

## 배양된 망막신경절세포주에서 허혈전처치와 Protein kinase C의 역할

나경두 · 강성용 · 성공제 · 홍사민 · 전미진 · 김찬윤

연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발연구소

**목적** : Staurosporin으로 분화시킨 retinal ganglion cell (RGC)-5 세포에서 허혈전처치의 산화스트레스에 대한 세포보호효과와 protein kinase C (PKC) 아형 발현과의 관계를 알아보고자 하였다.

**대상과 방법** : RGC-5를 in vitro로 배양하면서 Staurosporin 처리 농도와 시간을 바꾸어가면서 RGC-5를 형태학적으로 충분히 분화시키는 최소 농도와 시간을 결정하였다. 여기서 얻어진 조건으로 분화시킨 RGC-5 세포에 800  $\mu$ M 과산화수소수( $H_2O_2$ )를 15시간 처리하여 산화스트레스를 야기하여 세포독성을 일으켰다. 이때 0.3% 산소 허혈로 시간을 달리하면서 허혈전처치를 시행하여 허혈전처치의 산화스트레스에 대한 세포보호효과 특성을 알아보았다. 그리고 가장 보호 효과가 큰 허혈전처치를 시행한 후 시행전, 후 1시간, 2시간, 15시간 24시간 후의 PKC 아형 효소  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ 의 mRNA와 단백질의 변화를 관찰하였다.

**결과** : Staurosporin 처리 후 RGC-5의 축삭돌기가 증가하여 형태상 신경세포와 유사해지는 것을 관찰할 수 있었고, 이러한 변화가 충분히 일어나는 staurosporine의 최소 처리 농도와 처리 시간이 2  $\mu$ M, 1시간임을 확인하였다. 이후 800  $\mu$ M 과산화수소수를 이용한 산화스트레스를 가했을때 8시간의 허혈전처치 LDH assay에서 가장 큰 세포 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이때 허혈전처치 전후의 PKC 아형효소의 mRNA와 단백질 발현에서의 변화는 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ 에서 허혈전처치 2시간 후 허혈시행전에 비해 증가소견을 보였다.

**결론** : Staurosporin으로 분화시킨 RGC-5세포에서 허혈전처치가 산화스트레스에 대한 세포보호효과를 가짐을 확인할 수 있었고 이러한 허혈전처치 전후의 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$  아형효소 발현이 증가하는 것으로 미루어 허혈전처치의 세포보호효과가 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$  아형효소와 연관이 있을 가능성이 있음을 시사한다고 생각한다.

〈한안지 49(6):979-986, 2008〉

녹내장은 전 인구의 0.5~3%에서 발생하여 전세계적으로 9천만명가량의 환자가 있는 주요한 실명원인 중의 하나이다.<sup>1-4</sup> 안압의 상승은 녹내장의 발병과 관련이 있는 위험요인들 중에서 가장 자세히 알려진 요인이고 안압을 낮추면 시야 결손의 진행을 늦출 수 있다는 사실이 알려졌기 때문에, 지난 수십 년간의 녹내장 치료 및 연구는 주로 안압의 하강에 초점이 맞추어져 있었다.<sup>5,6</sup> 하지만 안압이 적절한 수준으로 떨어진 후에도 시야 손상이 계속 진행되는 환자들의 수가 있으며, 전

체 녹내장환자의 20~50%는 정상 범위의 안압을 유지하면서도 녹내장성 시야 손상이 진행되는 것이 알려져 있다.<sup>6,7</sup> 안압 이외의 다른 요인에 의해 진행되는 녹내장 환자들의 치료를 위해 최근에는 녹내장의 가장 주요한 병태생리학적 특징인 망막신경절세포층의 선택적이고 점진적인 손상을 방지하기 위한 신경보호 기전을 규명하는 데에 관심이 모아지고 있다. 신경 보호 기전에 대한 이해를 통하여 궁극적으로 신경을 직접 보호하는 약물을 개발하고자 하는 것이다.<sup>7,8</sup>

세포가 죽음에 까지 이르지 않는 약한 자극을 받게 되면 세포내의 여러 가지 방어기전이 활성화되어 연이어 가해지는 더 심한 자극에 내성을 가지는 특성을 가지고 있다고 알려져 있다. 이러한 현상이 저산소 상황에서 야기되는 것을 ischemic tolerance 또는 허혈 전처치(ischemic preconditioning)라고 부르는데 이러한 현상은 신경세포 등을 포함한 여러 가지 세포들에서 나타난다고 알려져 있다.<sup>9-15</sup> 마우스나 쥐를 사용한 녹내장 동물모델 실험에서도 다른 뇌신경세포와 마

〈접수일 : 2008년 5월 13일, 심사통과일 : 2008년 6월 5일〉

통신저자 : 김 찬 윤

서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 신촌세브란스병원 안과  
Tel: 02-2228-3570 Fax: 02-312-0541  
E-mail: kcyeye@yuhs.ac

\* 연세대학교 의과대학 2006년도 장기해외연수연구비의 지원을 받았음

찬가지로 약한 자극을 미리 가하면 연이어 주어지는 큰 자극 혹은 허혈에 의한 세포손상을 줄이는 허혈전처치의 효과가 망막 내에도 존재함이 알려져 왔다.<sup>16-18</sup> 중풍 후의 뇌손상을 감소시키는 새로운 치료방법을 개발하는 것과 마찬가지로, 동일하지는 않지만, 허혈이 손상의 큰 역할을 담당하는 뇌내장에서도 이러한 허혈전처치 기전을 이용한 치료방법을 개발하기 위한 일환으로 그 기전을 연구하는 노력이 있어왔다. 하지만 불행히도 망막시신경절세포의 허혈전처치의 기전에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.

조직이 허혈상태에 빠지게 되면 여러 가지 단백 활성 효소들과 신호전달체계에 변화가 일어나게 된다. 그러한 대표적인 것으로는 calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, mitogen activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), protein kinase B (Akt), 그리고 protein kinase C (PKC) 등이 알려져 있다.<sup>19-25</sup> 그 중에서도 PKC의 활성은 허혈 후 심장, 간, 신장, 뇌 등 여러조직에서 변화하는 것이 알려져 있다.<sup>20-24</sup> 그러나 PKC가 이러한 허혈 후 손상을 매개하는지 혹은 허혈 손상 후 단순히 이차적으로 나타나는 변화인지에 대해서는 아직도 이견이 있다. 또한 PKC는 10가지 가량의 아형이 존재하는데 이러한 아형 중 특히 PKC  $\epsilon$ 는 뇌신경세포의 허혈전처치현상에 관여한다고 알려져 있다.<sup>20-25</sup>

그래서 본 연구에서는 배양된 망막신경절세포<sup>26-28</sup>에서 저산소시 발생한다고 알려져 있는 허혈전처치를 분리된 망막신경절세포 단독배양에서 확인하고 이때 발생하는 허혈전처치와 여러 가지 protein kinase C (PKC) 아형들의 발현과 어떤 연관관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 대상과 방법

### RGC-5 세포 배양 및 분화(differentiation)

위의 망막신경절세포를 선택적으로 분리한 후 여기에  $\psi$ -virus를 감염시켜 망막시신경절세포의 특성은 유지하며 무한 증식하는 RGC-5세포주를 실험에 사용하였다.<sup>26-28</sup> 세포수는 6 well flask의 각 well에 80,000개씩을 분주하고 24시간동안 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Omega, Australia)을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Low Glucose 1 $\times$ , GIBCO, USA)에서 배양하였다. 그 후 단백질산화 효소 억제제의 하나인 staurosporine (staurosporine, Sigma, UK)을 투여하여 RGC-5

를 분화시켰다. 적절한 staurosporine의 농도와 처리 시간을 정하기 위해 0, 0.5, 1, 2  $\mu$ M의 4가지 농도를 1, 2, 6, 24시간 처리하고 RGC-5의 모양을 관찰하였다(Fig. 1). 그 결과 1  $\mu$ M농도와 2시간 처리시간이 최종 분화 정도에 이르는 최소농도와 시간임으로 판단되었다. 그래서 본 실험의 RGC-5세포의 분화는 모두 1  $\mu$ M staurosporine을 2시간 처리하였다.

### 허혈전처치(ischemic preconditioning)와 산화스트레스 유발

상기 방법으로 배양된 RGC-5세포에 대한 허혈전처치가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스에 대한 세포 보호 효과가 있는지 알아 보기 위해 O<sub>2</sub> 0.3%, H<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 89%의 기체조건을 가지는 저산소 배양기(Anaerobic chamber, Forma Scientific)에서 0, 2, 4, 6, 8, 15, 24시간 동안 허혈전처치를 시행하고 12시간 후 800  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 15시간 동안 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 세포생존은 LDH assay를 사용하여 평가 하였다.

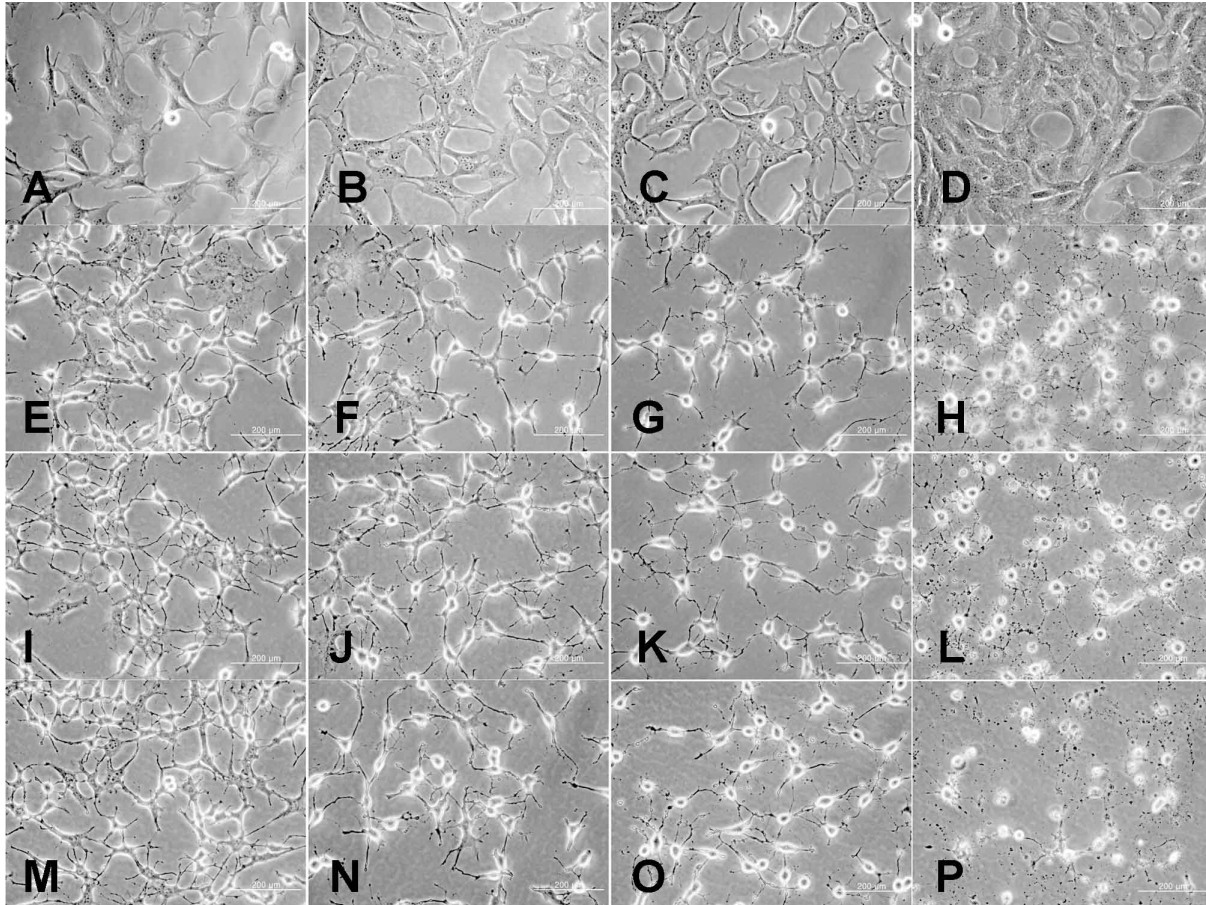
### LDH assay

망막신경절세포를 저산소 배양하면서 배양액으로 유리되는 LDH의 양을 colorimetric assay system (Calbiochem Novabiochem Corporation, USA)을 이용하여 측정 한 후, 전체세포를 deep freezing하여 사멸시킨 후 측정 한 LDH의 양과 비교하여 세포사멸의 정도를 평가하였다.

### 허혈전처치 후 PKC아형들의 mRNA, 단백질 발현변화

#### (1) Real-time PCR

허혈성 전처치 후 시간에 따른 PKC아형들의 mRNA 변화를 알아보기 위해 real-time PCR을 시행하였다. SuperScript. III First Strand Synthesis System for RT PCR (Invitrogen, USA)을 사용하여 제작자의 권장 메뉴얼에 따라 추출한 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 간략하게 서술하면 배양한 망막신경절세포를 trypsin을 사용하여 부양시킨 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 3 ng, 50  $\mu$ M oligo (dT) 2  $\mu$ L, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ L와 DEPC-treated water를 혼합하여 65°C에서 5분간 배양하고 여기에 10X RT buffer 2  $\mu$ L, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, 0.1 M DTT 2  $\mu$ L, RNaseOUT (40



**Figure 1.** The assessment of optimal level and duration in staurosporine treatment for differentiation of RGC-5: The shape of RGC-5 cell changes from fibroblast-like shape to neuron-like shape showing axon and multiple synapse with treatment of staurosporine. Staurosporine 1.0  $\mu\text{g}$  for 2 hours seemed to be the minimum duration and the level for the appropriate morphological differentiation.

Staurosporine 0  $\mu\text{g}$ : 1 hr (A), 2 hr (B), 6 hr (C), 24 hr (D); Staurosporine 0.5  $\mu\text{g}$ : 1 hr (E), 2 hr (F), 6 hr (G), 24 hr (H); Staurosporine 1.0  $\mu\text{g}$ : 1 hr (I), 2 hr (J), 6 hr (K), 24 hr (L); Staurosporine 2.0  $\mu\text{g}$ : 1 hr (M), 2 hr (N), 6 hr (O), 24 hr (P).

U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , SuperScript III RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 를 가하여 모두 혼합하였다. 그 후 50°C에서 50분간 배양하고 85°C에서 5분간 배양하여 cDNA를 합성한 후 1  $\mu\text{L}$ 의 RNase H를 넣어 남아있을 수 있는 RNA를 제거 하였다. Real-time PCR은 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Quiagen, USA)를 사용하여 혼합액을 만들어 시행하였다. 각 검체의 cDNA 100 ng, 2가지 20  $\mu\text{M}$  primers 1  $\mu\text{L}$ , master mix 25  $\mu\text{L}$ , DEPC treated water를 혼합하여 총 50  $\mu\text{L}$  혼합액을 만든 후 Biorad사의 cycler를 사용하여 반응시켰다. 사용한 primer sequence는 Table 1에 기재하였다. 반응시간과 온도를 다음과 같이하여 real-time PCR을 시행하였다. [5°C for 3 minutes, Cycle 2 (50 cycles: Step 1 : 95°C for 10 seconds, Step 2 : 55°C for 45 seconds, Data collection and real time analysis), Cycle 3:

95°C for 1minute, Cycle 4: 55°C for 1minute] 각 mRNA level은 reference house keeping gene으로  $\beta$ -actin을 사용하여 Ct 값을 기반으로  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

## (2) Western blot

SDS-PAGE는 10~15% SDS-polyacrylamide gel을 만들어서 각 well에 cell lysate 50  $\mu\text{g}$ 을 loading한다. 전기영동 후 Immobilon-P Transfer membrane (Millipore, USA)에 200 mA하에 2시간동안 electro transfer하였다. 3% BSA (AMRESCO #0332, USA)를 사용하여 비특이적 결합을 억제하였다. 그 후 1차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 배양한 후(Table 2), 2차 항체를 사용하였다. 1차 항체의 숙주동물에 따라 ECL TM peroxidase labelled anti rabbit (Amersham, USA) 혹은

**Table 1.** Primer sequences for real-time PCR (F=forward; R=reverse)

Gene name	Sequence
PKC $\alpha$	F 5'- ATG ACT TCA TGG GCT CCC TTT CCT -3' R 5'- ATT CAC CCT CCT CTT GGT TGA GCA -3'
PKC $\beta$	F 5'- CCA ACA AGT TGG CCG TTT CAA GGA -3' R 5'- TCA GGT CAC GGT AAA TGA TGC CCT -3'
PKC $\gamma$	F 5'- CAG CCT CCT CCA GAA GT -3' R 5'- TCA GAG ATA TGC AGG CGT -3'
PKC $\delta$	F 5'- CAA AGG CAG CTT TGG CAA GGT ACT -3' R 5'- ATC GTC GAT CAA CAC CAC GTC CTT -3'
PKC $\epsilon$	F 5'- AGG AAG GGA TTC TGA ATG GCG TGA -3' R 5'- AAG TCG TCC TCG TTG TCA GCT TCA -3'
PKC $\zeta$	F 5'- AGG CCT CAC ACG TCT TGA AAG GAT -3' R 5'- TCG GAA GAA GGC ATG GGA CTT GAT -3'
$\beta$ actin	F 5'- AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA -3' R 5'- ACC AGA GGC ATA CAG GGA CAA -3'

**Table 2.** Antibodies used in this study

Gene name	Company	Host animal	Size
PKC $\alpha$	abcam	Mouse	80.6 kDa
PKC $\beta$	abcam	Rabbit	80 kDa
PKC $\gamma$	abcam	Rabbit	84 kDa
PKC $\delta$	abcam	Rabbit	81kDa
PKC $\epsilon$	abcam	Mouse	88.4 kDa
PKC $\zeta$	abcam	Rabbit	71 kDa
$\beta$ -actin	Sigma	Mouse	42 kDa

ECL TM peroxidase labelled anti-mouse (Amersham, USA)을 사용하여 역시 1시간 동안 배양한 후 Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham, USA)를 사용하여 감광시켰다.

## 결 과

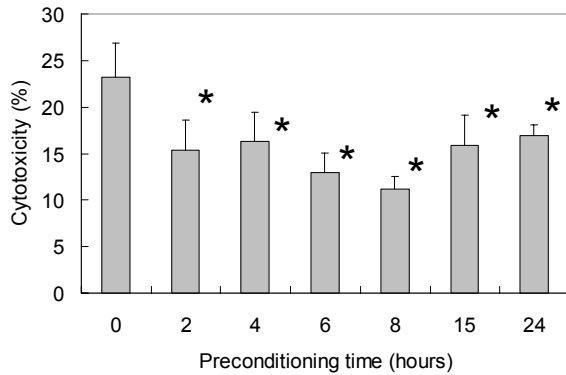
허혈전처치에 의한 망막신경절세포주에서의 세포 보호 효과

형질변환된 망막신경절세포주인 RGC-5 cell line을 사용하여 단독배양시 허혈전처치 발생을 확인하였다. 망막신경절세포주인 RGC-5는 좀 더 신경세포적인 특성을 갖도록 하기 위하여 staurosporine을 처리하여 분화시켰다. 분화를 위한 최적의 staurosporine의 농도와 시간은 세포모양을 보고 신경세포와 유사하게 여러 축삭을 보이는 최소시간과 농도로 결정하였다 (Fig. 1). Staurosporine 1.0  $\mu$ g에서 2시간 처리가 신경세포의 형태학적인 특성을 가지는 최소농도, 최소 처리시간임을 확인할 수 있었다. 허혈전처치는 0.3%

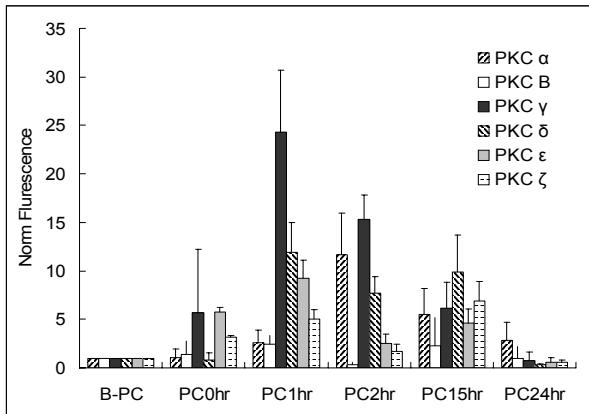
O<sub>2</sub>의 저산소 환경에서 0에서 24시간 동안 시간을 변화하면서 배양하여 발생시키고 15시간 동안 800  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하여 산화스트레스를 가하여 세포손상을 야기하였다. LDH assay를 시행하여 산화스트레스에 의한 망막신경절세포의 세포사멸의 정도를 평가하였다. 그 결과 허혈 전처치시 대조군에 비해 모두 생존이 증가하였고( $p < 0.05$  by Mann Whiteny U test), 2, 4, 15, 24시간의 허혈전처치에서의 세포보호효과에 있어서 6, 8시간의 허혈전처치에 비해서 보호효과가 적었다( $p < 0.05$  by Mann Whiteny U test), 통계적으로 유의한 차이를 보인 6, 8시간의 허혈전처치 중 8시간의 허혈전처치가 비록 통계적 유의성은 없었으나( $p > 0.05$  by Mann Whiteny U test) LDH assay에서 가장 적은 세포 독성을 보였다. 즉, 8시간의 허혈전처치가 가장 큰 세포보호효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

허혈전처치에 의한 망막신경절세포주의 세포효과시 PKC아형들의 발현변화

상기실험에서 확인한 최적의 허혈전처치인 8시간 0.3% O<sub>2</sub>의 저산소 환경처리 시 처치전과 처치 후 시간에 따른 PKC 아형( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ )의 mRNA와 단백질의 변화를 real time PCR과 Western blot으로 각각 확인하였다. 그 결과 mRNA에서는 PKC  $\beta$ 를 제외한 PKC들이 대체로 발현이 증가되었고 그 중 PKC  $\alpha$ 는 허혈전처치 2시간 이후부터 그리고 PKC  $\epsilon$ 는 허혈전처치 직후부터 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 단백질 발현의 변화는 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ 에서 변화가 두드러졌는데 PKC  $\epsilon$ 은 허혈전처치 직후부터 증가하고 2시간

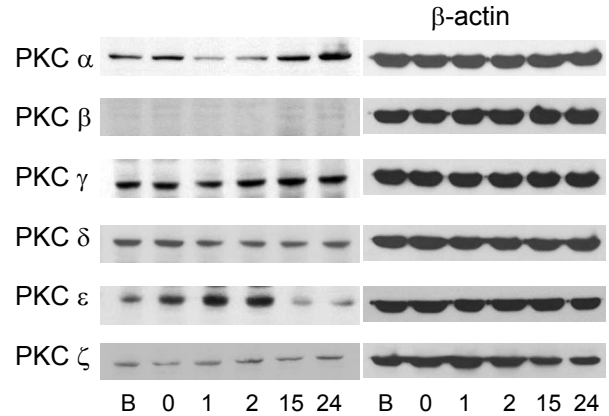


**Figure 2.** Cytotoxicity of ischemic preconditioning (0.3% oxygen state) against oxidative stress (800  $\mu$ M  $H_2O_2$  for 15 hr) in differentiated RGC-5 as demonstrated with LDH assay. With prolonged duration of ischemic preconditioning, RGC-5 survival increased up to 8 hrs of ischemic preconditioning after which cytotoxicity increased. Cytotoxicity after oxidative stress was statistically significantly decreased at 2 to 24 hours of ischemic preconditioning when compared to control (\*  $p < 0.05$  by Mann-Whitney U test).



**Figure 3.** Changes of PKC iso-enzyme mRNA before and after ischemic preconditioning (B-PC, before preconditioning; PC0hr, just after the preconditioning; PC1hr, 1 hour after preconditioning; PC2hr, 2 hours after preconditioning; PC15hr, 15 hours after preconditioning; PC24hr, 24 hours after preconditioning). We can see the elevation of level of PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  mRNA 1 or 2 hours after PC (preconditioning, 0.3% oxygen 8 hrs). The elevations are decreasing with time after PC.

이후 감소한데 반하여 PKC  $\alpha$ 는 15시간 이후 증가하는 양상을 보였다. 이러한 증가는 2시간 이후 PKC  $\alpha$ 의 mRNA가 증가하는 경향과 유사한 변화로 보였다 (Fig. 4). 하지만 mRNA에서 큰 변화를 보인 PKC  $\gamma$ 와  $\delta$ 는 단백질발현에서는 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3, 4).



**Figure 4.** Changes of PKC iso-enzyme protein before and after ischemic preconditioning (B, before preconditioning; 0, just after the preconditioning; 1, 1 hour after preconditioning; 2, 2 hours after preconditioning; 15, 15 hours after preconditioning; 24, 24 hours after preconditioning). PKC  $\epsilon$  increased until 2 hours after the preconditioning, and PKC  $\alpha$  increased from 15 hours after the preconditioning. These changes are relatively correlated with increasing tendency of mRNA.

## 고 찰

본 연구에서는 먼저 허혈전처치가 망막신경절세포 단독으로 일어나는지를 조사하여 보았다. 본 실험 결과 특수한 조건에서 분화된 망막신경절세포주는 허혈전처치시  $H_2O_2$ 를 이용한 산화스트레스에 대하여 세포보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 향후 허혈전처치 기전을 이용한 약제나 치료 수단 개발시 훌륭한 적용 모델이 될 수 있을 것으로 기대된다. 물론 이것이 vivo상태의 허혈전처치 기전이나 반응과 일치하지는 않을 수도 있다고 사료된다. 실제상태에서는 아교세포 등 여러 가지 다른 신경세포들과 공존하고 있기 때문에 허혈전처치가 존재하더라도 그 양상과 기전이 상이할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 본 연구의 목적은 방어기전의 이해와 이의 응용을 통한 새로운 치료수단의 개발이 궁극적인 목적이므로 그러한 방향을 위한 연구로 본 연구는 모델과 후보 방어기전의 탐색이라는 목표를 충족 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

실제 발견한 망막신경절세포주내의 허혈전처치 발생 후의 PKC아형의 발현을 살펴보면 대체로 기존의 중풍에서의 허혈발생시의 PKC아형들의 발현변화와 일치하는 결과를 보이는 것으로 사료된다. 허혈시 PKC  $\gamma$ 는 NMDA수용체를 활성화하고 PKC  $\delta$ 는 미토콘드리아에서의 cytochrome유출을 증가시켜 세포손상을 야기하는 방향으로 작용한다고 알려지고 있고 PKC  $\epsilon$ 는

NMDA수용체를 통한  $Ca^{2+}$  유입을 차단하고 ERK (extracellular signal-regulated kinase)를 통하여 미토콘드리아의 세포막을 안정화시키는 역할을 하여 세포손상을 차단하는 방향으로 작용한다고 알려져 있다.<sup>20-24</sup> 망막신경절세포만을 단독으로 이용한 이번 실험에서도 허혈전처치 후 이러한 PKC 아형들의 발현이 이전의 보고와 거의 유사하게 일어나 mRNA, 단백질 발현상 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ 가 증가가 두드러졌고 세포보호효과와 연관되는 PKC  $\epsilon$ 의 증가가 허혈전처치의 세포보호효과와 연관이 있을 수 있다는 것을 암시하는 결과로 사료된다. 오히려 세포손상을 야기하는데 관여하는 PKC  $\gamma$ 와  $\delta$ 는 mRNA상에서는 증가양상을 보였지만 단백질 상에서는 허혈전처치 전후에 큰 변화를 보이지 않았다. PKC  $\gamma$ 와  $\delta$ 의 단백질에 변화가 없었던 이유는 확실하지 않아 추가 연구가 필요할 것으로 사료되나, 결국 단백질발현의 변화가 없는 것으로 보아 PKC  $\gamma$ 와  $\delta$ 의 발현은 억제되어 보호효과가 한층 강화될 수 있음을 시사하는 결과라고 사료된다. 물론 이러한 결과는 시간적으로 PKC의 발현만 관찰한 것으로 이것이 직접적으로 허혈전처치의 결과인지 아니면 허혈전처치의 결과로 나타나는 다양한 양상의 일부인지, 또는 이차적인 현상인지 이 연구만으로는 확실하지 않다. 하지만 분화한 RGC-5 단독배양에서 허혈전처치가 세포보호효과가 있음을 확인하여 이것을 허혈전처치 연구에 이용할 수 있는 세포모형을 확립하였고, 기존의 다른 세포에서 허혈 후 나타나는 PKC아형효소의 변화와 유사한 결과를 망막신경절세포에서도 허혈전처치 후 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 PKC아형효소변화 중 세포보호효과에 관여한다고 알려지고 있는 PKC  $\epsilon$ 의 발현증가가 mRNA, 단백질 발현상 모두 확인되는 것으로 미루어 이것이 허혈전처치의 세포보호효과와 연관이 있음을 시사하는 결과라고 생각된다. 이러한 직접적인 연구는 siRNA 등을 사용하여 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 1) Goldberg I. How common is glaucoma worldwide? In: Weinreb RN, Kitazawa J, Krieglstein GK, eds. Glaucoma in the 21st Century. Landau, Germany: Mosby; 2000:1-8.
- 2) Giuffrè G, Giammanco R, Dardanoni G, Ponte F. Prevalence of glaucoma in a population, Acta Ophthalmol Scand 1995;73: 222-5.
- 3) Cedrone C, Culasso F, Cesareo M, et al. Prevalence of glaucoma in Ponza. Ophthalmic Epidemiol 1997;4:59-72.
- 4) Owsley C, McGwin G Jr, Ball K. Vision impairment, eye disease, and motor vehicle crashes in the elderly. Ophthalmic Epidemiol 1998;5:101-13.
- 5) The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. Am J Ophthalmol 2000;130:429-40.
- 6) Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group (CNTGSP). Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Am J Ophthalmol 1998;126:487-97.
- 7) Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. Am J Med 2003;114:697-8.
- 8) Flammer J, Haefliger IO, Orgül S, Resink T. Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucoma damage? J Glaucoma 1999;8:212-9.
- 9) Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18 to 20 month old gerbils long term survival with functional outcome measures. Stroke 1999;30:1240-6.
- 10) Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke 1998;29:705-18.
- 11) Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. Neurology 1997;48:306-11.
- 12) Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications (Review). Can J Anaesth 1998;45:670-82.
- 13) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. Brain Res 1990;528:21-4.
- 14) Paratt JR. Protection of the heart by ischemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological expression. Trends Pharmacol Sci 1994;15:19-25.
- 15) Barone FC, White RF, Spera PA, et al. Ischemic preconditioning and brain tolerance. Stroke 1998;29:1937-51.
- 16) Zhu Y, Ohlemiller KK, McMahan BK, et al. Constitutive nitric oxide synthase activity is required to trigger ischemic tolerance in mouse retina. Exp Eye Res 2006;82:153-63.
- 17) Ozbay D, Ozden S, Muftuoglu S, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on retinal ischemia reperfusion injury in rats. Can J Ophthalmol 2004;39:727-32.
- 18) Sakamoto K, Yonoki Y, Kuwagata M, et al. Histological protection against ischemia reperfusion injury by early ischemic preconditioning in rat retina. Brain Res 2004;1015: 154-60.
- 19) Matsumoto S, Shamloo M, Matsumoto E, et al. Protein kinase C-gamma and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha are persistently translocated to cell membranes of the rat brain during and after middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab 2004;24:54-61.
- 20) Speechly Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. Circ Res 1994;75:586-90.
- 21) Piccoletti R, Bendinelli P, Arienti D, Bernelli-Zazzera A. State and activity of protein kinase C in postischemic reperfused liver. Exp Mol Pathol 1992;56:219-28.

- 22) Padanilam BJ. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney Int* 2001;59:1789-97.
- 23) Tanaka C, Nishizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:551-67.
- 24) Chen L, Hahn H, Wu G, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11114-9.
- 25) Whitlock NA, Agarwal N, Ma JX, Crosson CE. Hsp27 upregulation by HIF 1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1092-8.
- 26) Charles I, Khalyfa A, Kumar DM, et al. Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1330-8.
- 27) Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:749-57.
- 28) Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:1-12.

**=ABSTRACT=**

## **Ischemic Preconditioning and the Role of Protein Kinase C in Cultured Retinal Ganglion Cell Line**

**Kyoung Doo Na, M.D., Sung Yong Kang, M.D., Gong Je Seong, M.D., Ph.D.,  
Samin Hong, M.D., Mi-Jin Chun, Ph.D., Chan Yun Kim, M.D., Ph.D.**

*Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine, The Institute of Vision Research, Seoul, Korea*

**Purpose:** To investigate the cellular protective effects of hypoxic preconditioning against oxidative stress in a staurosporine-differentiated RGC-5 cell line and the relevance of protein kinase C subtype expression.

**Methods:** The minimum staurosporine concentration and exposure time necessary to morphologically fully differentiate RGC-5 cells were determined. Cytotoxic injury was provided by oxidative stress with 800  $\mu$ M hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) for 15 hours to morphologically fully-differentiated cells. The cytoprotective effect of hypoxic preconditioning was found by exposing the cell line to 0.3% oxygen for different periods of time. Quantifiable changes in the expression of mRNAs and proteins of the isoenzymes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  of protein kinase C were determined before and after 1, 2, 15, and 24 hours of hypoxic preconditioning.

**Results:** Axonal growth in RGC-5 cells after the induction of differentiation with staurosporine caused these cells to resemble neurons. The minimal concentration and exposure time to staurosporine that evoked full differentiation of RGC-5 cells was exposure to 2  $\mu$ M staurosporine for 1 hour. An LDH assay demonstrated that hypoxic preconditioning had neuroprotective effects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. Protein and mRNA levels of PKC isoforms  $\alpha$  and  $\epsilon$  increased after preconditioning.

**Conclusions:** Hypoxic preconditioning of staurosporine-differentiated RGC-5 cells had a cytoprotective effect against oxidative stress. The associated increase of mRNA and proteins of PKC isoenzymes  $\alpha$  and  $\epsilon$  suggest some functional relevance of these isoenzymes to the cytoprotective effects conferred by hypoxic preconditioning.

J Korean Ophthalmol Soc 49(6):979-986, 2008

**Key Words:** Ischemic preconditioning, Oxidative stress, Protein kinase C, RGC-5

---

Address reprint requests to **Chan Yun Kim, M.D., Ph.D.**

Department of Ophthalmology, Severance Hospital, College of Medicine, Yonsei University

#134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: 82-2-2228-3570, Fax: 82-2-312-0541, E-mail: kcyeye@yuhs.ac