

## 섬유주세포에서 아데노신 A1 길항제에 의한 기질단백분해효소 2의 발현 조절

### Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 Expression by an Adenosine A1 Agonist in Trabecular Meshwork Cells

백민주 · 김근해 · 김재우

Min Ju Baek, MD, Keun Hae Kim, MD, PhD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

**Purpose:** We investigated the extent of adenosine A1 agonist-induced expression and regulation of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) synthesis in human trabecular meshwork cells (HTMC).

**Methods:** Primary HTMC cultures were exposed to 0.1 or 1.0  $\mu$ M N6-cyclohexyladenosine (CHA) for 2 h in the presence or absence of an inhibitor thereof, 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT). The expression level of mRNA encoding MMP-2 was assessed via reverse transcription-polymerase chain reaction, and the levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2) and membrane-type-1 MMP (MT1-MMP) measured by Western blotting. The permeability of the HTMC monolayer was assessed with the aid of carboxyfluorescein.

**Results:** CHA at 1.0  $\mu$ M increased the permeability of the HTMC monolayer ( $p = 0.003$ ) and CHA at both 0.1 and 1.0  $\mu$ M significantly increased MMP-2 mRNA expression, which was inhibited by co-exposure to CPT (all  $p < 0.05$ ). CHA increased MMP-2 activity, decreased that of TIMP2, and increased that of MT1-MMP (all  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** CHA increased the permeability of the HTMC monolayer and increased MMP-2 activity, decreased TIMP2 activity, and increased MT1-MMP activity. Thus, regulation of TIMP2 and MT1-MMP expression may be involved in the adenosine A1 agonist-induced increase in MMP-2 activity.

J Korean Ophthalmol Soc 2018;59(10):946-952

**Keywords:** Adenosine A1 agonist, Matrix metalloproteinase 2, Permeability, Trabecular meshwork

■ Received: 2017. 11. 30.      ■ Revised: 2017. 12. 12.

■ Accepted: 2018. 9. 28.

■ 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

\* This work was supported by the grant of Research Institute of  
Medical Science, Daegu Catholic University (2017).

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

녹내장에서 섬유주의 변성으로 방수 유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있다.<sup>1,2</sup> 기존의 녹내장 치료 약제의 대부분은 방수의 생성을 줄여 안압하강 효과를 나타내지만 최근에는 섬유주를 통한 방수 유출을 직접 증가시키는 Rho-associated kinase (ROCK) 저해제와 아데노신 길항제(adenosine agonist), 스타틴(statin) 계열의 약제가 연구되고 있다.<sup>3,4</sup>

이 세 가지 계열의 작용 기전에 있어서 아데노신 A1 길항제는 섬유주세포의 형태학적 변화와 이온 운반을 변화시켜 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키며, 세포외 기질에 작용하는 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase 2,

MMP-2)의 분비를 증가시키는 작용도 나타낸다.<sup>5</sup> 이와 달리 ROCK 저해제는 세포의 기질에 관여하는 MMP-2의 발현에는 유의한 영향을 미치지 않으며 스타틴의 경우 MMP-2의 발현에 미치는 영향은 적은 것으로 보고되었다.<sup>5-8</sup>

아데노신 A1 길항제의 작용 기전의 하나로 MMP-2의 활성을 증가시키는 것으로 보고되어 있으나<sup>6,7</sup> MMP-2의 활성 조절에 관여하는 tissue inhibitor of matrix proteinase 2 (TIMP2)와 membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)의 활성에 미치는 요인은 아직 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 아데노신 A1 길항제가 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향을 조사하여 방수 유출의 정도에 미치는 영향을 간접적으로 알아보고, 아데노신 A1 길항제가 TIMP2와 MT1-MMP의 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 대상과 방법

### 세포배양과 약물처리

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회 (institutional review board, IRB)의 승인을 받았고(승인번호: CR-17-043) 헬싱키선언에 따라 시행되었다. 안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 초대 배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 세포가 배양접시에 충만해지면 1:3의 비율로 계대배양하였다. 일차배양한 섬유주세포를 배양접시에 분주하여 세포를 부착시킨 다음 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지를 이용하여 24시간 배양한 다음 아데노신 A1 길항제인 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine (CHA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 2시간 동안 노출시켰다. 이때 아데노신 A1 수용체 저해제인 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10  $\mu$ M를 30분 전에 전처리하였다.

### 세포 생존의 측정

세포의 생존은 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였으며 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.<sup>9</sup>

### 섬유주단층세포층의 투과도 측정

섬유주세포를 트립신 처리한 후 12-well의 Transwell (No.3460, Corning, Tewksbury, MA, USA)의 내측 chamber (insert diameter 12 mm, pore size 0.4 mm)에  $2 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 각 well에 고르게 세포를 분주하여 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 배양하였다.<sup>10,11</sup> 역위상차현미경으로 섬유주세포가 단층으로 충만하게 자란 것을 확인한 후 혈청에 포함된 단백질 등의 영향을 배제하기 위하여 1% 우태아혈청을 포함한 배지로 교환한 다음 각 약제에 24시간 노출시킨 후 투과도 검사를 시행하였다. 내측 chamber에 자라고 있는 세포를 phosphated buffered saline로 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, Offenburg, Germany)로 측정하여 백분율로 나타내었다.

### MMP-2 mRNA의 발현 측정

Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 섬유주세포에서 RNA를 분리한 후 분리된 RNA에서 MMP-2 mRNA의 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction을 이용해 확인하였다. 섬유주세포에서 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 5분간 denaturation 시키고 얼음에 5분간 둔 다음 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 70°C 10분간 반응시켜 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA에 2XGoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA)와 10 pM의 primer (MMP-2; forward primer, ctc gtg cct tcct aag tct gg, 251 bp, reverse primer, ggc gtt ccc ata ctt cac ac, 251 bp)를 각각 혼합하여 DNA Engine cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분, 94°C 30초, 54°C 30초, 72°C 30초로 총 30 cycles를 시행한 후 57°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 각각 분석하였다. 이때  $\beta$ -actin을 internal standard로 사용하였다.

### TIMP2와 MT1-MMP의 활성 측정

TIMP2와 MT1-MMP의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같이 Western blot을 이용하여 단백을 측정하였다. 단백질 추출에는 RIPA buffer (ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. Cell lifier (Corning,

Acton, MA, USA)로 세포를 모아 4°C에서 1,200 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 모아 -80°C에 보관하였다. 단백질량은 BCA protein assay reagent kit (Thermoscientific, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 정량한 샘플을 같은 양으로 NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 전기영동한 후 Xcell Surelock (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 니트로셀룰로오스 막(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 1시간 transfer하였다. Transfer가 끝난 니트로셀룰로오스 막을 세척한 후, 막 차단 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 1시간 동안 정치배양하였다. 막 차단 용액(Invitrogen)에 1:1,000으로 희석하여 처리하고 4°C에서 24시간 반응시킨 후 세척하고 Goat Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated된 이차 항체(SantaCruz, Dallas, TX, USA)를 막 차단 용액에 1:3,000으로 희석하여 처리하고 상온에서 1시간 반응시켰다. 항체를 반응시킨 막을 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermoscientific, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 Gel Doc XR+ (Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 단백질 발현량을 확인하였다. 이때 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase를 internal standard로 사용하였다.

## 통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였다. 세포의 생존과 투과도는 평균 표준오차로 나타내었으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하여 유의성을 비교하였고 유의수준은 5%로 정하였다.

## 결 과

### 세포배양

초대배양 10일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주조직의 이식편 주위에서 위상양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.<sup>12,13</sup>

### 아데노신 A1 길항제와 저해제가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

2시간 동안 각 농도의 약제에 노출시킨 후 세포의 생존에 미치는 영향을 측정하기 위해 시행한 MTT assay에서 CHA와 CPT는 약물에 노출되지 않은 대조군에 비해 세포

의 생존율에 유의한 차이를 나타내지 않았다( $p>0.05$ ).

### 아데노신 A1 길항제가 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향

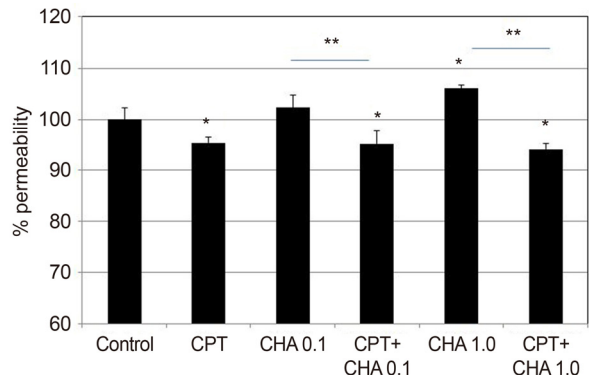
약제에 노출되지 않은 대조군에 비하여 1.0  $\mu$ M CHA는 carboxyfluorescein의 섬유주단층세포층의 투과도를 유의하게 증가시켰으며( $p<0.05$ ), CPT는 단독 또는 CHA와 동시에 노출된 경우 모두 약제에 노출되지 않은 대조군에 비하여 투과도를 감소시켰다(모두  $p<0.05$ ) (Fig. 1). 10  $\mu$ M CPT에 동시에 노출시킨 경우 0.1, 10  $\mu$ M CHA 모두에서 CHA에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 섬유주단층세포층의 투과도가 유의하게 감소하였다( $p=0.001, 0.001$ ).

### 아데노신 A1 길항제가 MMP-2 mRNA의 발현에 미치는 영향

0.1  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M CHA는 단독 또는 CPT와 동시에 노출시킨 경우 모두에서 대조군에 비하여 각각 MMP-2 mRNA의 발현이 증가하였다(모두  $p<0.05$ ) (Fig. 2). 또한 10  $\mu$ M CPT에 동시에 노출시킨 경우 CHA에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 0.1, 10  $\mu$ M CHA 모두에서 각각 MMP-2 mRNA의 발현이 유의하게 감소하였다( $p=0.001, 0.001$ ).

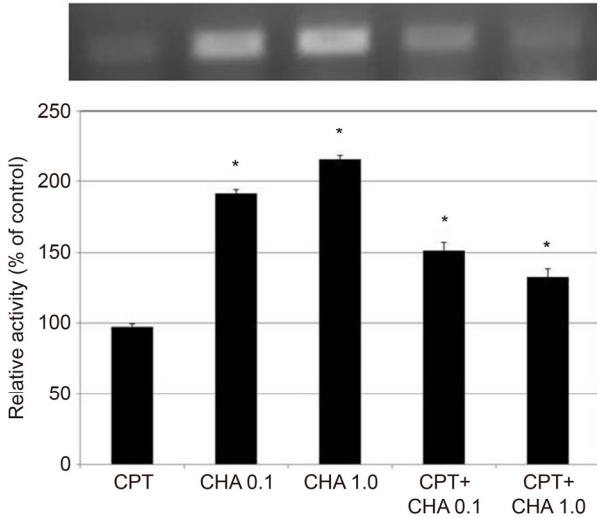
### 아데노신 A1 길항제가 MMP-2 단백질 발현에 미치는 영향

0.1  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M CHA는 단독 또는 CPT와 동시에 노출시킨 경우 모두에서 대조군에 비하여 각각 MMP-2의 활성

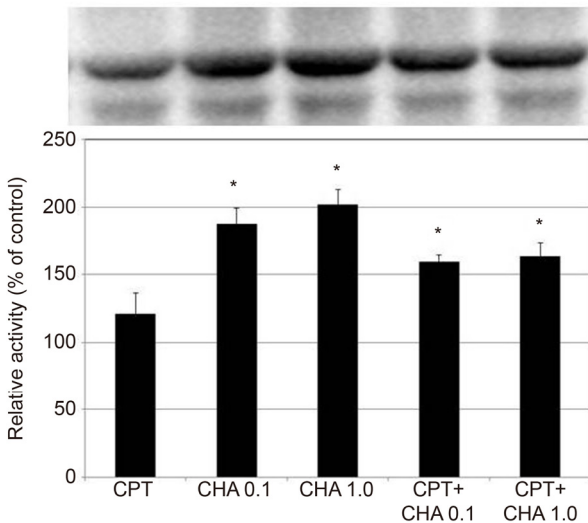


**Figure 1.** Exposure to 1.0  $\mu$ M N6-cyclohexyladenosine (CHA) increased the permeability of carboxyfluorescein significantly compared to control. Exposure to the 10  $\mu$ M 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) decreased permeability significantly when co-exposed to 0.1 or 1.0  $\mu$ M CHA (\*). When co-exposed to CPT, 0.1 or 1.0  $\mu$ M CHA decreased permeability significantly compared with exposure to CHA alone (\*\*). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using non-exposed control (permeability 100%). \*\*,  $p < 0.05$ .

을 증가시켰으며(모두  $p < 0.05$ ), CPT 단독 투여는 유의한 차이를 나타내지 않았다( $p = 0.315$ ) (Fig. 3). 한편 10  $\mu\text{M}$  CPT에 동시에 노출시킨 경우 CHA에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 0.1, 10  $\mu\text{M}$  CHA 모두에서 각각 MMP-2의



**Figure 2.** Exposure to 0.1, 1.0  $\mu\text{M}$  *N*6-cyclohexyladenosine (CHA) increased significantly the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mRNA with or without co-exposure to 10  $\mu\text{M}$  8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) compared to control. Co-exposure to the 10  $\mu\text{M}$  CPT with 0.1 or 1.0  $\mu\text{M}$  CHA decreased the expression of MMP2 mRNA compared to exposure to CHA alone, respectively.  $\beta$ -actin used as internal standard. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** Exposure to 0.1, 1.0  $\mu\text{M}$  *N*6-cyclohexyladenosine (CHA) increased significantly the activity of matrix metalloproteinase 2 with or without co-exposure to 10  $\mu\text{M}$  8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) compared to control. GAPDH used as internal standard. \*  $p < 0.05$ .

활성이 감소하는 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다( $p = 0.087, 0.062$ ).

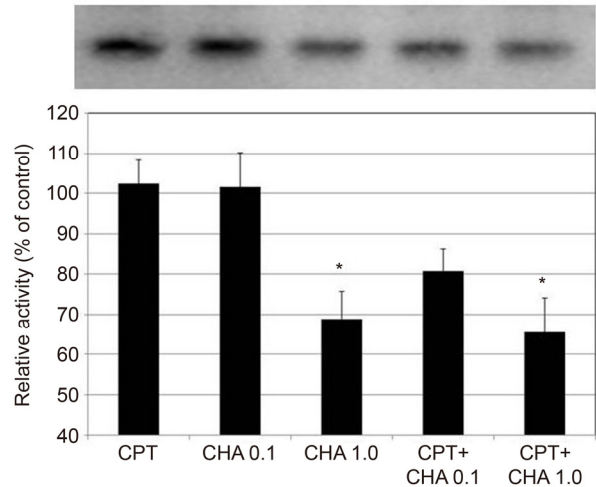
아데노신 A1 길항제가 TIMP2와 MT1-MMP의 단백질 발현에 미치는 영향

1.0  $\mu\text{M}$  CHA는 단독 또는 CPT와 동시에 노출시킨 경우 모두에서 대조군에 비하여 유의하게 TIMP2의 활성을 감소시켰다( $p = 0.035, 0.037$ ) (Fig. 4). 또한 10  $\mu\text{M}$  CPT에 동시에 노출시킨 경우 CHA에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 0.1, 10  $\mu\text{M}$  CHA 모두에서 각각 TIMP2의 활성이 유의하게 증가하였다( $p = 0.028, 0.024$ ).

1.0  $\mu\text{M}$  CHA는 MT1-MMP의 활성을 증가시켰으며( $p = 0.037$ ), CPT와 동시에 노출시킨 경우 0.1, 10  $\mu\text{M}$  CHA 모두에서 대조군에 비하여 유의하게 활성이 감소하였다( $p = 0.032, 0.025$ ) (Fig. 5). 또한 10  $\mu\text{M}$  CPT에 동시에 노출시킨 경우 CHA에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 0.1, 10  $\mu\text{M}$  CHA 모두에서 각각 MT1-MMP의 활성이 유의하게 감소하였다( $p = 0.006, 0.001$ ).

## 고 찰

최근에 섬유주를 통한 방수 유출을 직접 증가시키는 약제가 새로운 녹내장 치료 약제로 많이 연구되고 있으며,<sup>3</sup> 그중 아데노신은 방수생산을 감소시키는 동시에 방수 유출을 증가시키는 작용을 나타낸다.<sup>14-16</sup> 아데노신은 ROCK 저



**Figure 4.** Exposure to 1.0  $\mu\text{M}$  *N*6-cyclohexyladenosine (CHA) decreased significantly the activity of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2) with or without co-exposure to 10  $\mu\text{M}$  8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) compared to control. Exposure to the 10  $\mu\text{M}$  CPT alone did not affect the activity of TIMP2. GAPDH used as internal standard. \*  $p < 0.05$ .

해제와 스타틴과 마찬가지로 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키지만 세포외기질의 변화를 유발하는 것이 특징적인데,<sup>5</sup> 섬유주세포에 아데노신 A1 수용체가 존재하며 CHA는 주로 MMP-2의 발현을 유발한다.<sup>7,17,18</sup> MMP-2의 발현에 미치는 영향을 비교한 연구에서 CHA는 MMP-2 mRNA의 발현을 유의하게 증가시켰으므로<sup>8</sup> 아데노신 계열 약제의 작용 기전에는 ROCK 저해제 또는 스타틴과는 달리 MMP-2를 발현시켜 세포외 기질을 재구성하여 섬유주의 저항을 감소시켜 방수 유출을 증가시키는 기전이 작용할 것으로 생각된다.

사람 섬유주세포주와 돼지 눈을 이용한 연구에서 아데노신이 MMP-2의 활성을 증가시킨다는 보고가 있었으나<sup>7</sup> 사람의 섬유주세포를 대상으로 MMP-2의 조절에 관여하는 TIMP2와 MT1-MMP의 활성에 미치는 영향은 아직 보고되지 않았으므로 본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 TIMP2와 MT1-MMP의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

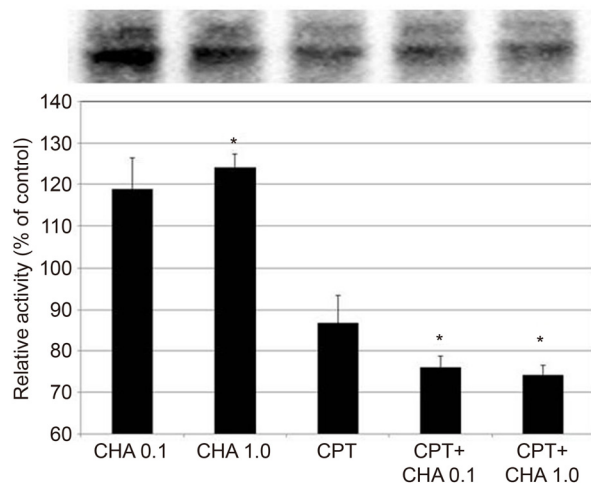
본 연구의 결과에서 CHA는 섬유주단층세포층의 투과도를 증가시켰으며, 이러한 증가는 아데노신 A1 수용체를 저해하는 CPT에 의해 억제되었다. 이러한 결과는 아데노신이 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키는 작용이 있음을 간접적으로 보여주고 있다.

섬유주에는 MMP와 MT-MMP를 비롯한 다양한 단백분해효소와 저해제가 발현되는데,<sup>19</sup> MMP의 활성을 증가시키면 섬유주유출이 증가되고, 감소시키면 섬유주유출이 감소

되므로 세포외 기질을 조절하는 MMP가 섬유주의 저항에 있어 중요한 역할을 한다는 사실은 이미 잘 알려져 있으며,<sup>20</sup> MMP의 활성 조절에 관여하는 MT1-MMP와 TIMP2도 섬유주에서 발현된다.<sup>21</sup> MMP-2의 활성화를 통해 섬유주세포의 액틴 세포골격의 변화가 일어나는데 이때 아데노신 A1 길항제는 섬유주세포의 MMP-2의 발현을 증가시키지만 MMP-3와 MMP-9의 분비에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있으며,<sup>6</sup> MMP-2의 촉진과 억제에 각각 관여하는 MT1-MMP와 TIMP2에 의해 작용을 나타낼 가능성이 있다.

이에 따라 시행한 본 연구의 결과에서 CHA는 MMP-2 mRNA의 발현과 MMP-2 단백질의 발현을 증가시켰으며 CPT에 의해 억제되었는데 이러한 결과는 기존의 보고와 일치한다.<sup>6,7</sup> 또한 CHA는 MMP-2의 억제인자로 작용하는 TIMP2의 활성을 저하시켰으며, 촉진인자로 작용하는 MT1-MMP의 발현을 증가시켰다. 따라서 CHA에 의한 MMP-2의 증가는 MT1-MMP와 TIMP2에 의해서 조절된다는 것을 알 수 있다. 또한 아데노신 A1 길항제는 MMP3와 MMP9의 분비에는 유의한 영향을 미치지 않았던 것으로 보아 포도막공간 유출에는 유의한 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

본 연구의 제한점으로는 CHA에 의한 MMP-2의 활성 조절에 관여하는 MT1-MMP와 TIMP2의 발현을 조사하였는데, 섬유주세포에서는 다양한 MMP들이 발현될 뿐만 아니라 이의 조절에 관여하는 여러 종류의 MT-MMP와 TIMP들이 상호작용하여 작용을 나타낼 가능성도 있다.<sup>19,22</sup> 비록 이전의 연구에서 CHA가 MMP3 또는 MMP9의 발현을 나타내지는 않았다고 보고되었으나,<sup>7</sup> 다양한 MT-MMP들이 MMP-2의 활성을 유도할 수 있으며, TIMP2의 경우 다른 TIMP와는 기본적으로 발현되며 모든 MMP에 대해 억제작용을 나타낼 수 있으므로<sup>23</sup> 향후 이에 관한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각되며, 또한 세포배양을 이용한 본 연구의 결과를 실제 생체 내에서 일어나는 생리적 반응과는 직접적으로 비교하기는 어려울 것이다. 결론적으로 아데노신 A1 길항제는 섬유주를 통한 투과도를 증가시킴으로써 방수 유출을 증가시켰으며, 그 기전으로 MMP-2의 분비 증가가 관여하며, 이때 MT1-MMP와 TIMP2가 MMP-2의 활성 조절에 관여할 가능성이 있다.



**Figure 5.** Exposure to 1.0  $\mu$ M N6-cyclohexyladenosine (CHA) increased significantly the activity of membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). Co-exposure to the 10  $\mu$ M 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) with 0.1 or 1.0  $\mu$ M CHA decreased the activity of MT1-MMP. GAPDH used as internal standard. \*  $p < 0.05$ .

## 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) Schmidl D, Schmetterer D, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Pharmacotherapy of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;31: 63-77.
- 4) Kocczynski CC, Epstein DL. Emerging trabecular outflow drugs. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;30:85-7.
- 5) Zhong Y, Yang Z, Huang WC, Luo X. Adenosine, adenosine receptors and glaucoma: an updated overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1830:2882-90.
- 6) Sanka K, Maddala R, Epstein DL, Rao PV. Influence of actin cytoskeletal integrity on matrix metalloproteinase-2 activation in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2105-14.
- 7) Shearer TW, Crosson CE. Adenosine A1 receptor modulation of MMP-2 secretion by trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3016-20.
- 8) Kim JW. Comparative study of the effects of trabecular meshwork outflow drugs on the permeability and nitric oxide production in trabecular meshwork cells. *Korean J Ophthalmol* 2017;31:452-9.
- 9) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 10) Song J, Deng PF, Stinnett SS, et al. Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2424-32.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 14) Crosson CE. Adenosine receptor activation modulates intraocular pressure in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:320-6.
- 15) Crosson CE. Intraocular pressure responses to the adenosine agonist cyclohexyladenosine: evidence for a dual mechanism of action. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1837-40.
- 16) Tian B, Gabelt BT, Crosson CE, Kaufman PL. Effects of adenosine agonists on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in cynomolgus monkeys. *Exp Eye Res* 1997;64:979-89.
- 17) Husain S, Shearer TW, Crosson CE. Mechanisms linking adenosine A1 receptors and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:258-65.
- 18) Fleischhauer JC, Mitchell CH, Stamer WD, et al. Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport. *J Membrane Biol* 2003;193:121-36.
- 19) Keller KE, Aga M, Bradley JM, et al. Extracellular matrix turnover and outflow resistance. *Exp Eye Res* 2009;88:676-82.
- 20) Bradley JM, Vranka J, Colvis CM, et al. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2649-58.
- 21) Pang IH, Helberg PE, Fleenor DL, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3485-93.
- 22) Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003;59:812-23.
- 23) Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011;38:191-208.

= 국문초록 =

## 섬유주세포에서 아데노신 A1 길항제에 의한 기질단백분해효소 2의 발현 조절

**목적:** 사람 섬유주세포에서 아데노신 A1 (adenosine A1) 길항제가 금속단백기질분해효소(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)의 발현과 조절에 미치는 영향에 대하여 알아보고자 하였다.

**대상과 방법:** 사람의 섬유주세포를 일차배양한 후 아데노신 A1 길항제인 0.1, 1.0  $\mu\text{M}$  N6-cyclohexyladenosine (CHA)에 2시간 노출시켰다. 이때 아데노신 A1 수용체 저해제인 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT)를 전처리하였다. 금속단백기질분해효소(MMP-2) mRNA의 발현 정도를 측정하였으며, tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)와 membrane-type-1 (MT1)-MMP의 단백 활성을 측정하였다. 또한 carboxyfluorescein을 이용하여 섬유주단층세포층의 투과도를 측정하였다.

**결과:** 1.0  $\mu\text{M}$  CHA는 섬유주단층세포층의 투과도를 농도에 비례하여 유의하게 증가시켰으며( $p=0.003$ ), 이는 CPT에 의해 억제되었다. 0.1  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  CHA는 MMP-2 mRNA의 발현을 증가시켰으며, 이러한 증가는 CPT에 의해 억제되었다(모두  $p<0.05$ ). CHA는 MMP-2의 활성을 증가시켰으며, TIMP2의 활성을 억제하였고 MT1-MMP 활성을 증가시켰다(모두  $p<0.05$ ).

**결론:** CHA는 섬유주 투과도를 증가시켰다. CHA는 MMP-2의 발현과 활성을 증가시켰으며 TIMP2의 활성을 억제하였고 MT1-MMP 활성을 증가시켰다. 따라서 아데노신 A1 길항제의 작용에서 TIMP2와 MT1-MMP의 활성 변화가 MMP-2의 활성 조절에 관여할 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2018;59(10):946-952〉

백민주 / Min Ju Baek

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

