

섬유주세포에서 고농도 포도당이 활성산소종의 생성에 미치는 영향

배창범 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 고농도의 포도당이 섬유주세포에서 활성산소종의 생성에 미치는 영향에 대해서 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포를 일차배양한 후 저농도(5 mM)와 고농도(22 mM)의 포도당을 포함한 DMEM배지에서 각각 1주일간 배양한 후 섬유주세포의 증식에 미치는 영향을 MTT assay로, 일산화질소의 생성은 Griess assay로, 과산화수소의 생성은 o-Dianisidine dihydrochloride assay를 이용하여 각각 조사하였다. 이때 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 N-acetyl cysteine (NAC)에도 함께 노출시켰다.

결과: 고포도당은 섬유주세포의 증식을 증가시켰으며 NAC는 세포의 증식에 유의한 영향을 미치지 않았다. 저포도당에 비해 고포도당은 일산화질소의 생성과 과산화수소의 생성을 유의하게 증가시켰으며 이러한 활성산소종의 생성증가는 항산화제인 NAC에 의해 감소되었다.

결론: 고포도당에 노출된 섬유주세포는 활성산소종의 생성을 유의하게 증가시켰으며 이러한 산화스트레스는 항산화제에 의해 감소될 수 있을 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2010;51(3):418-422〉

원발개방각녹내장은 섬유주의 기능저하로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 안압이 상승하여 유발하는 것으로 알려져 있는데 섬유주를 구성하고 있는 섬유주세포는 방수유출의 조절에 능동적으로 관여한다고 한다.¹⁻³ 섬유주를 통한 방수유출을 조절함에 있어서 일산화질소(nitric oxide, NO)가 중요한 역할을 한다. 녹내장의 경우 NO의 생성저하에 의해 섬유주를 수축시켜 안압을 상승시킬 수 있으나, NO 또는 과산화수소 같은 활성산소가 과다하게 생성되면 산화스트레스에 의해 섬유주의 손상을 유발할 수 있을 것이다.⁴⁻⁸

자유유리기는 산화스트레스를 유발하여 인체의 노화를 유발하는 주요한 요인으로 알려져 있으며⁹ 녹내장의 경우에도 산화스트레스는 섬유주세포의 손상을 유발할 뿐만 아니라 섬유주세포의 노화를 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있고 안압상승과 시야손상의 정도가 섬유주에서의 산화스트레스에 의한 핵산의 손상 정도와 비례하는 것으로도 알려져 있다.¹⁰ 혈관내피세포의 경우 고농도의 포도당에 노출되면 NO의 생성이 저하되며¹¹ 산화스트레스가 유발되는 것

으로 알려져 있다.¹² 당뇨병이 있는 경우 녹내장이 발병할 위험이 높은 것으로 알려져 있고¹³ 당뇨병이 있는 환자의 방수에서의 포도당 농도가 정상인에 비해 약 2배 정도 높다고 보고되어 있다.¹⁴ 따라서 고농도의 포도당에 섬유주세포가 노출될 경우 섬유주세포의 정상적인 NO 생성에 영향을 미칠 수 있고 NO와 함께 활성산소종인 과산화수소를 생성하여 산화스트레스도 유발할 수 있을 것으로 생각해 볼 수 있으나 인체의 섬유주세포에 대하여 고포도당이 활성산소종의 생성에 미치는 영향에 관해서는 아직 연구되지 않았다.

본 연구에서는 인체의 섬유주세포에서 고농도의 포도당이 활성산소종의 일종인 NO와 과산화수소의 생성에 미치는 영향과 이에 대한 항산화제의 효과에 대해 알아보려고 하였다.

대상과 방법

세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 앞방각 주위 조직을 제거한 후 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, USA)와 15% 우태아혈청(Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지

■ 접 수 일: 2009년 5월 4일 ■ 심사통과일: 2009년 12월 9일

■ 책임저자: 김 재 우

대구시 남구 대명4동 3056-6
대구가톨릭대학교 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

(DMEM, Gibco, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나 온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대 배양하였다.

약물처리

배양접시의 각 well에 일차 배양한 섬유주세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 통상적인 세포배양액에 포함된 저농도의 포도당(저포도당, 5 mM)과 고농도의 포도당(고포도당, 22 mM)을 각각 포함한 DMEM배지에 1% 우태아혈청을 첨가하여 일주일간 배양하였다. 이때 삼투압의 영향을 알아보기 위하여 25 mM의 mannitol을 포함한 배지에도 배양하였다. 또한 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 50, 100 µM의 N-acetyl cysteine (NAC)에도 함께 노출시켰다.

MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 발색검사법의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay를¹⁵ 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를¹⁶ 이용하였다. MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well 당 100 µl씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well 당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 µl씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 3일 동안 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액을 섞은 후 96-well plate에 옮겨 NO 생성의 반응물인 아질산염의 양을 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

과산화수소의 생성 측정

고포도당이 활성산소종의 일종인 과산화수소의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 o-Dianisidine dihydro-

chloride (o-DD, Sigma D3252)를 이용한 발색반응으로 생성된 과산화수소의 농도를 조사하였다.^{17,18} 배양 1주일째에 무혈청 배지로 교환한 후 배지 100 µl에 2.5 unit/ml의 horseradish peroxidase와 250 mM o-DD를 처리하여 1시간 동안 배양한 후 470 nm에서 흡광도를 조사하여 단계적으로 과산화수소의 농도를 처리하여 구한 표준곡선과 비교하여 생성된 과산화수소의 농도를 구하였다.

실험약품과 통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05% 이하로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 10일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 특징적인 형태학적인 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{19,20}

고포도당이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

섬유주세포를 고포도당에 7일간 노출시켰을 때 저포도당에 노출한 대조군에 비하여 세포의 생존을 증가시켰으며 ($p < 0.05$) 삼투압의 영향을 배제하기 위해 20 mM의 mannitol에 노출한 경우에서 유의한 차이를 보이지 않아 본 실험에 사용된 약제에 의한 실험결과는 세포의 생존이나 삼투압의 변화에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 알 수 있었다(자료 생략). 또한 동시에 처리한 항산화제인 NAC는 이러한 고포도당에 의한 세포의 증식에 유의한 영향을 미치지 않아 고포도당에 의한 세포증식의 증가는 활성산소종의 생성과 무관함을 알 수 있었다(Fig. 1).

고포도당이 NO와 과산화수소의 생성에 미치는 영향

저포도당에 비해 고포도당은 섬유주세포에서 일산화질소의 생성과 과산화수소의 생성을 유의하게 증가시켰으며, 이러한 활성산소종의 생성증가는 항산화제인 NAC에 의해

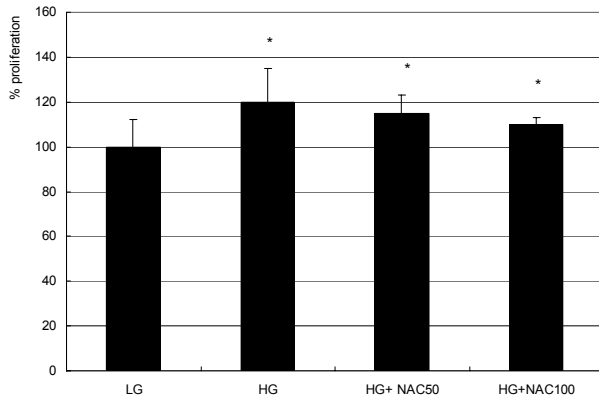


Figure 1. Effect of high glucose (HG) on the proliferation of human trabecular meshwork cells. HG increased cellular proliferation significantly compared to low glucose (LG) (* $p<0.05$). Co-exposed 50 or 100 μ M N-acetylcysteine (NAC) did not affect the HG-induced increased cellular proliferation.

상쇄되었다($p<0.05$) (Fig. 2, 3). 이러한 결과로 보아 섬유주세포가 고농도의 포도당에 노출될 경우 활성산소종인 NO와 과산화수소를 과다하게 생성시켜 섬유주세포의 산화스트레스를 유발할 수 있을 것이다.

고 찰

섬유주는 섬유주를 통한 방수유출을 능동적으로 조절하며 endothelin과 NO가 이에 관여한다고 알려져 있다.^{3,21} 인체의 섬유주세포에서 NO의 생성저하는 섬유주를 위축시켜 결과적으로 섬유주를 통한 방수유출을 저하시킬 뿐만 아니

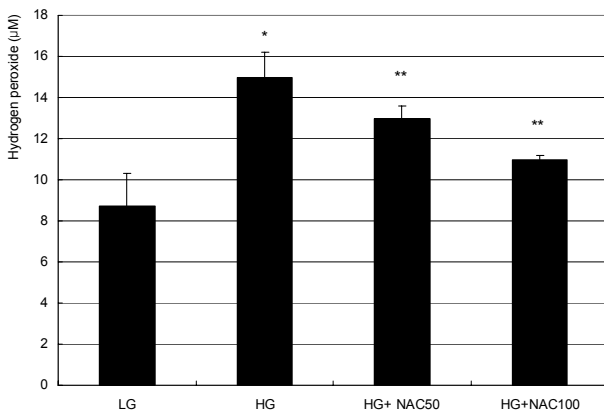


Figure 3. Effect of high glucose (HG) on the production of hydrogen peroxide of human trabecular meshwork cells. HG increased hydrogen peroxide production significantly compared to low glucose (LG) (* $p<0.05$), which was abolished by co-exposed 50 or 100 μ M N-acetylcysteine (NAC) (** $p<0.05$).

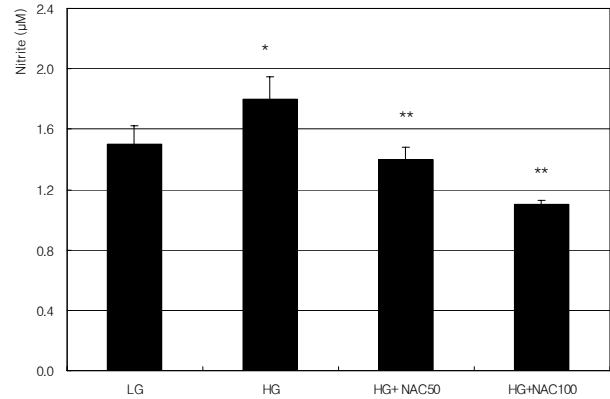


Figure 2. Effect of high glucose (HG) on the production of nitric oxide (NO) in primarily cultured human trabecular meshwork cells. HG increased NO production significantly compared to low glucose (LG) (* $p<0.05$), which was abolished by co-exposed 50 or 100 μ M N-acetylcysteine (NAC) (** $p<0.05$).

라 NO의 생리적 활성을 저하시켜 다양한 병적 결과를 초래할 수 있다. NO의 생리적 활성저하 뿐만 아니라 NO의 과다한 생성증가는 매우 유해한 peroxynitrite 같은 활성산소종의 생성을 증가시키게 되는데^{12,30} 섬유주에서 NO의 생성이 저하되면 섬유주를 수축시켜 방수유출을 감소시킴으로써 안압을 상승시킬 수 있지만, NO가 과다하게 생성될 경우에는 활성산소에 의한 산화스트레스를 유발하여 섬유주를 손상시킬 것이다.^{21,23-25}

고포도당은 망막의 혈관내피세포를 비롯한 다양한 종류의 세포에서 NO의 생성에 영향을 주어 산화스트레스를 유발한다고 하는데^{12,22} 섬유주세포에서도 NO 합성효소가 발현될 뿐만 아니라²⁶⁻²⁸ 글루코코르티코이드 수용체가 나타나므로²⁹ 고포도당에 노출될 경우 섬유주의 NO 생성을 증가시킬 가능성이 있다.

본 연구의 결과에서 고포도당은 활성산소종의 일종인 NO와 과산화수소의 생성을 유의하게 증가시켰는데 NO의 과다한 생성은 peroxynitrite같은 유해한 활성산소종을 생성할 것이다.¹² 이러한 활성산소종의 생성에 대해 항산화제를 함께 노출시켰을 때 자유유리기인 NO와 과산화수소의 생성이 감소하는 것으로 보아 항산화제가 고포도당에 의한 섬유주세포의 산화스트레스를 억제하여 섬유주를 보호할 수 있을 것이다. 활성산소종은 산화스트레스를 유발하여 섬유주세포의 손상을 유발할 뿐만 아니라 세포의 노화도 초래하는 것으로 알려져 있으므로³¹⁻³⁵ 섬유주에서의 NO 생성변화에 의해 산화스트레스가 지속될 경우 섬유주세포의 손상과 함께 섬유주세포의 변성을 유발하며 섬유주세포의 노화시킬 수 있을 것이다.^{10,36}

따라서 고포도당에 의해 장기간에 걸쳐 산화스트레스가

유발되면 섬유주세포가 손상되어 그 기능이 떨어짐으로써 섬유주를 통한 방수유출이 감소되어 결과적으로 녹내장을 유발하거나 악화시킬 수 있는 요인이 될 수 있을 것이다.^{21,37} 본 연구의 결과와 같이 고포도당은 섬유주세포에 산화스트레스를 유발하여 손상을 유발할 수 있고 장기적으로는 최종당화산물이 축적되어 세포의 노화와 세포고사를 유발할 가능성이 있다.^{9,10,21,38} 고포도당이 섬유주세포에 미치는 장기간의 영향에 대해서는 향후 좀 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 고포도당은 배양된 사람의 섬유주세포에 대해 활성산소종인 NO와 과산화수소의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발하여 섬유주세포의 손상과 기능저하를 초래할 수 있을 것이며, 항산화제를 사용함으로써 이러한 산화스트레스에 대해 섬유주세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 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.
- Alvarado JA, Alvarado RG, Yeh RF, et al. A new insight into the cellular regulation of aqueous outflow: how trabecular meshwork endothelial cells drive a mechanism that regulates the permeability of Schlemm's canal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:1500-5.
- Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and ocular outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
- Wang 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.
- Nathanson JA, McKee M. Alteration of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36: 1774-84.
- Matsuo T. Basal nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
- Saccà SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
- Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.
- Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:458-63.
- Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, et al. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:480-6.
- El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW, Caldwell RB. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3135-43.
- Becker B. Diabetes mellitus and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1971;1:1-16.
- Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humour glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 1984;39:605-9.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, et al. Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp Eye Res* 1999;68:765-72.
- Nowak D. Hydrogen peroxide release from human polymorphonuclear leukocytes measured with horseradish peroxidase and o-dianisidine. Effect of various stimulators and cytochalasin B. *Biomed Biochim Acta* 1990;49:353-62.
- 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.
- Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- Haeffliger IO, Dettmann E, Liu R, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43:S51-8.
- Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, et al. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998;47:945-52.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-95.
- Brüne B, Von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1765-73.
- Geyer O, Podos SM, Mittag T. Nitric oxide synthase activity in tissues of the bovine eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;35:786-93.
- Meyer P, Champion C, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res* 1999;18:375-80.
- Weinreb RN, Bloom E, Baxter JD, et al. Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:403-7.
- Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-20.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ*

- Res 2000;87:540-2.
- 32) 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.
- 33) Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:2417-26.
- 34) von Zglinick, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908:99-110.
- 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) Sato T, Roy S. Effect of high glucose on fibronectin expression and cell proliferation in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:170-5.
- 37) Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.
- 38) Wordinger RJ, Clark AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:629-67.

=ABSTRACT=

Effect of High Glucose on the Production of Reactive Oxygen Species in Trabecular Meshwork Cells

Chang Beum Bae, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

Purpose: To investigate the effect of high glucose concentration on the production of reactive oxygen species in cultured human trabecular meshwork cells (HTMCs).

Methods: Primarily cultured HTMCs were exposed to low glucose (5 mM) and high glucose (22 mM) concentrations, respectively, for seven days. Cellular survival, as well as nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide production, were assessed by measured MTT assay, Griess assay, and o-Dianisidine dihydrochloride assay, respectively. Some cells were co-exposed to N-acetyl cysteine (NAC) to assess the effect of this antioxidant.

Results: High glucose concentration increased the survival of cultured HTMCs significantly, with no effect from NAC. High glucose concentration increased the production of NO and hydrogen peroxide, which were abolished by co-exposure with NAC.

Conclusions: High glucose concentration increases the production of NO and hydrogen peroxide, which can be abolished by antioxidant in trabecular meshwork cells.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(3):418-422

Key Words: High glucose, Hydrogen peroxide, Nitric oxide, Reactive oxygen species, Trabecular meshwork cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

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