

테트라히드로졸린이 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향

Effect of Tetrahydrozoline on the Permeability of Trabecular Meshwork Cell Monolayer

황석진 · 김재우

Seok Jin Hwang, 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 tetrahydrozoline (THZ) on the survival of cultured human trabecular meshwork cells (HTMC) and the permeability of HTMC monolayer.

Methods: Primary cultured HTMC were exposed to an adrenergic agonist (0.01, 0.1, 1.0 or 10 μ M THZ) for 1 day and 3 days. Carboxyfluorescein permeability through the HTMC monolayer was measured using Transwell. Cellular viability and nitric oxide (NO) production were assessed using MTT and Griess assays, respectively.

Results: THZ did not affect the cellular survival ($p > 0.05$) or NO production ($p > 0.05$). THZ significantly increased the carboxyfluorescein permeability through the HTMC monolayer in a dose-dependent manner compared with non-exposed control ($p < 0.05$) after exposure for 1 and 3 days.

Conclusions: THZ does not affect the survival of HTMC but decreases the permeability of HTMC monolayer in a dose-dependent manner. Thus, THZ may possibly decrease trabecular outflow.

J Korean Ophthalmol Soc 2017;58(1):69-73

Keywords: Permeability, Survival, Tetrahydrozoline, Trabecular meshwork cells

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하며 섬유주의 변성 또는 손상으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있는 기전이 된다.^{1,2} 섬유주를 통한 방수 유출의 정도를 실험실 내에서 알아보는 방법의 하나로 세포를 배양하여 투과도를 조사하는 방법이 있는데, 이 중 약제가 섬유주세포의 투과도에 미치는 영향을 알아보기 위한 방법으로 최근 플루오

레신 제제를 변형한 carboxyfluorescein을 이용한 방법이 배양한 단일세포층의 투과도를 측정하여 약제가 세포에 미치는 독성 또는 스트레스를 측정하는 민감한 방법으로 보고되었다.³⁻⁷ 이 방법을 이용하여 원하는 세포를 단일세포층으로 충분하게 배양한 후 약제에 장기간 노출시킬 경우 약제가 세포의 투과성에 미치는 영향을 알 수 있다.⁸⁻¹⁰

결막충혈을 줄이기 위하여 아드레날린 제제인 테트라히드로졸린(tetrahydrozole, THZ)을 점안제로 사용하는 경우가 있는데,¹¹ 혈관수축제로 작용하는 THZ가 혈관내피세포와 평활근세포의 성질을 가진 섬유주세포에 영향을 미쳐 섬유주를 위축시켜 방수유출을 감소시킬 가능성이 있으나 THZ가 섬유주의 방수유출에 미치는 영향은 아직 자세히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 carboxyfluorescein을 이용하여 THZ가 배양된 인체의 섬유주단층세포층의 투과성

■ Received: 2016. 8. 25. ■ Revised: 2016. 10. 18.

■ Accepted: 2016. 12. 7.

■ 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

에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양과 약물처리

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회 (institutional review board, IRB)의 승인을 받았고(승인번호: CR-16-115) 헬싱키 선언을 따라 시행되었다. 안구이식에 동의한 환자로부터 안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(50 µg/mL gentamicin and 2.5 mg/mL Fungizone, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Thermochemical, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지 (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 배지로 계대배양하였다. 일차배양한 인체의 섬유주세포를 트립신 처리한 후 혈청에 포함된 단백질 등의 영향을 배제하기 위하여 1% 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 THZ (4,5-Dihydro-2-[1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-1H-imidazole monohydrochloride, Tetrazoline hydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0.01, 0.10, 1.0, 10.0 µM의 농도로 1일과 3일간 노출시켰다. 대조군으로는 염류용액인 phosphated buffered saline (PBS; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였다.

MTT assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포증식과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 colorimetric test의 일종인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay를 이용하였다.^{12,13} 각 농도의 약제에 1일과 3일 동안 노출시킨 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 µL씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양하였다. 그 다음 PBS로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 µL씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenbourg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

Carboxyfluorescein permeability assay

12-well의 Transwell (Corning, No.3460, Tewksbury, MA, USA)의 내측 chamber (insert diameter 12 mm, pore size 0.4 mm)에 2×10^4 cells/mL의 농도로 각 well에 고르게 세포를 분주하여 배양하였다. 역위상차현미경으로 섬유주 세포가 단층으로 충만하게 자란 것을 확인한 후 1일과 3일 동안 각 약제에 노출시켜 투과도 검사를 시행하였다. 내측 chamber에 자라고 있는 세포를 PBS로 3회 세척한 다음 50 mM carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 노출시켰다. 노출 2시간 후 transwell을 통하여 외측 chamber로 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 532 nm에서 spectrofluorometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenbourg, Germany)로 측정하여 백분율로 나타내었다.

Griess assay

섬유주의 수축과 이완하는 기전의 하나로 일산화질소 (nitric oxide, NO)가 작용하므로 THZ가 NO의 생성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 NO의 생성을 Griess assay를 이용하여 측정하였다.¹⁴ 각 농도의 약제에 1일과 3일간 노출시킨 다음 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 NO의 생성물인 배지에서의 nitrite를 spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenbourg, Germany)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였다. 실험군과 대조군의 섬유주투과도의 비교는 외측 chamber에서 측정된 형광치를 평균 \pm 표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 비교하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다. 대조군의 carboxyfluorescein 투과도를 100%로 하여 백분율로 나타내었다.

결 과

THZ가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

0.01, 0.1, 1.0, 10 µM의 THZ를 24시간 노출시킨 결과 THZ는 각 농도에서 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 섬유주세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다 (각각 $p > 0.05$) (Fig. 1). 또한 3일간 노출시킨 경우에도 세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다(각각 $p > 0.05$) (Fig. 2). 따라서 THZ는 섬유주세포의 생존에는 유의한 영향을

미치지 않았으며, 섬유주세포층의 투과도를 측정하기 위한 본 실험에서 사용한 농도에서 각 약제는 세포의 생존 변화에 의한 섬유주단층세포층의 투과도에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

THZ가 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향

1일간 THZ에 노출시킨 경우 약제에 노출되지 않은 대조군에 비하여 THZ는 carboxyfluorescein의 섬유주단층세포층의 투과도를 1.0 μM 와 10.0 μM 농도에서 각각 95.59%와 90.62%로 각각 감소시켰다($p=0.02, 0.001$) (Fig. 3). 3일간 노출시킨 경우에는 약제에 노출되지 않은 대조군에 비하여 0.1 μM , 1.0 μM , 10.0 μM 농도에서 각각 96.21%, 93.92%, 91.00%로 투과도가 각각 감소하였다($p=0.027, 0.004, 0.001$) (Fig. 4).

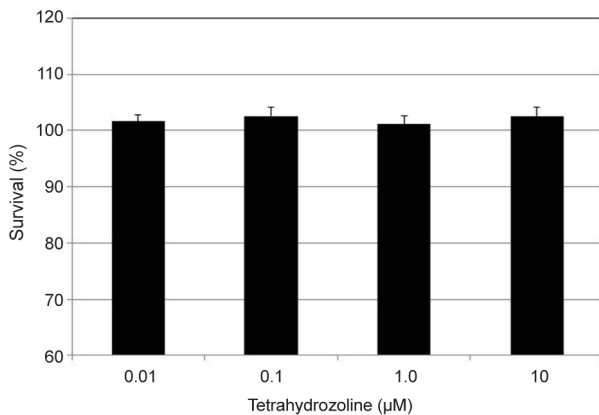


Figure 1. Effect of tetrahydrozoline on the survival of confluent cultured trabecular meshwork exposed for 1 day. Tetrahydrozoline did not affect on the survival significantly compared to non-exposed control ($p > 0.05$).

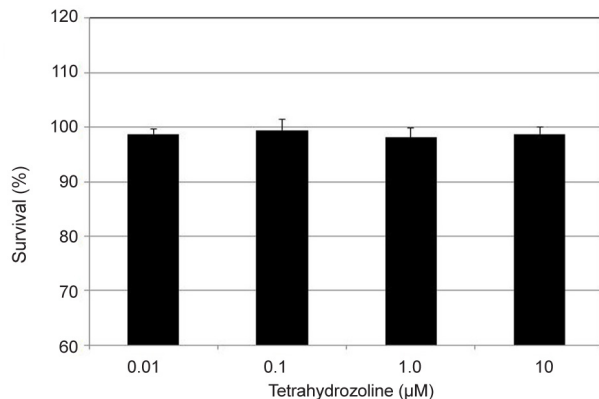


Figure 2. Effect of tetrahydrozoline on the survival of confluent cultured trabecular meshwork exposed for 3 days. Tetrahydrozoline did not affect on the survival significantly compared to non-exposed control ($p > 0.05$).

THZ가 NO의 생성에 미치는 영향

THZ는 10.0 μM 의 고농도에 노출시킨 경우에도 1일과 3일째에 $2.153 \pm 1.754, 2.677 \pm 1.672 \mu\text{M}$ 의 농도를 나타내어 배지에서의 nitrite 생성에 유의한 영향을 미치지 않았다($p=0.193, 0.161$).

고찰

섬유주단층세포층을 이용한 본 연구의 결과에서 THZ가 섬유주단층세포층의 투과도를 감소시켰으므로 섬유주를 통한 방수 유출을 감소시킬 가능성이 있음을 보여 주고 있다. 섬유주를 통한 방수유출의 정도를 정확하게 측정하기

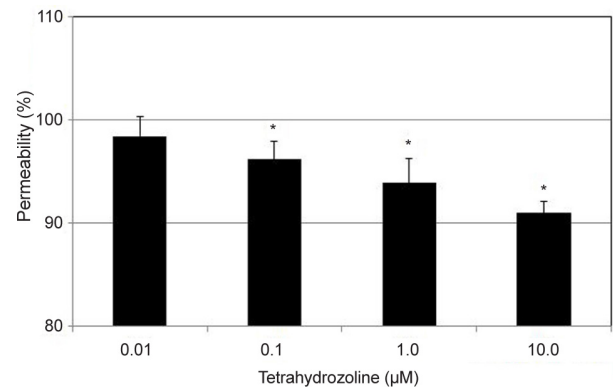


Figure 3. Effects of tetrahydrozoline on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer exposed for 1 day. 1.0, 10.0 μM tetrahydrozoline decreased the permeability of carboxyfluorescein significantly compared to non-exposed control ($*p < 0.05$). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using non-exposed control (permeability 100%).

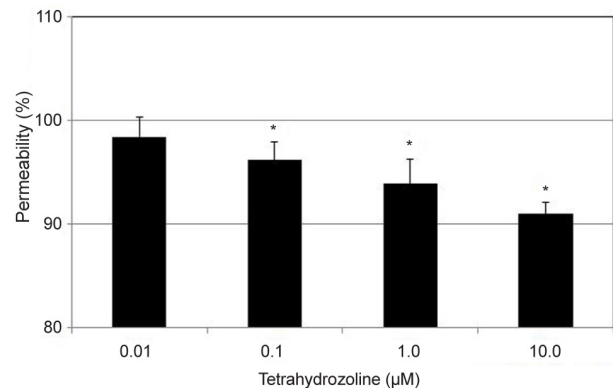


Figure 4. Effects of tetrahydrozoline on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer exposed for 3 days. 0.1, 1.0, and 10.0 μM tetrahydrozoline decreased the permeability of carboxyfluorescein significantly compared to non-exposed control ($*p < 0.05$). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using non-exposed control (permeability 100%).

매우 어려운 이유는 섬유유주만을 통한 방수유출의 측정이 어렵고, 각각의 연구마다 실험에 사용한 측정방법이 다르기 때문이다. 섬유유주단층세포층의 투과도를 측정하는 방법은 이미 오래 전부터 사용되었으나¹⁵ carboxyfluorescein을 사용하면 세포층의 투과도를 보다 더 민감하게 측정할 수 있으므로^{4,10} 본 연구에서는 이 방법을 적용하였다.

THZ는 imidazole 계열의 약제로서 결막충혈을 줄이기 위해 사용되었으며,¹¹ 알파수용체에 작용한다. 섬유유주에도 알파 수용체가 존재하며 섬유유주에서는 수축 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁶ Imidazole 계열의 약제가 안압에 미치는 영향은 약제에 따라 다르게 나타나는데, THZ의 경우 투여 30분 후 안압이 떨어졌다가 다시 상승하는 것으로 보고되어 있으나,¹⁷ 장기간의 투여 결과는 아직 자세히 알려져 있지 않다. 또한 NO의 경우 섬유유주를 이완시켜 방수유출을 증가시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있는데, NO의 생리적 농도를 유지하는 것이 섬유유주를 통한 방수유출의 조절에 중요한 기전의 하나로 작용한다.¹⁸⁻²⁰ NO의 농도가 저하되면 섬유유주가 수축되며 NO는 섬유유주단층세포층의 투과도에 영향을 미치므로²¹ THZ가 수축 작용을 일으키는 기전의 하나로 NO의 생성을 저하시킬 가능성도 생각해 볼 수 있을 것이다. 이러한 가능성을 알아보기 위하여 행한 본 연구의 결과에서 NO의 변화를 측정한 결과 NO의 생성에는 유의한 영향을 미치지 않아 NO가 THZ에 의한 섬유유주세포의 투과도 저하의 기전에는 관여하지 않음을 알 수 있었다.

THZ는 섬유유주세포의 투과도를 농도와 시간에 비례하여 감소시키는 것으로 나타났다. THZ는 섬유유주세포의 생존에는 유의한 영향을 미치지 않았으므로 이러한 결과는 섬유유주세포의 생존과는 상관없이 섬유유주세포 투과도의 감소에 의한 것임을 알 수 있다. 따라서 THZ는 방수 유출을 감소시킬 가능성이 있으므로 장기간 자주 사용할 경우 안압에 좋지 않은 영향을 끼칠 가능성이 있을 것이다. THZ는 스테로이드 제제와 복합제제로 출시된 제품도 있는데,^{22,23} 이 경우 복합되어 있는 스테로이드 제제의 부작용으로 인해 안압 상승이 나타날 수 있을 것이다.

THZ는 안구 내 생리적 조건과는 달리 본 연구와 같이 섬유유주 자체의 이완이 일어날 수 없는 조건인 단층세포층에서도 투과도를 감소시키는 것으로 나타났으나 섬유유주단층세포층을 이용한 실험실 내 결과가 실제 안구 내 생리적 환경과는 많은 차이가 있으며 THZ가 설렘관과 공막을 비롯한 섬유유주 주위의 여러 조직에도 영향을 줄 수 있기 때문에 섬유유주단층세포층을 이용한 실험의 결과에 의미를 부여하는 데 주의해야 할 것이다.

결론적으로 결막 충혈을 감소시키는 THZ는 섬유유주세포

층의 방수유출을 감소시킬 가능성이 있으므로 녹내장 환자에서 장기간 사용할 경우 유해한 영향을 미칠 가능성이 있으나 실제로 녹내장 환자에서 안압에 미치는 영향에 대해서는 향후 더 자세한 임상적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

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. *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 3) Araie M. Carboxyfluorescein. A dye for evaluating the corneal endothelial barrier function in vivo. *Exp Eye Res* 1986;42:141-50.
- 4) Araie M. Barrier function of corneal endothelium and the intraocular irrigating solutions. *Arch Ophthalmol* 1986;104:435-8.
- 5) Tsuboi S, Pederson JE. Permeability of the isolated dog retinal pigment epithelium to carboxyfluorescein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1767-70.
- 6) Blair NP, Rusin MM. Blood-retinal barrier permeability to carboxyfluorescein and fluorescein in monkeys. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1986;224:419-22.
- 7) Grimes PA. Carboxyfluorescein transfer across the blood-retinal barrier evaluated by quantitative fluorescence microscopy: comparison with fluorescein. *Exp Eye Res* 1988;46:769-83.
- 8) 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.
- 9) Kameda T, Inoue T, Inatani M, et al. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:3092-103.
- 10) Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1029-37.
- 11) Menger HC. New ophthalmic decongestant, tetrahydrozoline chloride; clinical use in 1,156 patients with conjunctival irritation. *J AmMed Assoc* 1959;170:178-9.
- 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) Fremoser 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.
- 14) Green, LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biologic fluids. *Analytical Biochem* 1982;126:131-8.
- 15) O'Donnell ME, Brandt JD, Curry FR. Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 1995;268(4 Pt 1):C1067-74.
- 16) Wiederholt M, Schäfer R, Wagner U, Lepple-Wienhues A. Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol* 1996;5:146-53.

- 17) Butler K, Thompson JP, Yolton DP. Effects of non-prescription ocular decongestants. *Rev Optom* 1978;115:49-52.
- 18) Stamer WD, Lei Y, Boussoimmier-Calleja A, et al. eNOS, a pressure-dependent regulator of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:9438-44.
- 19) Predescu D, Predescu S, Shimizu J, et al. Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L371-81.
- 20) Dismuke WM, Mbadugha CC, Ellis DZ. NO-induced regulation of human trabecular meshwork cell volume and aqueous humor outflow facility involve the BKCa ion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1378-86.
- 21) Kim HY, Kim JW. Effect of nitric oxide on the permeability of trabecular meshwork cell monolayer. *J Korean Ophthalmol Soc* 2015;56:771-5.
- 22) Vidrio H, Pardo EG. Antihypertensive effects of sympathomimetic amines. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:3018-14.
- 23) Razeghinejad MR, Katz LJ. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. *Ophthalmic Res* 2012;47:66-80.

= 국문초록 =

테트라히드로졸린이 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향

목적: 테트라히드로졸린(tetrahydrozoline, THZ)이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향과 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 일차배양한 인체의 섬유주세포에 아드레날린성 제제인 THZ를 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 μ M의 농도에 1일과 3일간 각각 노출시켰다. Transwell을 이용하여 단층으로 층만하게 배양한 섬유주세포에 THZ를 노출시켜 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 측정하였다. 세포의 생존은 MTT assay로, 일산화질소의 생성은 Griess assay로 각각 측정하였다.

결과: THZ는 섬유주세포의 생존과 일산화질소의 생성에 유의한 영향을 미치지 않았다($p>0.05$). THZ는 대조군에 비하여 노출 후 1일과 3일째에 각각 농도에 비례하여 섬유주단층세포층의 투과도를 유의하게 감소시켰다($p<0.05$).

결론: THZ는 섬유주세포의 생존에는 영향을 미치지 않았으나 섬유주단층세포층의 투과도를 감소시켰다. 따라서 THZ는 섬유주세포층을 통한 방수유출을 감소시킬 가능성이 있을 것으로 생각된다.

<대한안과학회지 2017;58(1):69-73>
