 발현이 감소하였다($p=0.676$). TGF- β 1에 단독으로 노출시킨 경우에 비해 100 μ M NaHS에 함께 노출시킨 경우에는 발현이 유의하게 감소하였다($p=0.039$).

TGF- β 1은 1일째와 2일째에 각각 유의하게 교원질의 수축을 유발하였다($p=0.02$, $p=0.008$) (Fig. 5). 이와 비교하여

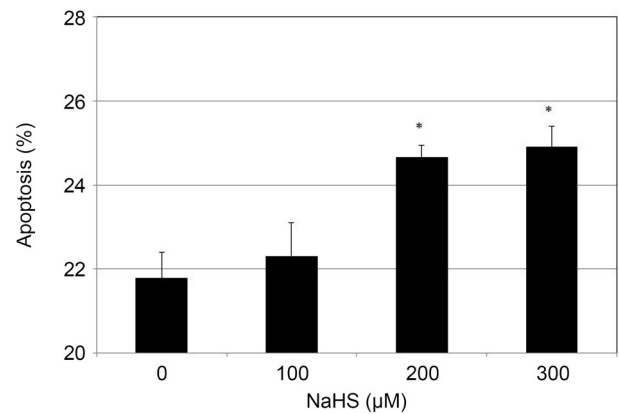


Figure 2. Effect of NaHS on the apoptosis of human Tenon's capsule fibroblasts. Exposure to 200 or 300 μ M NaHS increased cellular apoptosis significantly compared to non-exposed control (* $p < 0.05$). NaHS = sodium hydrogen sulfide.

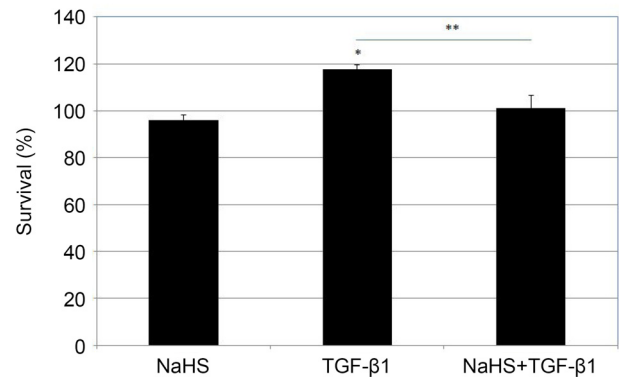


Figure 3. Effect of 100 μ M NaHS and 5 ng/mL TGF- β 1 on the survival of human Tenon's capsule fibroblasts. Exposure to TGF- β 1 increased cellular survival significantly (* $p < 0.05$). Co-exposing 100 μ M NaHS and TGF- β 1 suppressed cellular survival significantly compared to exposing TGF- β 1 alone (** $p < 0.05$). NaHS = sodium hydrogen sulfide; TGF = transforming growth factor.

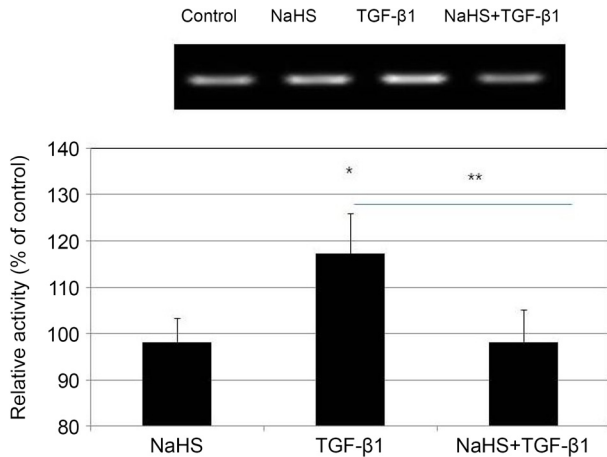


Figure 4. Effect of 100 μ M NaHS and 5 ng/mL TGF- β 1 on the expression of α -SMA mRNA in human Tenon's capsule fibroblasts. Exposure to TGF- β 1 increased the level of α -SMA mRNA expression significantly ($p < 0.05$). Co-exposing 100 μ M NaHS and TGF- β 1 suppressed the TGF- β 1 induced expression α -SMA mRNA significantly compared to exposing TGF- β 1 alone ($p < 0.05$). NaHS = sodium hydrogen sulfide; TGF = transforming growth factor; SMA = smooth muscle actin.

100 μ M NaHS에 함께 노출시킨 경우에는 1일째와 2일째에 교원질 겔의 직경이 각각 85.4%와 68.6%로 감소되어 TGF- β 1에 단독으로 노출시킨 경우에 비해 유의하게 교원질의 수축이 저하되었다($p=0.001$, $p=0.001$). 또한 300 μ M NaHS에 함께 노출시킨 경우에도 1일째와 2일째에 교원질 겔의 직경이 각각 86.1%와 77.35%로 감소되어 TGF- β 1에 단독으로 노출시킨 경우에 비해 유의하게 교원질의 수축이 저하되었다($p=0.03$, $p=0.019$).

고 찰

결막의 창상치유를 조절함으로써 녹내장여과수술의 성공률을 높일 수 있다. 이를 위해 항대사제가 사용되고 있으나 부작용도 많이 나타나므로 부작용이 적게 나타나면서 섬유아세포의 활성이나 증식을 조절하기 위한 여러 약제들이 연구되어 왔다.^{1,2} 그중 하나인 H_2S 는 다양한 종류의 세포에서 증식이나 세포고사의 조절에 관여하는 것이 밝혀져 이를 이용하여 비정상적인 세포의 증식을 조절하기 위한 연구가 시행되어 왔다.^{12,14}

본 연구의 결과에서 NaHS는 비교적 고농도에서만 세포의 증식을 억제한 것으로 나타나 세포의 증식에 대한 효과는 적을 것으로 생각된다. 이전의 연구에서 인체의 폐 섬유아세포에 H_2S 를 노출시킬 경우 세포고사를 유발하는 p53

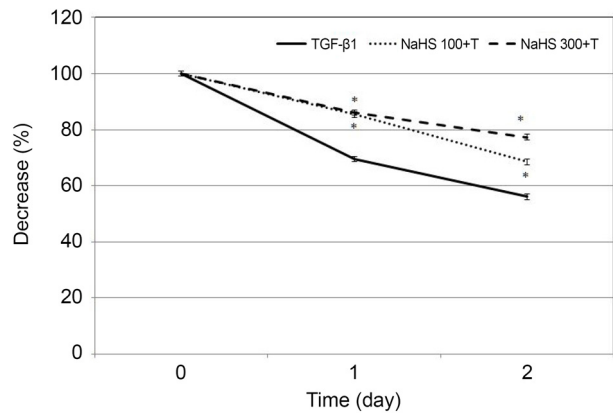


Figure 5. Effect of NaHS and 5 ng/mL TGF- β 1 (T) on the contraction of collagen gels. At day 1 and day 2, exposure to 100 or 300 μ M NaHS inhibited collagen gel contraction significantly compared to exposure to TGF- β 1 alone ($p < 0.05$). NaHS = sodium hydrogen sulfide; TGF = transforming growth factor.

의 발현이 높게 나타나 H_2S 가 세포고사를 유발하는 것으로 보고되었으며^{21,22} 본 연구의 결과에서도 NaHS는 비교적 고농도에서 테논낭 섬유아세포의 세포고사를 유발하였다.

섬유화를 유발하는 질환의 공통적인 특징은 상피간엽전환의 과정을 통해 근섬유아세포로 전이분화가 일어나는 것이며 근섬유아세포는 과도한 세포외기질의 분비와 견인력을 유발하여 조직의 변형을 유발한다.²³ TGF- β 는 이러한 분화 과정에서 중심적 역할을 하며 결막의 창상치유에서도 관여하는데 테논낭과 결막하 섬유아세포의 증식을 유발할 뿐만 아니라 근섬유아세포로의 전이분화를 유발한다.²⁴⁻²⁹ 이러한 분화 과정에서 α -SMA이 발현되며 결합조직의 생산이 일어나게 된다.^{17,30} 따라서 α -SMA의 발현이 특징인 근섬유아세포의 분화를 저해하는 것이 섬유화를 억제하는 하나의 방법이 되는데¹¹ TGF- β 1의 기능을 억제함으로써 세포분화를 줄여 섬유화를 줄일 수 있다.^{11,31,32} TGF- β 는 세포분화에 선행하여 섬유아세포의 수축 반응을 빠르게 유발하므로 α -SMA의 발현을 더욱 증가시킨다.³³

본 연구의 결과에서 TGF- β 1은 α -SMA mRNA의 발현을 증가시켰으며 이러한 증가는 NaHS에 의해 억제되었다. 비록 단백 분비를 측정하지 않았지만 이러한 결과는 H_2S 가 세포분화를 억제하는 과정을 통하여 섬유화를 줄일 수 있는 가능성이 있음을 시사한다. 세포고사는 육아조직에서 반흔으로 변환되는 과정에 관여하는데³⁴ H_2S 가 세포고사를 억제하는 작용이 있으므로 이 또한 섬유화를 줄일 수 있는 효과를 나타낼 것이다. 창상치유 과정에서 교원질 겔의 수축이 반흔형성에 중요한 역할을 하므로, NaHS가 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TGF- β 1으로

교원질의 수축을 유발한 결과 NaHS는 교원질 겔의 수축을 저하시켰는데, 이는 NaHS가 TGF- β 1에 의한 전환분화를 억제함으로써 반흔형성을 억제할 가능성이 있음을 보여준다.

본 연구에서는 TGF- β 1을 이용하여 실험을 시행하였는데 TGF- β 의 아형인 TGF- β 1과 TGF- β 2는 섬유아세포의 증식을 유발하며 녹내장을 비롯한 여러 안질환에서 반흔 형성을 촉진시키며^{28,35} 이 과정에서 섬유아세포의 증식과 이동, 분화, 세포외기질의 분비를 촉진시킨다. 그러나 창상치유 과정에서 여러 사이토카인들이 작용할 수 있으므로 향후 이에 대한 보다 자세한 연구를 요한다.³⁵⁻³⁷ H₂S는 항산화, 항세포고사, 항염증 등 다양한 작용에 관여하지만 정확한 분자수준의 조절기전은 아직 자세히 밝혀져 있지 않다. 그 중 하나는 H₂S가 항산화인자와 반응하는 전사인자인 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)의 발현을 증가시키며, 이 과정에서 Kelch ECH associating protein (Keap1)이 Nrf2를 활성화시킨다는 기전이 제시된 바 있다.^{38,39}

결론적으로 H₂S가 비교적 고농도에서 인체의 HTCFs에 대해 항증식 효과와 항세포고사 작용을 나타내기는 하지만 기존에 사용되는 마이토마이신C에 비해 효과가 적게 나타나므로^{40,41} 임상적으로 항증식 효과를 위해 사용하기 위해서는 부족할 것으로 생각된다. 결막의 반흔형성을 줄이기 위한 기존의 약제들은 대부분 섬유아세포의 증식을 억제하는 작용을 나타내지만^{42,43} H₂S는 근육아세포로의 분화의 억제하며 창상의 수축을 저해한다는 점을 고려해 보면 술 후에 반흔 형성을 억제하는 약제로 사용할 것을 고려해 볼 수 있겠으며 이에 대해서는 향후 동물실험이나 임상실험을 통해 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

- 1) Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003;48:314-46.
- 2) Yoon PS, Singh K. Update on antifibrotic use in glaucoma surgery, including use in trabeculectomy and glaucoma drainage implants and combined cataract and glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:141-6.
- 3) Cordeiro MF, Chang L, Lim KS, et al. Modulating conjunctival wound healing. *Eye (Lond)* 2000;14(Pt 3B):536-47.
- 4) Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, et al. Evaluation of anti-TGF- β 2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3394-401.
- 5) Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, et al. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 in vivo: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1975-82.
- 6) Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002;16:1792-8.
- 7) Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012;92:791-896.
- 8) Parra O, Monsó E, Gallego M, Morera J. Inhalation of hydrogen sulphide: a case of subacute manifestations and long term sequelae. *Br J Ind Med* 1991;48:286-7.
- 9) Duong TX, Suruda AJ, Maier LA. Interstitial fibrosis following hydrogen sulfide exposure. *Am J Ind Med* 2001;40:221-4.
- 10) Fang LP, Lin Q, Tang CS, Liu XM. Hydrogen sulfide suppresses migration, proliferation and myofibroblast transdifferentiation of human lung fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;22:554-61.
- 11) Sheng J, Shim W, Wei H, et al. Hydrogen sulphide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts. *J Cell Mol Med* 2013;17:1345-54.
- 12) Leslie M. Medicine. Nothing rotten about hydrogen sulfide's medical promise. *Science* 2008;320:1155-7.
- 13) Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 2008;117:2351-60.
- 14) Baskar R, Bian J. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *Eur J Pharmacol* 2011;656:5-9.
- 15) Teunissen BE, Smeets PJ, Willemsen PH, et al. Activation of PPAR delta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc Res* 2007;75:519-29.
- 16) Björkerud S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arteriosclerosis Thromb* 1991;11:892-902.
- 17) Skalli O, Schürch W, Seemayer T, et al. Myofibroblasts from diverse pathological settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989;60:275-85.
- 18) Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990;63:21-9.
- 19) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 20) Liu XD, Skold CM, Umino T, et al. Sodium nitroprusside augments human lung fibroblast collagen gel contraction independently of NO-cGMP pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L1032-8.
- 21) Baskar R, Moore PK. Nuclear accumulation and up-regulation of p53 and its associated proteins after H₂S treatment in human lung fibroblasts. *J Cell Mol Med* 2008;12:2297-300.
- 22) Baskar R, Li L, Moore PK. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J* 2007;21:247-55.
- 23) Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: the dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Prog Ret Eye Res* 2017;60:44-65.
- 24) Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF- β and wound healing. *Prog Ret Eye Res* 2002;21:75-89.
- 25) Prendes MA, Harris A, Wirosko BM, et al. The role of transforming growth factor β in glaucoma and the therapeutic implications. *Br J Ophthalmol* 2013;97:680-6.
- 26) Cunliffe IA, Rees RC, Rennie IG. The effect of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture. *Acta Ophthalmol Scand* 1996;74:31-5.

- 27) Browning AC, Alibhai A, McIntosh RS, et al. Effect of diabetes mellitus and hyperglycemia on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts: implications for wound healing after glaucoma drainage surgery. *Wound Repair Regen* 2005;13:295-302.
- 28) Kay EP, Lee HK, Park KS, Lee SC. Indirect mitogenic effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation of subconjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:481-6.
- 29) Denk PO, Hoppe J, Hoppe V, Knorr M. Effect of growth factors on the activation of human Tenon's capsule fibroblasts. *Curr Eye Res* 2003;27:35-44.
- 30) Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103-11.
- 31) Olson ER, Naugle JE, Zhang X, et al. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1131-8.
- 32) Cordeiro MF, Gay JA, Khaw PT. Human anti-transforming growth factor-beta2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2225-34.
- 33) Meyer-ter-Vehn T, Sieprath S, Katzenberger B, et al. Contractility as a prerequisite for TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4895-904.
- 34) Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146:56-66.
- 35) Kottler UB, Jünemann AG, Aigner T, et al. Comparative effects of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 on extracellular matrix production, proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's capsule fibroblasts in pseudoexfoliation and primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 2005;80:121-34.
- 36) Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989;109:429-40.
- 37) Li Z, Bergen TV, Van de Veire S, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5217-25.
- 38) Zhou X, An G, Chen J. Inhibitory effects of hydrogen sulphide on pulmonary fibrosis in smoking rats via attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cell Mol Med* 2014;18:1098-103.
- 39) Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levenon AL. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* 2013;1:45-9.
- 40) Kim JW, Kim SK, Song IH, Kim IT. Mitomycin C-induced apoptosis in cultured human tenon's capsule fibroblasts. *Korean J Ophthalmol* 1999;13:7-15.
- 41) Lee SE, Kim JW. Effects of valproic acid on the survival of human tennon's capsule fibroblasts. *J Korean Ophthalmol Soc* 2018;59:1056-61.
- 42) Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound modulation after filtration surgery. *Surv Ophthalmol* 2012;57:530-50.
- 43) Zada M, Pattamatta U, White A. Modulation of fibroblasts in conjunctival wound healing. *Ophthalmology* 2018;125:179-92.

= 국문초록 =

황화수소가 섬유아세포의 생존과 교원질 겔의 수축에 미치는 영향

목적: 황화수소가 배양된 인체 테논낭 섬유아세포의 생존과 콜라겐 겔의 수축에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 일차배양한 섬유아세포에 0, 100, 200, 300 μ M 황화수소(Sodium hydrogen sulfide, NaHS)에 이틀간 노출시켜 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay를 이용하여 세포의 생존을 측정하였고, annexin-V/propidium iodide 이중염색 후 유세포분석을 이용하여 세포고사의 정도를 측정하였다. 전환분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5 ng/mL TGF- β 1으로 자극한 후 α -smooth muscle actin (SMA) mRNA의 발현을 reverse-transcription polymerase chain reaction로 조사하였으며 섬유아세포를 교원질 겔 내에 봉입하여 수축성검사를 시행하였다.

결과: 300 μ M NaHS는 섬유아세포의 생존을 감소시켰으며($p=0.013$), 200 μ M과 300 μ M NaHS는 세포고사를 유의하게 증가시켰다($p<0.05$). TGF- β 1은 섬유아세포에서 α -SMA mRNA의 발현을 증가시켰으며($p=0.041$), 100 μ M NaHS에 동시에 노출시킨 경우 α -SMA mRNA의 발현이 감소하였고($p=0.039$), 교원질 겔의 수축을 억제하였다.

결론: 황화수소는 고농도에서 섬유아세포의 생존을 감소시키며 세포고사를 유발하였다. 황화수소는 TGF- β 1에 의한 α -SMA mRNA의 발현을 감소시켰으며 교원질 겔의 수축을 억제하였다. 따라서 황화수소는 섬유아세포의 생존에는 영향을 줄 수 있으며, 섬유아세포의 전환 분화를 억제하여 반흔형성을 감소시키는 작용을 나타낼 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2019;60(10):975-981〉

박현진 / Hyeon Jin Park

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실
Department of Ophthalmology, Daegu
Catholic University School of Medicine

