

## 마이토마이신이 가토 결막섬유아세포의 증식 및 사멸에 미치는 효과

권영삼 · 장광호<sup>1\*</sup>

위스콘신-매디슨 대학교 수의과대학

\*경북대학교 수의과대학

### Effect of Mitomycin-C on Rabbit Conjunctival Fibroblast Proliferation and Apoptosis

Young-sam Kwon and Kwang-ho Jang<sup>\*1</sup>

School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

\*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

(게재승인: 2006년 5월 25일)

**Abstract :** The purpose of this study was to determine the effects of mitomycin C on conjunctival fibroblast proliferation and apoptosis. Rabbit conjunctival fibroblast monolayers were treated with 48 hours application of mitomycin-C. The viability of cells was evaluated by MTT assay. To examine the effect of mitomycin-C on the cell proliferation, immunocytochemistry for BrdU staining was performed. Then, we investigated whether mitomycin-C induced cell's apoptosis by TUNEL staining. As a result of MTT assay, the viability of cells was gradually inhibited in a dose dependent manner by mitomycin-C. The BrdU staining showed that mitomycin-C significantly suppressed the proliferation of conjunctival fibroblast at concentrations of 0.02% or more. When TUNEL assays were performed, the number of apoptotic cells increased 5.6-, 18.5-, and 33.8-fold compared with the control at 0.01, 0.02, and 0.04%, respectively, of mitomycin-C at 48 hours of exposure. Therefore, mitomycin-C may be useful as a regulator in the treatment of corneal diseases that manifest with scar formation and tumor of fibroblast expansion.

**Key words :** mitomycin-C, rabbit, conjunctival fibroblast, apoptosis

## 서 론

마이토마이신은 *Streptomyces caespitosus*에서 유도한 항생제로서 DNA와 RNA복제를 차단하여 단백질 합성을 저해한다(2). 또한, 세포주기 의존적이며 비특이적으로 결합시키는 것을 특징으로하는 알킬화 제제이며, 간 효소에 의해 대사되며(12), 모세혈관 내피세포, 각막 내피 세포, 각막 상피세포, 결막세포, 태낭막 섬유아세포 등의 유사분열 및 증식을 억제한다(6,7,12). 마이토마이신은 녹내장 수술 후 공막의 반흔 형성을 방지하기 위해 널리 사용되고 있다. 수술 후 반흔형성은 주로 섬유아세포의 증식으로 발생하기 때문에, 섬유아세포의 세포사멸사를 유도하여 증식 억제능을 가지는 마이토마이신은 녹내장 수술 및 결막의 섬유혈관성 증식을 특징으로 하는 익상편 질환의 치료제로서 인의분야에서 널리 사용되어 왔다(3). 최근에는 수의임상분야에서도 마이토마이신의 안과수술 후 적용 및 효능에 대해 보고되고 있다(5,9).

따라서, 본 연구에서는 마이토마이신의 가토 결막세포에 대한 세포 증식 및 세포사멸사에 미치는 효과를 통해 세포 독성 및 적용 기능용량에 대해 세포수준에서 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

본 실험은 안과 및 시과학 연구에서의 실험동물 사용에 대한 ARVO (Association of Research in Vision and Ophthalmology) 규정에 따라 실시했다. 결막 조직을 New Zealand White rabbit에서 채취하여 세절한 후 6 well tissue culture plate에 부착시켜 10% FBS DMEM 배지에서 37도 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양했다. 계대배양은 세포가 culture plate 면적의 70~80%정도 자랐을 때 0.05% trypsin으로 떼어내어 1400 rpm으로 원심분리하여 75 mL flask에서 배양하였다.

### 세포 생존능

마이토마이신에 대한 세포 생존능은 3-[4,5-dimethyl-

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : khojang@knu.ac.kr

thiazol-2-yl]-2,5-dephenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Roche, Mannheim, Germany)에 의해서 실시하였다. 마이토마이신의 세포 독성을 알아보기 위해 결막 섬유아세포를 0% (대조군), 0.01%, 0.02%, 0.04% 마이토마이신을 48시간 96 well plate에서 처리하였다. 그 후 모든 well에 10 MTT labeling reagent를 가하여 12시간 배양하였다. 흡광도는 plate reader를 이용해 570 nm 파장에서 측정하였다. 결과는 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대한 처치군의 비율로 나타내었다.

### BrdU 염색

세포분열을 관찰하기 위해 BrdU detectino kit (Roche, Manheim, Germany)을 이용하였다. 세포를 커버슬립에 50% 밀도로 키운 후 BrdU labeling 배지로 교환하여 1시간 정도 37도 배양한다. Washing buffer로 3회 세척 후 -20도에서 30분간 에탄올로 고정했다. 세척 후 BrdU 항체를 37도에서 30분 처리한 후 세척한 다음 마우스 2차 항체를 30분간 처리했다. 발색제를 실온에서 30분간 처리하여 마운팅하여 광학 현미경으로 관찰 하였다. BrdU 양성 세포들은 무작위로 5부위를 100배 관찰하여 카운트하였다.

### 세포자멸사 관찰

세포자멸사 양성 세포를 관찰하기 위해 TUNEL assay kit (Roche, Manheim, Germany)을 이용하여 TUNEL 염색을 실시하였다. 세포를 4 chamber slide에  $2 \times 10^4$ 개씩 배양하였다. 마이토마이신을 처리한 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 실온에서 한시간 고정하였다. 고정 후 10분간 메탄올이 함유된 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 blocking 을 실시한후 2분간 0.1% sodium citrate을 함유한 0.1% Triton X-100으로 permeabilization시켰다. PBS 세척 후 50  $\mu$ L anti-fluorescein-POD antibody를 37도 30분간 처리하였다. 그 후 세포자멸사과정에서 나타나는 DNA fragments 를 3,3'-diaminobenzidine로 염색하였다. TUNEL 양성 세포 들은 100배 확대하여 무작위로 5부위를 카운트하였다.

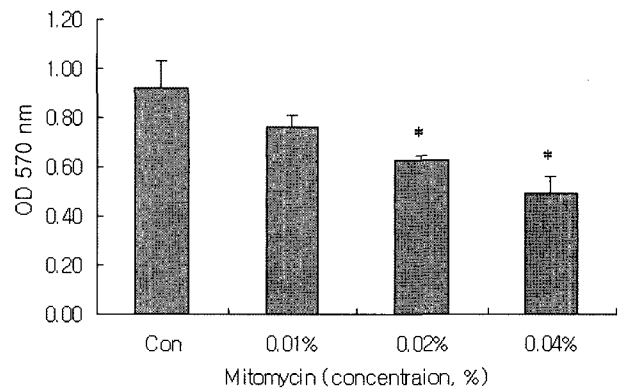
### 통 계

모든 데이터는 평균과 표준편차로 표시하였다. 각 군의 유의성 검증은 Student t-test를 실시하여 p값이 0.05미만인 경우 유의성을 인정하였다.

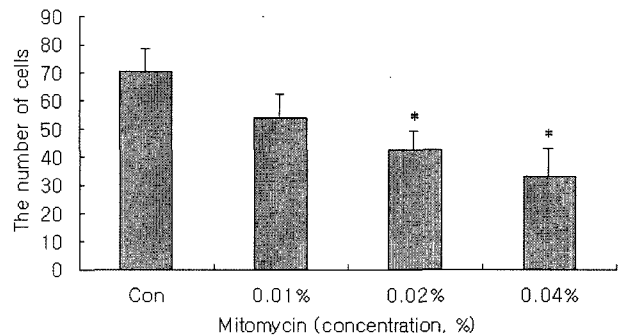
## 결 과

### 세포 생존능

마이토마이신의 결막 섬유아세포의 생존능에 미치는 효과를 알아보기 위해 0% (대조군), 0.01%, 0.02%, 0.04%의 농도로 48시간 처리하여 MTT assay를 실시한 결과, 0.02% 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다( $p < 0.05$ ) (Fig 1).



**Fig 1.** The effect of mitomycin-C on conjunctival fibroblast viability. Cells were treated with 0 to 0.04% mitomycin-C for 48 hours. Cell viability was determined by MTT assay. \*:  $p < 0.05$  compared with the control.



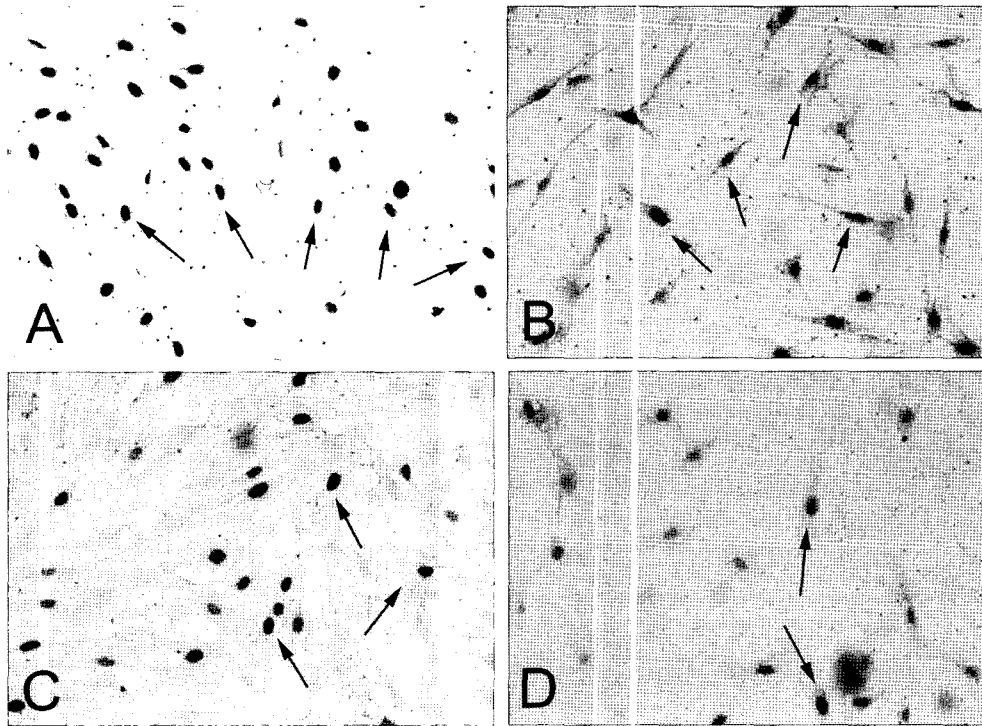
**Fig 2.** The effect of mitomycin-C on the proliferation of conjunctival fibroblast was determined by BrdU staining after 0 to 0.04% mitomycin-C treatment for 48 hours. The number of BrdU-labeled cells was counted in five randomly chosen fields at a magnification of  $\times 100$ . \*:  $p < 0.05$  compared with the control.

### BrdU 염색

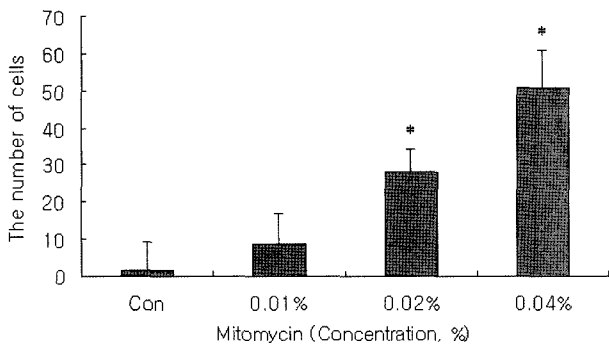
DNA 합성 및 세포 증식에 미치는 마이토마이신의 효과를 알아보기 위해 결막 섬유아세포에 대한 BrdU 염색을 실시하였다. 마이토마이신의 농도에 따른 BrdU 양성 세포의 수는 대조군, 0.01%, 0.02%, 0.04%의 농도에서 각각  $70.75 \pm 7.93$ ,  $54.25 \pm 8.26$ ,  $42.75 \pm 6.29$ ,  $33.25 \pm 9.84$ 의 감소를 나타내었고, 0.02% 이상의 농도에서 유의성 있는 감소가 나타났다( $p < 0.05$ ) (Fig 2). 면역염색의 결과에서도, 마이토마이신의 농도가 증가함에 따라 BrdU 양성 세포 수가 점차 감소하는 것을 관찰했다 (Fig 3).

### TUNEL 염색

마이토마이신의 각 농도에 대한 결막 섬유아세포의 세포자멸사유도 효과를 알아보기 위해 TUNEL 염색을 실시한 결과, 농도 의존적으로 TUNEL 양성 세포의 수는 증가하였다. 대조군, 0.01%, 0.02%, 0.04%의 농도에서 각각  $1.50 \pm 2.38$ ,  $8.50 \pm 5.51$ ,  $27.75 \pm 4.86$ ,  $50.75 \pm 8.22$ 의 증가경향을 나



**Fig 3.** BrdU-labeled proliferating conjunctival fibroblasts. Fibroblasts were treated with 0% (PBS) (A), 0.01% (B), 0.02% (C), and 0.04% (D) mitomycin-C for 48 hours. Arrows: BrdU-positive nuclei. Magnification,  $\times 200$ .



**Fig 4.** The effect of mitomycin-C on the apoptosis of conjunctival fibroblast was determined by TUNEL staining after 0 to 0.04% mitomycin-C treatment for 48 hours. The number of TUNEL-labeled cells was counted in five randomly chosen fields at a magnification of  $\times 100$ . \* $p < 0.05$  compared with the control.

타내었고, 0.02% 이상의 농도에서 유의성 있는 증가가 나타났다( $p < 0.05$ ) (Fig 4). 또한 면역염색의 결과 조직사진에서도 그러한 경향을 관찰할 수 있었다 (Fig 5).

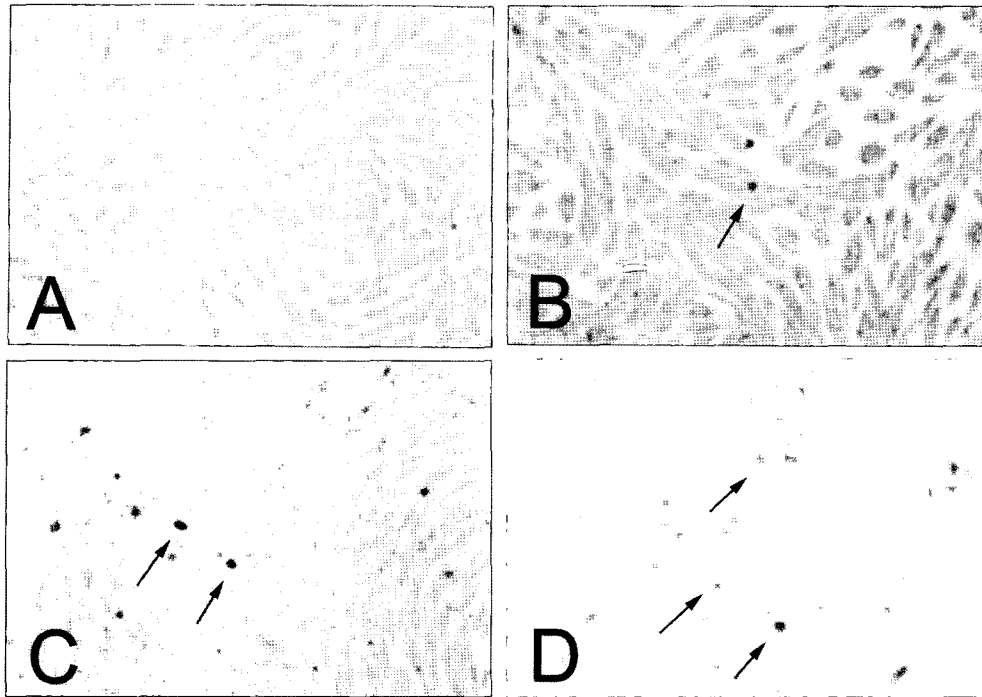
### 고찰

마이토마이신은 각막 세포, 섬유아세포의 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다. 세포자멸사(apoptosis)는 programmed cell death 또는 자연 세포사 과정이라고 일컬어지며, 세포

괴사와 달리 생리적 비염증성 비가역적 과정으로 알려져 있다. 또한 세포자멸사는 주위 세포환경에 손상을 주지 않고 각각의 세포단위별로 이루어진다(8). 이러한 세포자멸사 과정을 가지는 세포는 세포막 기포, 수축, 단백질 분절 및 염색체 농축 등의 특징을 나타낸다. 따라서 세포자멸사는 종양 치료 및 창상 치유에 있어서 중요한 역할을 차지한다.

마이토마이신의 임상적 적용은 섬유주절제술 후 반흔 형성 억제(3), 녹내장 배액로 수술 후 공막의 반흔 형성 억제(1), 섬유혈관성 증식 질환에서의 수술 후 재발 방지(11) 등에 널리 사용되어오고 있다. 또한, 결막 및 각막의 상피화 종양 치료(4,14), 실험동물 모델을 이용한 각막 굴절 수술 후 창상 치유의 조절제로서의 가능성에 대한 연구 결과(8, 10,13,15)도 보고되었다. 그러나, 마이토마이신은 각막 수술 후 반흔 형성 방지와 눈 흐림 방지 효과를 가지지만, 이와 반대로 부작용에 대한 보고도 있다(10,15,16). 이러한 마이토마이신의 효과에 대한 배경으로 본 연구에서는 토끼 결막 섬유아세포에 대한 세포생존, 세포 증식 및 세포자멸사에 대한 효과를 알아봄으로써, 마이토마이신의 안전성 및 유효 적용에 대한 기초적 자료를 제시하고자 했다.

마이토마이신의 세포 생존능에 미치는 효과를 알아보기 위한 MTT 실험 결과, 용량이 높아질수록 세포 생존능이 감소하는 경향을 관찰 할 수 있었다. 결막 섬유아세포의 증식에 미치는 마이토마이신의 효과를 알아보기 위해 BrdU 염색을 실시한 결과, 0.02% 이상의 농도에서 섬유아 세포의 증식이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈다. 이 결과는 실



**Fig 5.** TUNEL-labeled apoptotic conjunctival fibroblasts. Fibroblasts were treated with 0% (PBS) (A), 0.01% (B), 0.02% (C), and 0.04% (D) mitomycin-C for 48 hours. Arrows: TUNEL-positive nuclei. Magnification,  $\times 200$ .

제 임상에서 적용하고 있는 마이토마이신의 농도가 0.02% 또는 0.04%인 것과 일치하는 결과이다. 마이토마이신의 세포에 미치는 세포자멸사 효과를 알아보기 위한 TUNEL 염색의 결과, 양성 세포의 수가 마이토마이신 용량이 증가할수록 점차 증가하는 경향을 나타내었고, BrdU 염색의 결과와 마찬가지로 0.02% 이상의 용량에서 유의성 있는 apoptotic 세포의 증가를 관찰하였다.

따라서 본 실험의 결과 마이토마이신은 결막섬유아세포를 0.02% 이상의 농도에서 세포자멸사를 유도함으로써 세포 증식을 억제하는 효과가 입증되었다. 그러나, 세포수준에서의 마이토마이신의 유의성 있는 효과와 생체내 직접 적용시의 유효 농도는 여러 적용 조건과 환경에 따라 다를 수 있을 것이다. 따라서, 동물 질환별 모델에서의 직접 적용 효능에 관한 실험이 필요할 것이다.

## 결 론

마이토마이신의 가토 결막 섬유아세포의 증식과 세포자멸사에 미치는 효과에 대해서 알아본 결과, 적용 농도에 따라 세포생존능은 감소하였고, 세포 증식은 억제 되었다. 또한, apoptotic 양성 세포의 수도 감소하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2005-10152-0).

## 참 고 문 헌

1. Bergstrom TJ, Wilkinson WS, Skuta GL, Watnick RL, Elnor VM. The effects of subconjunctival mitomycin-C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1725-1730.
2. Crooke ST, Bradner WT. Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev* 1976; 3: 121-139.
3. Crowston JG, Wang XY, Khaw PT, Zoellner H, Healey PR. Human serum reduces mitomycin-C cytotoxicity in human tenon's fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 946-952.
4. Frucht-Pery J, Rozenman Y. Mitomycin C therapy for corneal intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1994; 117: 164-168.
5. Glover TL, Nasisse MP, Davidson MG. Effects of topically applied mitomycin-C on intraocular pressure, facility of outflow, and fibrosis after glaucoma filtration surgery in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1995; 56: 936-940.
6. Jampel HD. Effect of brief exposure to mitomycin C on viability and proliferation of cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Ophthalmology* 1992; 99: 1471-1476.
7. Khaw PT, Sherwood MB, MacKay SL, Rossi MJ, Schultz G. Five-minute treatments with fluorouracil, floxuridine, and mitomycin have long-term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 1150-1154.
8. Kim TI, Tchah H, Lee SA, Sung K, Cho BJ, Kook MS. Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1912-1917.
9. Mamede FV, Laus JL, Cabral VP, Vicenti FA, Barbieri-Neto J. Use of topical mitomycin C in myoplasty of the medial rectus

- muscle of rabbits. *Vet Ophthalmol* 2004; 7: 335-342.
10. Schipper I, Suppelt C, Gebbers JO. Mitomycin C reduces scar formation after excimer laser (193 nm) photorefractive keratectomy in rabbits. *Eye* 1997; 11: 649-655.
  11. Singh G, Wilson MR, Foster CS. Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. *Ophthalmology* 1988; 95: 813-821.
  12. Smith S, D'Amore PA, Dreyer EB. Comparative toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 332-337.
  13. Talamo JH, Gollamudi S, Green WR, De La Cruz Z, Filatov V, Stark WJ. Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1141-1146.
  14. Wilson MW, Hungerford JL, George SM, Madreperla SA. Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival and corneal epithelial dysplasia and neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 303-311.
  15. Xu H, Liu S, Xia X, Huang P, Wang P, Wu X. Mitomycin C reduces haze formation in rabbits after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2001; 17: 342-349.
  16. Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR. Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 1990; 97:1204-1210.