

## R28세포에서 고포도당이 반응성산소종의 생성에 미치는 영향

이종민 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

**목적:** 망막전구세포주인 R28세포에서 고포도당이 반응성산소종의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

**대상과 방법:** R28 수립세포주를 계대배양한 후 고농도(25 mM)와 저농도(5 mM)의 포도당이 포함된 배지에 각각 2일간 노출시켰다. 이때 항산화제인 50  $\mu$ M N-acetyl cysteine 또는 일산화질소 생성의 기질인 100  $\mu$ M L-arginine에 동시에 노출시켰다. 세포배양 과정에서 생성되는 일산화질소의 농도는 Griess assay로 측정하였으며, DCFH-DA와 modified cytochrome c assay로 반응성산소종과 superoxide의 생성량을 측정하였다.

**결과:** 고포도당은 저농도의 포도당에 비해 일산화질소, 반응성산소종, 그리고 superoxide의 생성을 유의하게 증가시켰으며, N-acetyl cysteine과 L-arginine은 고포도당에 의한 반응성산소종의 생성증가를 감소시켰다.

**결론:** 고포도당은 R28세포에서 반응성산소종의 생성을 증가시켰으며 항산화제에 의해 반응성산소종의 생성이 억제되었다. 따라서 고 포도당은 산화스트레스를 유발하여 망막신경절세포의 손상과 기능을 저하시킬 수 있을 것으로 생각된다.

(대한안과학회지 2010;51(5):746-750)

녹내장에서 손상받는 망막신경절세포가 글루탐산 등에 의한 세포고사에 의한다는 것이 알려진 이후 시신경보호를 위한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이를 위한 세포학적 수준에서의 연구재료로써 사람의 망막신경절세포의 일차배양이 이용되기도 하였으나,<sup>1</sup> 실제 망막신경절세포를 분리하여 유지하고 증식시키는 데 대단히 힘들어<sup>2</sup> 이의 대안으로 세포에 유전학적 기법을 도입하여 조작한 세포주를 이용한 연구가 행해지고 있다. 그 중 R28세포는 쥐의 망막세포에 아데노바이러스 E1A 유전자의 비종양형성부위인 12S를 이용하여 만든 세포주로서 망막의 구조와 기능적 분화의 연구에 많이 이용되고 있다.<sup>3-5</sup> R28세포는 망막의 각종 구성세포의 형질을 발현하며 망막에 이식해도 생존하는 것으로 알려져 있다. 또한 저산소증이나 혈청의 결핍에 대해 세포고사를 나타낼 뿐만 아니라<sup>6-8</sup> 글루탐산이나 GABA 수용체가 발현하며 흥분성 글루탐산에 의해 망막세포의 세포고사가 유발되고 일산화질소(nitric oxide, NO)는 글루탐산 등에 의한 흥분성 세포독성과 관련이 있는 것으로 알려져 있어 R28세포를 이용하여 세포고사와 세포독성에 관한 연구에 유용하게 사용되고 있다.<sup>9-12</sup>

자유유리기는 산화스트레스를 유발하는 주요한 요인으로 알려져 있으며,<sup>13</sup> 녹내장의 경우에도 산화스트레스는 세포의 손상을 유발할 뿐만 아니라 노화를 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있고<sup>14</sup> 시야손상의 정도가 산화스트레스에 의한 핵산의 손상 정도와 비례하는 것으로도 알려져 있다.<sup>15</sup> 혈관내피세포의 경우 고농도의 포도당에 노출되면 NO의 생성이 저하되며 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성이 증가하여 산화스트레스가 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17</sup> 당뇨병이 있는 경우 녹내장이 발병할 위험이 높은 것으로 알려져 있고<sup>18</sup> 당뇨병이 있는 환자의 방수에서의 포도당 농도가 정상인에 비해 약 2배 정도 높다고 보고되어 있다.<sup>19</sup> 따라서 고농도의 포도당에 망막신경절세포가 노출될 경우 정상적인 NO 생성과 ROS의 생성에 영향을 미쳐 산화스트레스를 유발할 수 있을 것이나 아직 자세한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 R28세포를 이용하여 고포도당이 ROS의 생성에 미치는 영향을 조사하여 산화스트레스를 유발하는지 알아보고자 하였다.

### 대상과 방법

■ 접 수 일: 2009년 6월 4일 ■ 심사통과일: 2010년 2월 17일

■ 책임저자: 김 재 우

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

### 세포배양

냉동보관된 R28 수립세포주(immortalized with the 12S, nontumorigenic portion of the adenovirus E1A gene from

P6 rat retinal tissue)를 해동 분주하여 DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) 배지에 10% 우태아혈청, 비필수아미노산과 비타민, sodium bicarbonate, L-glutamine, Gentamicin을 첨가하여 배양하였다. 세포가 배양접시에 증만해지면 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대 배양하였다.

## 약물처리

R28세포를 24-well plate에 옮겨 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 저농도(5 mM, low glucose, LG)와 고농도(25 mM, high glucose, HG)의 포도당을 각각 포함한 DMEM 배지를 이용하여 2일간 배양하였다. 이때 항산화제인 50  $\mu$ M N-acetylcysteine 또는 NO 합성의 기질로 작용하는 100  $\mu$ M L-arginine (Sigma, USA)을 각각 첨가하였다.

## MTT assay와 Griess assay

세포의 생존은 세포생존과 세포독성의 선별검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) assay를<sup>20</sup> 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를<sup>21</sup> 이용하였다. MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100  $\mu$ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염류용액(D-PBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, USA)으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200  $\mu$ l씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존정도는 실험군의 값을 LG에서만 배양된 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Griess reagent, Sigma, USA)를 섞은 후 96-well 배양접시에 옮겨 일산화질소 생성의 반응물인 아질산염의 양을 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

## Superoxide와 ROS의 생성 측정

과산화물인 superoxide의 측정은 cytochrome c 환원법을 변형한 microplate reader assay를 시행하여 측정하였다.<sup>30,31</sup> 96-well 배양접시에 세포를 부착시켜 저농도와 고농도의

포도당을 각각 포함한 배지에서 2일간 배양한 후 160  $\mu$ M의 cytochrome c (Sigma, USA)와 100 U/ml의 superoxide dismutase (Sigma, USA)를 혼합하여 반응용액을 만든 다음 반응액을 100  $\mu$ l씩 각 well에 넣어 20분간 노출시킨 후 60분간 540 nm의 흡광도에서 환원되는 cytochrome c의 양을 측정하였다.  $2.1 \times 10^4$  M/cm의 net extinction coefficient로  $10^6$ 개의 세포에서 환원되는 cytochrome c의 양을 nmol로 나타내어 시간당 값으로 환산하여 superoxide의 양을 nmol/ $10^6$  cell/h로 나타내었다.

ROS의 전반적인 생성을 알아보기 위하여 dichlorofluorescein diacetate assay를 시행하였다.<sup>32</sup> 96-well 배양접시에 세포를 부착시켜 저농도와 고농도의 포도당을 각각 포함한 배지에서 2일간 배양한 후 배지를 제거하고 D-PBS로 세척한 후 5  $\mu$ M의 dichlorofluorescein diacetate (Sigma, USA)을 넣어 30분간 배양한 다음 D-PBS로 씻어낸 후 산화된 dichlorofluorescein을 형광분석계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)를 이용하여 excitation 488 nm, emission 527 nm의 파장에서 60분간 형광도의 변화를 측정하였다.

## 통계 처리

세포배양 외에 실험에 사용된 약품은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 모든 실험에서 대조군은 LG에서만 배양된 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

# 결 과

## HG가 R28세포의 생존에 미치는 영향

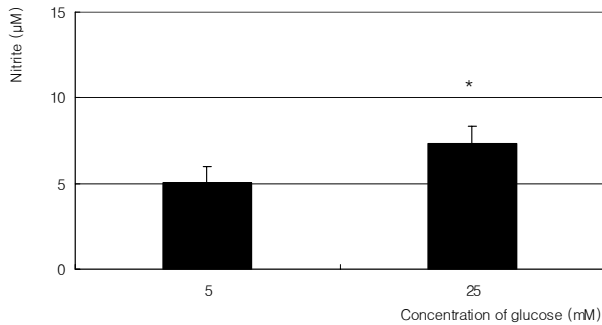
HG를 포함한 배지에서 2일간 배양하였을 때 LG를 포함하여 배양한 대조군에 비하여 세포의 생존율은 8.75% 증가하였다.

## HG가 NO의 생성에 미치는 영향

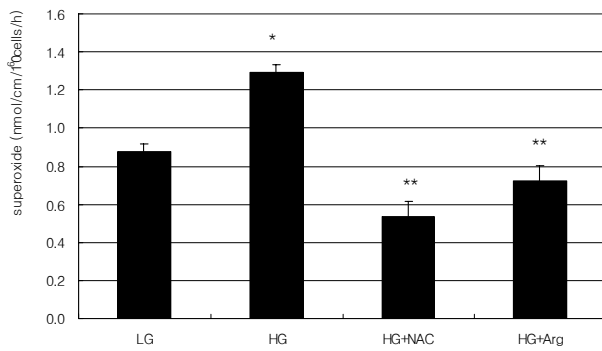
HG를 포함한 배지에서 2일간 배양하였을 때 LG를 포함하여 배양한 대조군에 비하여 5.015  $\mu$ M에서 7.336  $\mu$ M로 NO의 생성이 46%까지 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 1).

## HG가 superoxide와 ROS의 생성에 미치는 영향

HG는 LG에 비해 0.876에서 1.295로 superoxide의 생성



**Figure 1.** Effect of glucose on the production of nitric oxide in R28 cells. High glucose (25 mM) induced significantly more production of nitric oxide than low glucose (5 mM). (\* $p<0.05$ )

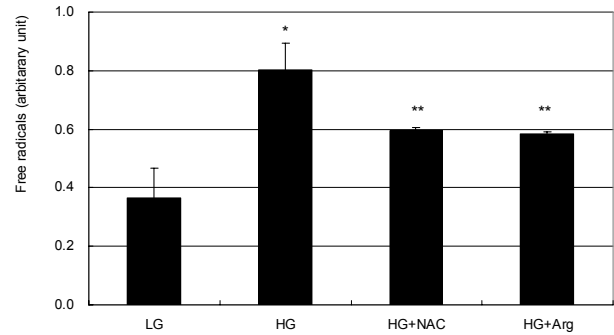


**Figure 2.** High glucose (HG, 25 mM) induced more production of superoxide than low glucose (LG, 5 mM) (\* $p<0.05$ ). HG-induced increased production of superoxide was abolished significantly by co-exposed N-acetyl cysteine (NAC) or L-arginine (Arg), respectively. (\*\* $p<0.05$ )

을 유의하게 증가시켰다( $p<0.05$ )(Fig. 2). HG에 의한 superoxide의 생성증가는 동시에 노출시킨 항산화제인 50  $\mu$ M N-acetyl cysteine과 NO 생성의 기질로 작용하는 100  $\mu$ M L-arginine에 의해 각각 0.533과 0.724로 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ ). 또한 전반적인 ROS의 생성을 나타내는 DCFH-DA assay의 결과에서도 HG는 LG에 비해 0.366에서 0.803으로 ROS의 생성을 유의하게 증가시켰으며 이러한 생성증가는 동시에 노출시킨 항산화제인 50  $\mu$ M N-acetyl cysteine과 NO 생성의 기질로 작용하는 100  $\mu$ M L-arginine에 의해 각각 0.533과 0.724로 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ )(Fig. 3).

## 고 찰

본 연구의 결과는 HG가 망막신경절세포에서 superoxide를 포함한 다양한 ROS의 생성을 증가시켜 산화스트레스를



**Figure 3.** High glucose (HG, 25 mM) induced more production of reactive oxygen species (ROS) than low glucose (LG, 5 mM) (\* $p>0.05$ ). HG-induced increased production of ROS was abolished significantly by co-exposed N-acetyl cysteine (NAC) or L-arginine (Arg), respectively. (\*\* $p<0.05$ )

유발할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

자유유리기인 NO는 저농도에서는 인체에서 중요한 생리적인 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발하기도 하며 NO가 세포의 생존에 미치는 영향은 세포의 종류에 따라 다르게 나타나는데 녹내장이 있는 경우에는 NO와 NO를 합성하는 조직의 이상이 나타난다고 알려져 있으며,<sup>25-27</sup> HG는 망막의 혈관내피세포를 비롯한 다양한 종류의 세포에서 NO의 생성에 영향을 주어 산화스트레스를 유발한다고 한다.<sup>28,29</sup> 따라서 망막신경절세포에서도 HG가 NO와 superoxide를 비롯한 ROS의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과에서 HG는 NO의 생성을 유의하게 증가시켰을 뿐만 아니라 ROS의 일종인 superoxide의 생성 증가와 함께 전반적인 ROS의 생성을 유의하게 증가시키는 것으로 보아 HG가 산화스트레스를 유발할 가능성이 있음을 알 수 있었다. 과도한 superoxide의 생성은 NO의 생리적 효과를 감소시키고 peroxynitrite 같은 산화물질을 생성시키는 것으로 알려져 있는데,<sup>30</sup> NO 합성 기질로 작용하는 L-arginine에 의해 superoxide와 ROS의 생성이 감소하는 것으로 보아 NO의 생성을 정상적인 생리적 수준으로 유지하는 것이 산화스트레스를 억제하는 데 중요하다는 것을 알 수 있으며, HG에 의한 superoxide와 ROS의 생성증가는 항산화제에 의해 억제되는 것으로 보아 항산화제가 산화스트레스를 감소시켜 망막신경절세포의 손상을 줄일 가능성이 있음을 알 수 있다.

본 실험에서 HG는 유의하지는 않았으나 세포의 증식을 어느 정도 증가시키는 것으로 보아 HG는 세포의 생존 자체에는 감소시키지 않았다. 그러나 세포의 증식에 미치는 영

향은 적은 데 비해 산화물질의 생성은 유의하게 증가시켰으므로 포도당의 농도를 높이는 것이 세포 자체에 이롭다고는 볼 수 없으며 HG가 세포의 생존과 대사에 미치는 영향은 향후 좀 더 장기간의 관찰이 필요할 것이다. 비록 본 연구에서는 HG에 장기간 노출시킬 경우 망막신경절세포에 미치는 영향을 알 수 없었으나 장기적으로는 HG에 노출될 경우 산화스트레스 뿐만 아니라 세포고사를 유발할 가능성이 있으므로,<sup>8,31,32</sup> HG가 망막신경절세포에 미치는 장기간의 영향에 대해서는 향후 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

결론적으로, HG는 망막신경절세포에서 NO와 super-oxide를 비롯한 ROS의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발할 가능성이 있음을 알 수 있었다. 항산화제를 사용함으로써 HG에 의한 산화스트레스에 대해 망막신경절세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Hu DN, Ritch R. Tissue culture of adult human retinal ganglion cells. *J Glaucoma* 1997;6:37-43.
- Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL. Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1988;1:791-803.
- Seigel GM. The golden age of retinal cell culture. *Mol Vis* 1999;5:4.
- Seigel GM, Mutchler AL, Imperato EL. Expression of glial markers in retinal precursor cell line. *Mol Vis* 1996;2:2.
- Seigel GM, Takahashi M, Adamus G, McDaniel T. Intraocular transplantation of E1A-immortalized retinal precursor cells. *Cell Transplant* 1998;7:559-66.
- Seigel GM, Chiu L, Paxhia A. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. *Mol Vis* 2000;6: 157-63.
- Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidyl 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of Caspases-3. *J Biol Chem* 2001; 276:32814-21.
- Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, et al. Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J Biol Chem* 2001;276:43748-55.
- Sun W, Seigel GM, Salvi RJ. Retinal precursor cells express functional ionotropic glutamate and GABA receptors. *Neuro Report* 2002; 13:2421-4.
- Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3444-50.
- Morgan J, Caprioli J, Koseki Y. Nitric oxide mediates excitotoxic and anoxic damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1524-9.
- Vorwerk CK, Hyman BT, Miller JW, et al. The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2038-44.
- Wei, YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.
- Sacca SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
- Sacca 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, Morrisshow 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 and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1971;1:1-16.
- Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humor 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, Glogoski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biologic fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-87.
- Teufelhofner O, Weiss R-M, Parzefall W, et al. Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide. *Toxicolol Sci* 2003;76:376-93.
- Joseph JA, Wang H. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-20.
- Seigel GM, Chiu L, Paxhia A. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. *Mol Vis* 2000;6: 157-63.
- Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidyl 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of Caspases-3. *J Biol Chem* 2001; 276:32814-21.

**=ABSTRACT=**

## **Effect of High Glucose on the Production of Reactive Oxygen Species in R28 Cells**

**Jong Min Lee, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD**

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

**Purpose:** To investigate the effect of high glucose (HG) on the production of reactive oxygen species (ROS) in retinal precursor R28 cells.

**Methods:** R28 cells were incubated with low glucose (5 mM) or HG (25 mM) for two days. Additionally, the cells were co-exposed to 50  $\mu$ M N-acetyl cysteine or 100  $\mu$ M L-arginine. Production of nitric oxide (NO), ROS, and superoxide were assessed by Griess assay, DCFH-DA assay, and modified cytochrome c assay, respectively.

**Results:** HG increased the production of NO, ROS, and superoxide, which were abolished by antioxidants NAC and L-arginine (a substrate for NO production).

**Conclusions:** HG increased ROS production in R28 cells. Thus, HG may cause cellular dysfunction and damage by inducing oxidative stress in retinal ganglion cells.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(5):746-750

**Key Words:** High glucose, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Retinal ganglion cells

---

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

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu College of Medicine

#3056-6 Daemyeung4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr