

# 섬유주세포에서 산화스트레스에 대한 아스코르빈산의 역할

류지용 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

**목적:** 아스코르빈산이 과산화수소에 의한 산화스트레스에 대해 섬유주세포의 생존에 미치는 영향과 산화질소 생성의 연관성에 대해 알아보려고 하였다.

**대상과 방법:** 섬유주세포를 일차배양한 뒤 1, 10, 100  $\mu$ M의 과산화수소에 노출시킨 후 이틀간 배양하였으며 1 mM의 과산화수소에도 일회 노출시켰다. 아스코르빈산에도 동시에 노출시켜 섬유주세포의 생존과 산화질소의 생성을 MTT assay와 Griess assay로 조사하였으며 Annexin-PI 이중염색을 한 후 유세포분석을 시행하여 세포고사를 조사하였다.

**결과:** 과산화수소는 농도에 따라 유의하게 섬유주세포의 생존을 억제하였으며 산화질소의 생성을 감소시켰다. 아스코르빈산을 동시에 처리한 경우 산화질소의 생성이 증가되면서 세포의 생존이 증가하였으며 산화질소의 생성량과 세포의 생존율 사이에는 유의한 상관관계를 나타내었다. 유세포분석에서는 아스코르빈산이 과산화수소에 의한 세포고사를 억제하였다.

**결론:** 섬유주세포에서 아스코르빈산은 과산화수소에 산화스트레스에 대해 산화질소의 생성증가가 동반되어 세포보호효과를 나타내었으므로 아스코르빈산의 세포보호효과는 산화질소의 보존작용에 의한 것임을 알 수 있었다.

〈대한안과학회지 2008;49(12):1989-1995〉

안구 내에서는 항상 활성산소가 방출되며 방수 내에도 다량의 활성산소가 존재하고 이에 따른 조직의 손상을 막기 위한 다양한 형태의 항산화 방어체계가 존재한다. 방수내에서도 활성산소가 지속적으로 생성되므로 방수유출의 중요한 경로인 섬유주는 항상 활성산소에 노출되어 있다. 따라서 섬유주는 이러한 활성산소에 노출되어 산화스트레스를 받을 가능성이 높은 조직이며 섬유주가 손상을 받을 경우 방수유출로의 저항을 증가시켜 녹내장을 유발할 수 있을 것이다. 방수 내에는 항산화제로 작용하는 아스코르빈산이 비교적 높은 농도로 존재하며<sup>1,2</sup> 최근에는 아스코르빈산이 혈관내피세포뿐만 아니라 섬유주세포에서도 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 촉진하는 것으로 보고되었다.<sup>3,4</sup> NO는 자유 유리기로서 생체막을 투과하여 내피세포에서의 이완작용, 신경계에서의 조절작용, 면역계에서의 면역매개물질 등의 생체에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져

져 있는데<sup>5-8</sup> 섬유주에서도 NO합성효소가 발현되어<sup>9-11</sup> 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하는 역할을 하지만 녹내장의 경우 이러한 NO의 합성에 장애가 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>12-15</sup>

그러나 섬유주에서 산화스트레스가 유발되었을 때 아스코르빈산이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향과 아스코르빈산에 의한 NO의 생성에 미치는 영향, 그리고 NO의 생성 변화가 세포의 생존과 어떻게 연관되어 있는지는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 섬유주세포를 과산화수소에 노출시켜 산화스트레스를 유발한 후 아스코르빈산이 이러한 산화스트레스에 대하여 섬유주세포의 생존에 미치는 영향과 NO와의 관련성을 알아보려고 하였다.

## 대상과 방법

### 세포배양

안구은행에서 특이한 병력이 없는 사후 6시간 이내에 적출한 인체의 안구를 이용하여 섬유주세포를 일차배양하였다. 먼저 앞방각 주위 조직을 제거한 후 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, USA)로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, USA)와 15% 우태아혈청(Gibco, USA)이 포함된 Dulbec

〈접수일 : 2008년 5월 2일, 심사통과일 : 2008년 9월 11일〉

통신저자 : 김 재 우

대구시 남구 대명4동 3056-6

대구가톨릭대학교병원 안과

Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133

E-mail: jwkim@cu.ac.kr

co's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 초대 배양을 시작하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주 조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 증만해지면 트립신 처리하여 10% 우태아혈청(Gibco, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 계대배양하였다.

#### 약물처리

과산화수소가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 일차배양된 섬유주세포를 트립신으로 처리하고 나서 24-well plate에 분주하여 6시간 동안 부착시킨 후 0, 10, 100  $\mu$ M의 과산화수소(Sigma, USA)에 노출시켜 이틀간 배양하였는데 이때 혈청단백이 과산화수소의 작용에 미치는 영향을 피하기 위하여 무혈청배지를 사용하였다. 또한 고농도의 과산화수소가 단시간에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1,000  $\mu$ M의 과산화수소에 30분간 노출시킨 후 정상배지로 교환하여 이틀간 배양하였다. 그리고 아스코르빈산(L-ascorbic acid, Sigma, USA)이 과산화질소에 의한 산화스트레스에 대해 섬유주세포의 생존과 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1, 10, 100, 1,000  $\mu$ M의 농도로 동시에 노출시켰다. 한편 섬유주세포에서의 NO 생성여부를 알아보기 위해 NO 합성저해제인 N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, USA)를 0.5 mM 첨가한 후 동일한 실험을 반복하였다.

#### MTT assay와 Griess assay

MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 methyl thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)를 각 well당 100  $\mu$ l씩 투여한 후 4 시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, USA)를 각 well당 0.5 ml 씩 넣어 10분 이상 혼든 다음 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma, USA)을 섞은 후 96-well plate에 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 구하였다.

#### 유세포분석

과산화수소가 세포고사를 유발하는지 알아보기 위하여 상용의 kit (TACS Annexin V-FITC apoptosis detection kit TA4638, Molecular probes, USA)를 사용하여 fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V/propidium iodide (PI) 이중 염색을 한 후 유세포분석을 시행하였다. 섬유주세포를 12-well plate에 분주하여 10, 100  $\mu$ M의 과산화수소에 노출시켰으며 이때 아스코르빈산이 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100  $\mu$ M의 아스코르빈산을 각각 추가하여 노출시킨 후 이틀간 정치배양하였다. 트립신으로 분리한 세포를 원심분리하여 세척한 다음 5  $\mu$ l의 Annexin V와 1  $\mu$ l의 PI를 100  $\mu$ l의 세포부유물에 추가하여 15분간 실온에서 정치배양한 후 400  $\mu$ l의 완충액을 넣어 섞어 유세포분석기 (Cytomics 500, Beckman Coulter, USA)를 이용하여 분석하였는데 이때 fluorescence emission은 530 nm와 575 nm 이상으로 하였다.

#### 통계적 처리

모든 실험은 4계에서 6계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였고 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 이용하였으며 유의수준은 0.05% 이하로 정하였다. 또한 세포의 생존율과 NO의 관련성을 알아보기 위해 상관계수를 구하였다.

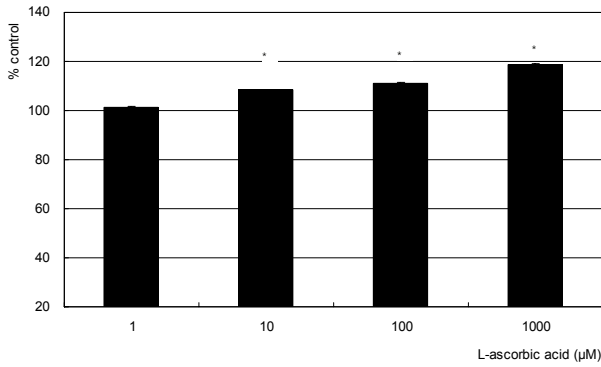
## 결 과

#### 세포배양

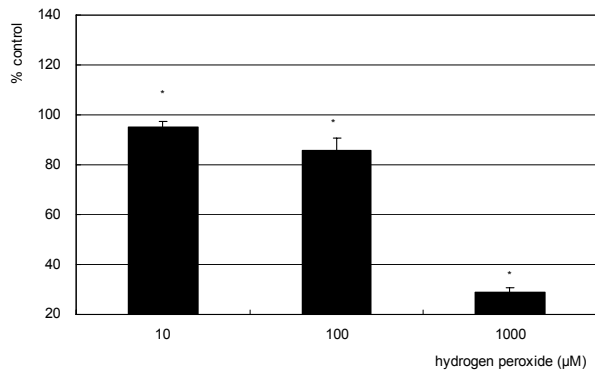
초대배양 2주째부터 섬유주 조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 형태학적인 특징적 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.<sup>17,18</sup>

과산화수소와 아스코르빈산이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

아스코르빈산은 약물에 노출시키지 않은 대조군에서 10  $\mu$ M부터 농도에 비례하여 유의하게 세포의 생존을 증가시켰다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 과산화수소는 10  $\mu$ M과 100  $\mu$ M의 농도에서 유의하게 세포의 생존을 감소시켰



**Figure 1.** Effect of L-ascorbic acid on the survival of cultured trabecular meshwork cells. L-ascorbic acid increased cellular survival in a dose-dependent manner. (\*  $p<0.05$ )

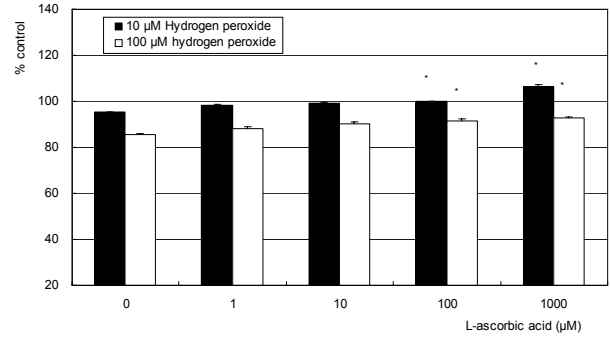


**Figure 2.** Effect of hydrogen peroxide on the survival of cultured TM cells exposed to 10, 100 μM for 2 days, or 1 mM single exposure. Hydrogen peroxide decreased cellular survival significantly in both conditions. (\*  $p<0.05$ )

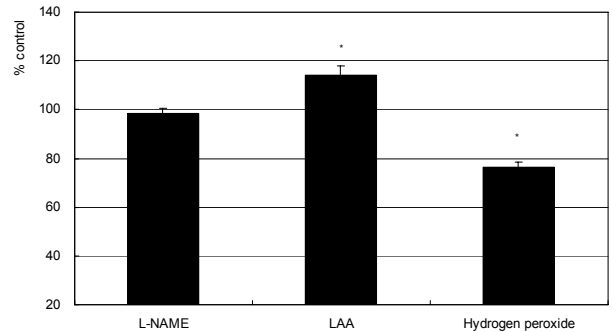
으며 1,000 μM의 고농도에 30분간 단시간 노출시킨 경우에는 더욱 생존이 감소하였다( $p<0.05$ ) (Fig. 2). 산화스트레스에 대한 아스코르빈산의 세포보호작용을 알아보기 위하여 동시에 노출시킨 경우에는 아스코르빈산은 100 μM 농도부터 섬유주세포의 생존을 유의하게 증가시켰다( $p<0.05$ ) (Fig. 3). NO합성저해제인 L-NAME와 아스코르빈산 그리고 과산화수소의 영향을 비교해보면 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 L-NAME는 세포의 생존에 뚜렷한 영향을 끼치지 않았으나 아스코르빈산은 세포의 생존을 증가시킨데 반하여 과산화수소는 세포의 생존을 저하시켰음을 알 수 있었다( $p<0.05$ ) (Fig. 4).

과산화수소와 아스코르빈산이 섬유주세포의 NO 생성에 미치는 영향

아스코르빈산은 약물에 노출시키지 않은 대조군에서 100 μM부터 농도에 비례하여 유의하게 NO의 생성을



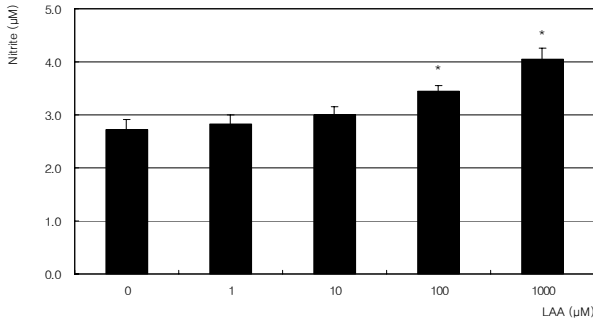
**Figure 3.** L-ascorbic acid increased survival of cultured trabecular meshwork cells exposed to 10, or 100 μM hydrogen peroxide. (\*  $p<0.05$ )



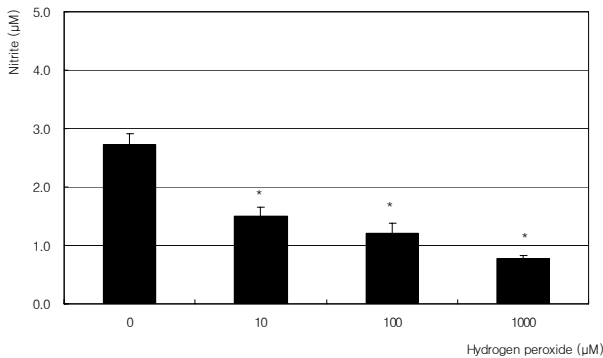
**Figure 4.** Comparison of the effects of 0.5 mM L-NAME, 100 μM L-ascorbic acid (LAA), or 100 μM hydrogen peroxide on the survival of cultured trabecular meshwork cells. (\*  $p<0.05$ )

증가시켰다( $p<0.05$ ) (Fig. 5). 그러나 과산화수소는 10 μM의 농도에서부터 유의하게 NO의 생성을 감소시켰으며 1,000 μM의 고농도에 30분간 단시간 노출시킨 경우에는 더욱 생성이 감소하였다( $p<0.05$ ) (Fig. 6). NO합성저해제인 L-NAME와 아스코르빈산 그리고 과산화수소의 NO의 생성에 미치는 영향을 비교해보면 L-NAME는 약물처리를 하지 않은 대조군에 비해 NO의 생성이 유의하게 감소하여 섬유주세포 자체에서 NO를 생성하는 것을 알 수 있었다. 그러나 100 μM의 농도에서 아스코르빈산은 NO의 생성을 유의하게 증가시킨 데 반하여 과산화수소는 NO의 생성을 감소시켰다( $p<0.05$ ) (Fig. 7). 산화스트레스가 유발된 경우 아스코르빈산에 의한 NO의 영향을 알아보기 위하여 과산화수소와 아스코르빈산을 동시에 노출시킨 경우에는 아스코르빈산은 각 농도에서 과산화수소에 의한 NO 생성억제작용을 상쇄시켰다( $p<0.05$ ) (Fig. 8).

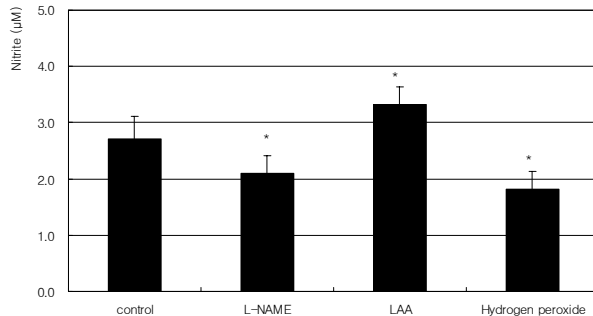
위의 자료에 근거하여 아스코르빈산과 과산화수소에 의한 세포의 생존율과 NO 생성과의 관련성을 알아보기 위한 상관계수를 구한 결과 상관계수는 0.924로 매



**Figure 5.** Effect of L-ascorbic acid (LAA) on the production of nitric oxide in cultured trabecular meshwork cells. LAA increased nitric oxide production in a dose-dependent manner. (\*  $p<0.05$ )



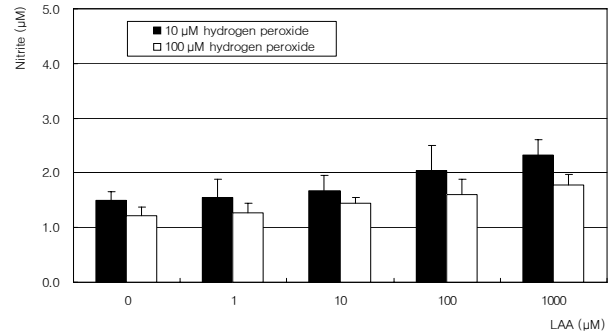
**Figure 6.** Effect of hydrogen peroxide on the production of nitric oxide in cultured trabecular meshwork cells. Hydrogen peroxide decreased nitric oxide production significantly. (\*  $p<0.05$ )



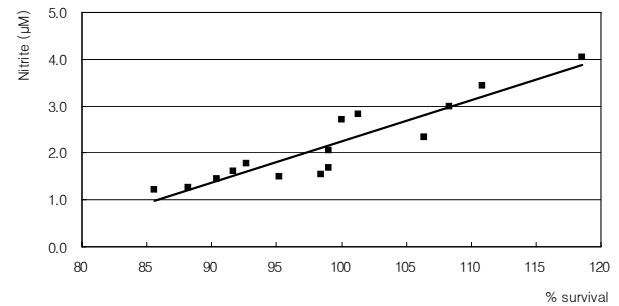
**Figure 7.** Effect of L-NAME, 100 μM L-ascorbic acid (LAA), or 100 μM hydrogen peroxide on the production of nitric oxide. (\*  $p<0.05$ )

우 높은 상관관계를 나타내어 산화스트레스가 유발되었을 때 NO의 생성이 세포의 생존과 서로 연관되어 있음을 알 수 있었다( $p<0.05$ )(Fig. 9).

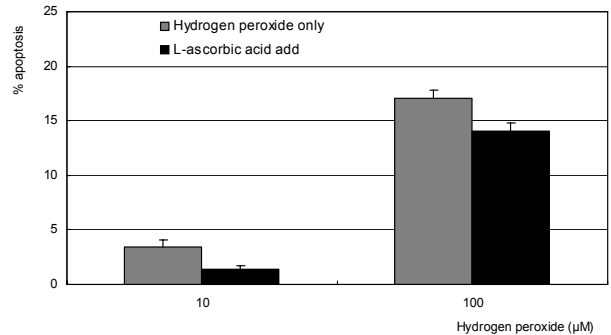
과산화수소에 의한 세포고사에 대한 아스코르빈산의 역할



**Figure 8.** Effect of L-ascorbic acid (LAA) on the production of nitric oxide under oxidative stress induced by hydrogen peroxide. LAA abolished the inhibitory effect of hydrogen peroxide on the NO production.



**Figure 9.** High correlation between nitrite production and cellular survival ( $r=0.924$ ).



**Figure 10.** Annexin-PI flow cytometric analysis of the effect of L-ascorbic acid on the hydrogen peroxide-induced apoptosis in cultured trabecular meshwork cells. L-ascorbic acid (100 μM) decreased apoptosis significantly. (\*  $p<0.05$ )

Annexin-PI 이중염색으로 유세포분석을 시행하면 세포고사의 경우 Annexin에만, 세포괴사의 경우 PI에만 염색이 되므로 세포고사의 정도를 정량분석할 수 있는데 과산화수소는 농도에 비례하여 섬유주세포의 세포고사를 유발하였으며 100 μM의 아스코르빈산을 동시에 노출시킨 경우에는 과산화수소에 의한 세포고사가 유의하게 감소됨을 알 수 있었다( $p<0.05$ )(Fig. 10).

## 고찰

섬유주세포는 섬유주를 통한 방수유출을 정상적으로 유지하는 중요한 역할을 하며 따라서 섬유주세포가 손상을 받으면 섬유주의 방수유출기능이 저하되어 녹내장이 유발되거나 악화될 수 있다. 방수내에는 다량의 활성산소가 발생하고 이에 의한 산화스트레스에 의해 섬유주를 비롯한 다양한 안구조직이 손상받을 수 있으며 이에 대한 방어체계 역시 다양하게 존재하는 것으로 잘 알려져 있는데 아스코르빈산은 혈액에 비해 방수내에서 매우 고농도로 존재하며 중요한 항산화물질로 작용한다.<sup>1,2</sup> 또한 아스코르빈산은 잘 알려진 항산화작용 뿐만 아니라 적절한 양의 NO의 생성장애에 의해 유발되는 혈관내피세포의 기능장애에 대하여<sup>19</sup> 혈관내피세포에서의 NO합성을 촉진하여 내피세포의 기능장애를 방지하는 역할을 하는 것으로도 알려져 있고<sup>3,20</sup> 그 기전은 혈관내피세포의 경우 NO합성의 필수적인 요소인 tetrahydrobiopterin를 화학적으로 안정화시켜 활성산소에 의한 NO의 산화적 변성을 방지하여 NO를 유지하는 것으로 보고되었다.<sup>21,22</sup>

NO는 농도나 환경 등의 조건에 따라 생리적인 매개물질로 작용하거나 또는 세포의 고사를 유발하는 병적인 역할을 한다.<sup>5-7</sup> 본 연구의 결과를 보면 과산화수소에 의한 산화스트레스는 섬유주세포의 생존을 저하시키는 동시에 NO의 생성을 저하시켰고 이와 대조적으로 아스코르빈산은 산화스트레스에 대해 섬유주세포의 세포보호효과를 나타내면서 NO의 생성도 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아스코르빈산이 tetrahydrobiopterin을 안정화시켜 NO의 생성과 농도를 유지할 것임을 시사하며 이에 따라 NO의 합성을 지속시켜 NO의 생리적 농도를 일정하게 유지하는 것이 섬유주세포를 보호하는 데 있어 매우 중요하다는 것을 보여주고 있다. 만일 tetrahydrobiopterin 등이 제대로 공급되지 않는다면 NO의 합성저하와 함께 활성산소종의 생성이 증가되어 세포에 산화스트레스를 주어 손상을 유발할 것이다.

본 연구에서 섬유주세포에서 산화스트레스를 유발하기 위하여 과산화수소를 이용하였는데 농도에 비례하여 세포의 생존이 감소하면서 동시에 NO의 생성도 감소하였다. 이때 저농도에 이틀간 지속적으로 노출된 경우뿐만 아니라 고농도에 30분간 단시간 노출시킨 후 정상배지로 교환한 경우에도 저농도에 노출된 경우처럼 세포의 생존이 감소하였다. 또한 과산화수소는 농도에 비례하여 섬유주세포의 세포고사를 유발하였는데 이에 대해 아스코르빈산은 과산화수소에 의해 유도된 세포고사에 대해 억제효과를 나타내어 아스코르빈산이 산화스트

레스에 의한 세포고사에 대해 세포보호효과를 나타냄을 알 수 있었다. 그러나 인체의 경우 활성산소가 지속적으로 생성되고 방수를 통해 순환되지만 세포배양을 이용한 경우의 실험적 조건은 실제 안구 앞방 내의 조건과의 차이가 있는데 실험실내 조건에서는 배양세포를 과산화수소에 노출시키더라도 과산화수소는 짧은 시간 내에 배지에서 그 활성을 잃어버리는 점도 함께 고려해야 할 것이다.<sup>23</sup> 따라서 실험조건에 사용된 농도와 실제 인체 안구의 앞방 내 농도와는 차이가 있을 것이다.

섬유주에서 산화스트레스에 대해 아스코르빈산이 NO의 생성을 유지시키는 것은 다음과 같은 측면에서 그 의의가 있다. 즉 방수 내에서 NO의 농도를 적절하게 유지함으로써 혈관이완제의 경우처럼 섬유주의 이완상태를 유지시켜 방수유출을 조절할 뿐만 아니라, NO의 생성이 감소할 경우에 다른 유해한 활성산소가 발생하는 소위 uncoupling을 방지함으로써<sup>23,24</sup> 산화스트레스에 대해 섬유주세포를 보호하는 작용을 나타낼 것이며 본 연구의 결과에 의하면 NO의 생성저하를 억제하면서 섬유주세포의 세포고사를 억제하여 세포보호효과를 나타내는 것으로 생각된다. 이때 NO 농도를 적절하게 유지하는 기전은 이미 잘 알려진 바와 같이 NO의 합성경로에서 tetrahydrobiopterin의 안정화에 의한 것으로 생각된다.

섬유주의 변성 또는 노화에 따른 기능의 저하는 개방각녹내장의 중요한 발생기전으로 여겨지고 있는데<sup>26-29</sup> NO는 세포노화의 원인인 telomerase를 활성화시켜 세포노화를 방지하는 역할도 하는 것으로 알려져 있다.<sup>30</sup> 즉 산화스트레스에 의해서 섬유주세포의 구조적 변성을 유발하여 세포외 기질의 부착성을 감소시켜 세포의 소실을 유발하는 것으로 알려져 있으며<sup>31</sup> 이때 활성산소의 발생이 세포노화의 중요한 기전의 하나로 받아들여지고 있다.<sup>32-34</sup> 따라서 활성산소에 지속적인 노출되어 있는 섬유주세포의 경우 이러한 산화스트레스에 대한 방어체계는 섬유주의 노화를 방지하여 그 기능을 정상적으로 유지하는 데 매우 중요할 것으로 생각된다. 향후 새로운 치료방법의 하나로 항산화제를 이용하여 NO의 생성을 유지시키고 세포의 노화를 방지하여 정상적인 기능을 회복하려는 시도와 연구가 활발히 행해지고 있으며,<sup>35,36</sup> 녹내장의 경우에도 활성산소와 관련하여 섬유주의 기능을 유지하고 노화를 방지하기 위한 연구가 앞으로 많이 이루어질 것으로 예상된다.<sup>37</sup>

결론적으로 과산화수소에 의한 산화스트레스는 섬유주세포의 생존을 억제하였고 동시에 NO의 생성이 억제되었다. 이에 대하여 아스코르빈산은 세포의 생존을 보호하면서 NO의 생성을 유지하였다. 따라서 섬유주세포에서 산화스트레스에 대한 방어기전으로 NO의 유



지가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었으며 산화스트레스가 섬유주의 노화에 미치는 영향에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 1) Becker B. Chemical composition of human aqueous humor. Effects of acetazolamide. *AMA Arch Ophthalmol* 1957;57:793-800.
- 2) Erb C, Nau-Staudt K, Flammer J, Nau W. Ascorbic acid as a free radical scavenger in porcine and bovine aqueous humor. *Ophthalmic Res* 2004;36:38-42.
- 3) Heller R, Münscher-Pailug F, Gräbner R, Till U. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8254-60.
- 4) Kim JW. Ascorbic acid enhances nitric oxide production in cultured trabecular meshwork cell. *Korean J Ophthalmol* 2005;19:227-32.
- 5) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- 6) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-95.
- 7) Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- 8) Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, et al. Inducible NO synthase: Role in cell signaling. *J Exp Biol* 1999;202:645-53.
- 9) Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1765-73.
- 10) Geyer O, Podos SM, Mittag T. Nitric oxide synthase activity in tissues of the bovine eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:786-93.
- 11) Meyer P, Champion C, Schlotzer-Schrehardt U, et al. Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res* 1999;18:375-80.
- 12) Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and ocular facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
- 13) Wana RF, Podos SM. Effect of the topical application of nitroglycerin on intraocular pressure in normal and glaucomatous monkeys. *Exp Eye Res* 1995;60:337-9.
- 14) Nathanson JA, McKee M. Alteration of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1774-84.
- 15) Matsuo T. Basal nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
- 16) Green LC, Wagner DA, Glogoski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and  $^{15}\text{N}$  nitrate in biologic fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 17) Polansky JR, Weinreb RN, Baxter JD, Alvarado J. Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:1043-9.
- 18) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 19) Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999;340:115-26.
- 20) May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med* 2000;28:1421-9.
- 21) Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2000;275:17399-406.
- 22) Heller R, Unbehauen A, Schnellenberg B, et al. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2001;276:40-7.
- 23) Padgaonkar V, Giblin FJ, Leverenz V, et al. Studies of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced effects on cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Glaucoma* 1994;3:123-31.
- 24) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function, and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
- 25) Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.
- 26) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 27) Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RC. Age-related changes in protein profiles of the normal human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 1987;45:623-31.
- 28) Schchschabel DO, Binniger E. Aging of trabecular meshwork cells of the human eye in vitro. *Z Gerontol* 1990;23:133-5.
- 29) Horstmann HJ, Rohen JW, Sames K. Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Ageing Dev* 1983;21:121-36.
- 30) Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000;87:540-2.
- 31) Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
- 32) Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:2417-26.
- 33) von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:99-110.
- 34) Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.

- 35) Furumoto K, Inoue E, Nagao N, et al. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 1998;63:935-48.
- 36) Roques SC, Landrault N, Teisse'dre P, et al. Hydrogen peroxide generation in Caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: Effect of ascorbic acid. *Free Radic Res* 2002;36:593-9.
- 37) Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.

**=ABSTRACT=**

## **Role of Ascorbic Acid Against the Oxidative Stress in Trabecular Meshwork Cells**

**Ji-Yong Ryu, M.D., Jae Woo Kim, M.D., Ph.D.**

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

**Purpose:** To investigate the role of L-ascorbic acid (LAA) on the survival and its association with nitric oxide (NO) production against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in trabecular meshwork (TM) cells.

**Methods:** Primarily cultured human TM cells were exposed to hydrogen peroxide; 10, 100  $\mu$ M for 2 days, or 1 mM single exposure with or without co-exposure of LAA. Cellular survival and nitrite production were assessed with MTT and Griess assays, respectively. Flow cytometry using annexin/PI double staining was performed to evaluate apoptosis.

**Results:** Hydrogen peroxide decreased cellular survival significantly in a dose-dependent manner accompanied with decreased NO production. However cellular survival and NO production were increased significantly with co-exposure of LAA. Cellular survival and NO were highly correlated. Flow cytometric analysis revealed that LAA inhibited hydrogen peroxide-induced apoptosis.

**Conclusions:** LAA demonstrated a cytoprotective effect against the hydrogen peroxide-induced oxidative stress accompanied with increased NO production. The cytoprotective effect of LAA may be mediated by preserving NO in TM cells.

*J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49(12):1989-1995

**Key Words:** Ascorbic acid, Hydrogen peroxide, Nitric oxide, Oxidative stress, Trabecular meshwork cells

---

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, M.D., Ph.D.**

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu College of Medicine

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

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