

망막색소상피세포에서 포도당이 반응성산소종의 생성에 미치는 영향

이재형 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 망막색소상피세포에서 고농도의 포도당이 반응성산소종의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 수립세포주인 ARPE-19세포를 고농도(25 mM)와 저농도(5 mM)의 포도당이 포함된 배지에 각각 3일간 노출시켰다. 이때 50 μ M N-acetyl cysteine, 100 μ M L-arginine에 동시에 노출시켰다. 일산화질소의 농도는 Griess assay로 측정하였으며, DCFH-DA와 modified cytochrome c assay로 반응성산소종과 superoxide의 생성량을 측정하였다.

결과: 고농도 포도당은 저농도 포도당에 비해 일산화질소와 반응성산소종, superoxide의 생성을 유의하게 증가시켰으며, 항산화제인 N-acetyl cysteine과 일산화질소 생성의 기질인 L-arginine은 고포도당에 의한 superoxide와 반응성산소종의 생성증가를 억제시켰다.

결론: 고포도당은 망막색소상피세포에서 반응성산소종의 생성을 증가시켰으며 항산화제에 의해 반응성산소종의 생성이 억제되었다. 따라서 고포도당은 산화스트레스를 유발하여 망막의 기능을 저하시킬 수 있을 것으로 생각된다.

(대한안과학회지 2010;51(2):276-281)

자유유리기는 산화스트레스를 유발하여 다양한 병인으로 작용한다. 녹내장의 경우 산화스트레스는 세포손상을 유발할 수 있으며,^{1,2} 시야손상의 정도가 산화스트레스에 의한 핵산의 손상 정도와 비례하는 것으로 알려졌다.³ 녹내장에서 글루탐산에 의해 망막신경절세포의 세포고사가 유발될 수 있는데, 이러한 세포손상 기전의 하나인 글루탐산 등에 의한 흥분성 세포독성에 일산화질소(nitric oxide, NO)가 관련이 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶ 안구 내에서 다양한 조직에 영향을 끼치는 NO는 세포의 종류와 농도에 따라 생리적인 매개체일 뿐만 아니라 병리적 역할을 나타냄으로써 세포고사를 유발하기도 한다.^{7,8} 혈관내피세포의 경우 고농도의 포도당에 노출되면 NO의 생성이 저하되며, 다양한 종류의 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 증가하여 산화스트레스가 유발되는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 또한 당뇨병이 있는 경우 녹내장이 발병할 위험이 높다는 보고도 있는데¹¹ 당뇨병 환자의 방수에서 포도당 농도가 정상인에 비해 약 2배 정도 높다고 하였다.¹²

망막색소상피세포는 망막의 광수용체와 맥락막 모세혈관 사이에 있는 세포로서 생리적으로 광수용체의 영양공급

과 대사물질의 배출 및 세포탈락물의 탐식 등 시력의 유지에 중요한 역할을 하며 산소의 소모량이 많아 산소유리기의 생성도 많은 것으로 알려져 있다.¹³ 이러한 망막색소상피의 산화적 손상은 연령관련성황반변성과도 밀접한 관련이 있다.¹⁴ 고농도의 포도당에 산소 소모량이 많은 망막색소상피세포가 노출될 경우 NO와 ROS의 생성에 영향을 미쳐 산화스트레스를 유발할 수 있을 것으로 생각되지만 이에 관한 연구는 없는 실정이다.

본 연구에서는 사람에서 유래하여 수립된 망막색소상피세포주의 일종인 ARPE-19 세포를 이용한 것으로¹⁵ 고농도의 포도당이 NO를 비롯한 ROS의 생성에 미치는 영향을 조사하여 산화스트레스를 유발하는 지, 그리고 이에 대해 항산화물이 어떤 영향을 미치는지 알아보았다.

대상과 방법

세포배양

수립된 망막색소상피세포주[ARPE-19: ATCC No. CRL-2302]를 penicillin, streptomycin, amphotericin B가 포함된 항생제(Gibco, USA)와 10% 우태아혈청(Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양접시에 충분해지면 10% 우태아혈청

■ 접수 일: 2009년 6월 10일 ■ 심사통과일: 2009년 10월 13일

■ 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

(Gibco, USA)을 포함한 배지로 1:4의 비율로 트립신 처리하여 계대 배양하였다.

약물처리

배양한 ARPE-19 세포를 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 DMEM배지를 이용하여 3일간 배양하였다. 이때 항산화제인 50 μ M N-acetyl cysteine과 NO 합성의 기질로 작용하는 100 μ M L-arginine (Sigma, USA)을 각각 첨가하여 동시에 배양하였다.

MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 선별검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) assay를¹⁶ 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를¹⁷ 이용하였다. MTT assay는 약물 처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ 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 μ l씩 옮겨 분광광도계 (FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)로 570 nm

에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 3일간 약물 처리해서 배양한 세포의 배지를 24-well plate에 옮긴 다음 동량의 Griess 반응액(Sigma, USA)를 섞은 후 96-well 배양접시에 각각 옮겨 배지에 생성된 일산화질소 반응물인 아질산염의 양을 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 상용의 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 표준직선식을 구한 다음 측정된 아질산염의 양을 표준치와 대조하여 정량하였다.

Superoxide와 ROS의 생성 측정

과산화물인 superoxide의 측정은 cytochrome c 환원법을 변형한 microplate reader assay를 시행하여 측정하였다.^{18,19} 96-well 배양접시에 세포를 부착시켜 저농도와 고농도의 포도당을 각각 포함한 배지에서 3일간 배양한 후 160 μ M의 cytochrome c (Sigma, USA)와 100 U/ml의 superoxide dismutase (Sigma, USA)를 혼합하여 반응용액을 만든 다음 반응액을 100 μ l씩 각 well에 넣어 20분간 노출시킨 후 60분간 540nm의 흡광도에서 환원되는 cytochrome c의 양을 측정하였다. 2.1×10^4 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 dichloro-fluorescein diacetate assay를 시행하였다.²⁰ 96-well 배양

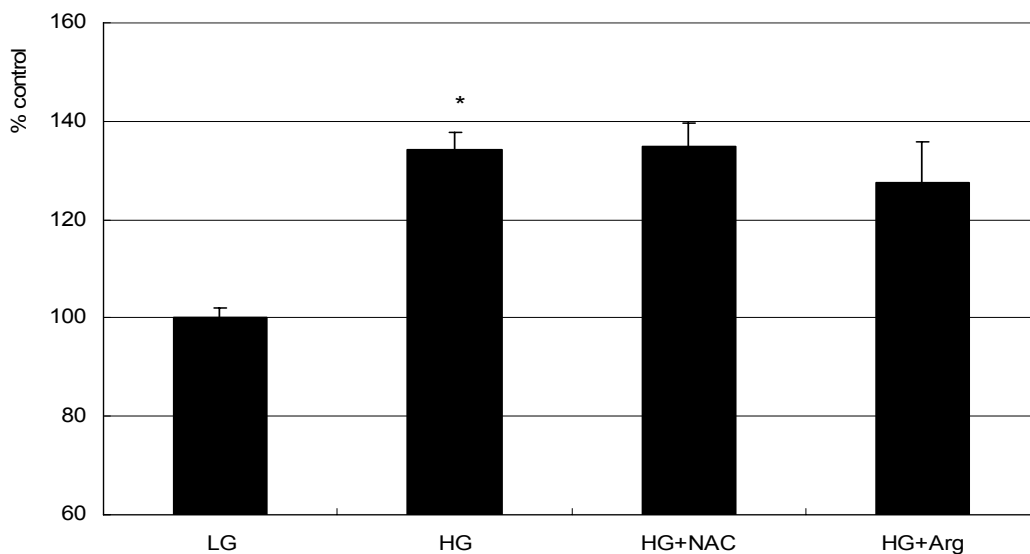


Figure 1. Effect of high glucose on the survival of ARPE-19 cells. High glucose (HG, 25 mM) increased cellular survival significantly compared with low glucose (LG, 5 mM) (* $p < 0.05$). Co-exposed 50 μ M N-acetyl cysteine (NAC) or 100 μ M L-arginine (L-Arg) did not affect the survival($p > 0.05$).

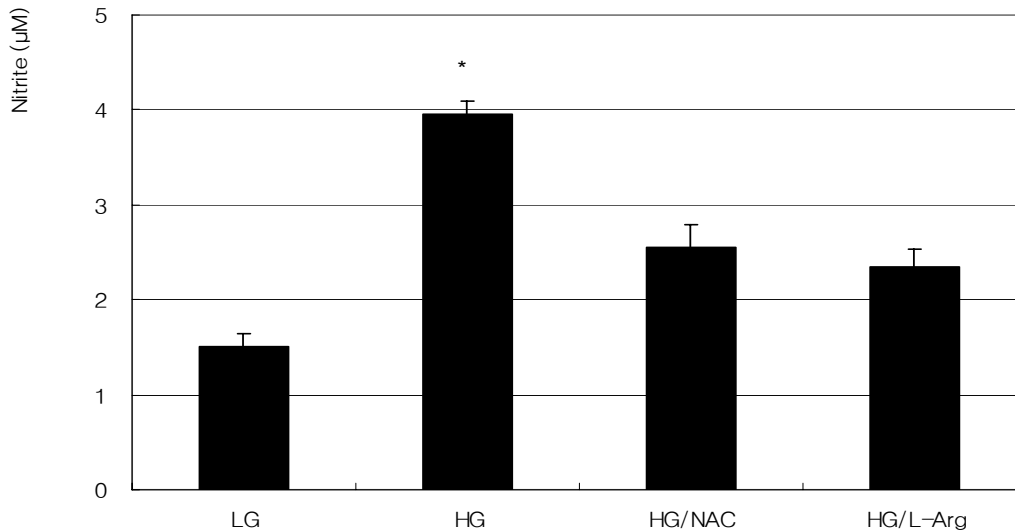


Figure 2. Effect of high glucose on the production of nitric oxide in ARPE-19 cells. High glucose (HG, 25 mM) increased nitric oxide production significantly compared with low glucose (LG, 5 mM) (* $p < 0.05$). Co-exposed 50 μ M N-acetyl cysteine (NAC) or 100 μ M L-arginine (L-Arg) did not affect the production of nitric oxide compared to HG alone ($p > 0.05$).

접시에 세포를 부착시켜 저농도와 고농도의 포도당을 각각 포함한 배지에서 3일간 배양한 후 배지를 제거하고 D-PBS로 세척한 후 5 μ 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

모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

HG가 ARPE-19세포의 생존에 미치는 영향

HG를 포함한 배지에서 3일간 배양하였을 때 LG를 포함하여 배양한 대조군에 비하여 세포의 생존은 34.2% 증가하였으며($p = 0.001$) HG에 동시에 투여한 N-acetyl cysteine과 L-arginine은 세포의 생존에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

HG가 NO의 생성에 미치는 영향

HG를 포함한 배지에서 3일간 배양하였을 때 LG를 포함하여 배양한 대조군에 비하여 NO의 생성이 유의하게 증가되었으나($p = 0.028$), HG에 동시에 투여한 50 μ M N-acetyl cysteine과 100 μ M L-arginine은 NO의 생성을 감소시키는 경향이 있었으나 통계학적으로 유의하게 영향을 미치지 않았다($p = 0.362, 0.255$)(Fig. 2).

HG가 superoxide와 ROS의 생성에 미치는 영향

HG는 LG에 비해 유의하게 superoxide의 생성을 증가시켰다($p = 0.001$). HG에 의한 superoxide의 생성증가는 HG에 동시에 노출시킨 항산화제인 50 μ M N-acetyl cysteine과 NO 생성의 기질로 작용하는 100 μ M L-arginine에 의해 유의하게 감소하였다($p = 0.001, 0.005$)(Fig. 3). 또한 전반적인 ROS의 생성을 나타내는 DCFH-DA assay의 결과에서 HG는 LG에 비해 유의하게 ROS의 생성을 증가시켰으며($p = 0.015$) 이러한 생성증가는 HG에 동시에 노출시킨 50 μ M N-acetyl cysteine과 100 μ M L-arginine에 의해 유의하게 감소하였다 ($p = 0.038, 0.009$)(Fig. 4).

고 찰

본 연구의 결과는 고농도의 포도당이 망막색소상피세포

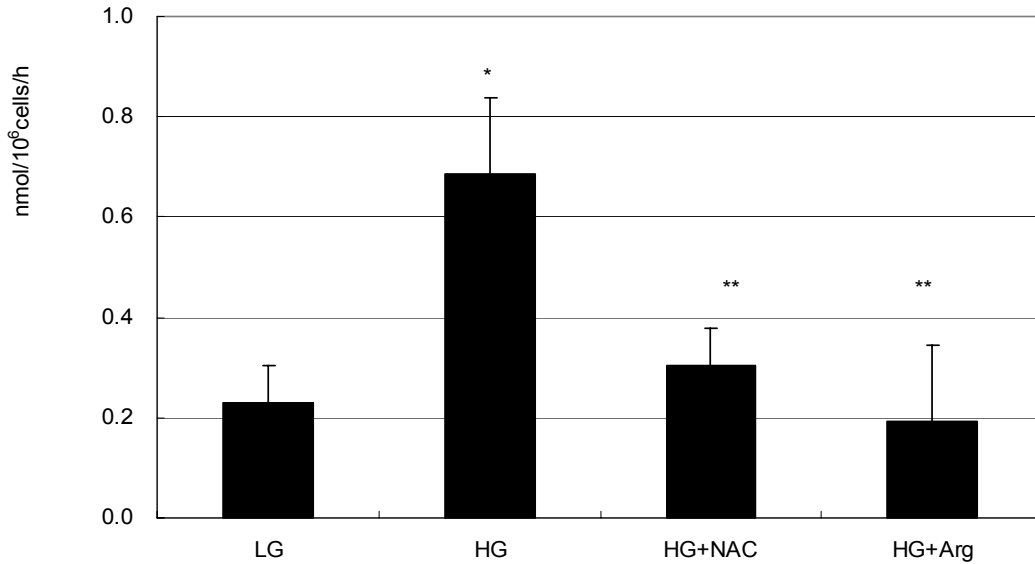


Figure 3. Effect of high glucose on the production of superoxide in ARPE-19 cells. High glucose (HG, 25 mM) increased superoxide production significantly compared with low glucose (LG, 5 mM) (* $p<0.05$). HG-induced increased production of superoxide was abolished by co-exposed 50 μ M N-acetyl cysteine (NAC) or 100 μ M L-arginine (L-Arg), respectively (** $p<0.05$).

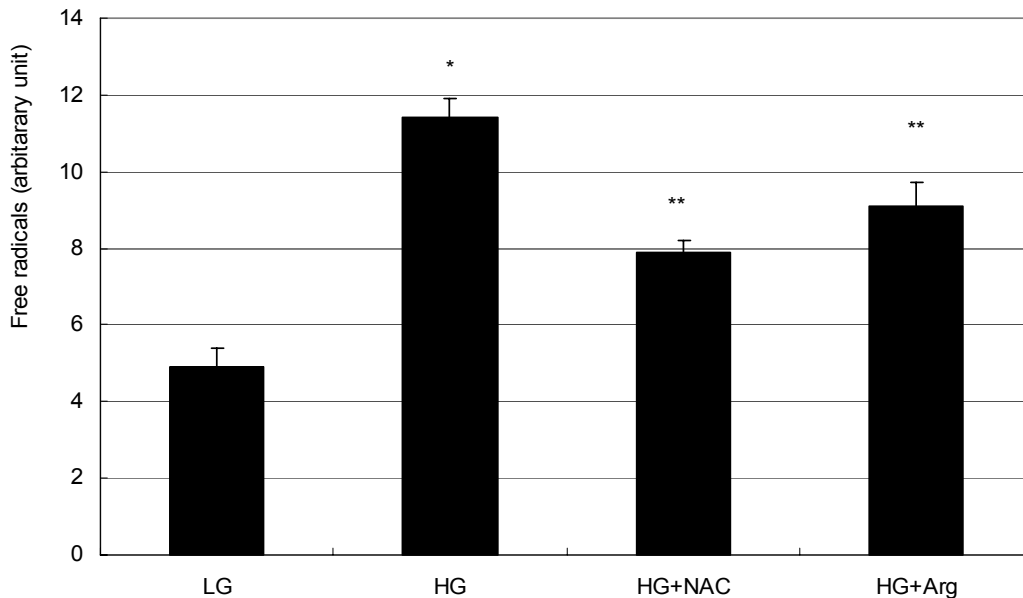


Figure 4. Effect of high glucose on the production of reactive oxygen species (ROS) in ARPE-19 cells. High glucose (HG, 25 mM) increased ROS production significantly compared with low glucose (LG, 5 mM) (* $p<0.05$). HG-induced increased production of ROS was abolished by co-exposed 50 μ M N-acetyl cysteine (NAC) or 100 μ M L-arginine (L-Arg), respectively (** $p<0.05$).

에서 superoxide를 포함한 다양한 ROS의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발할 가능성이 있다는 것을 보여주고 있다.

NO는 자유유리기로서 안구 내 다양한 조직에서 발견되며 저농도에서는 중요한 생리적 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성산소종을 생성하여 세포에 병적인 손상을

을 유발하기도 한다.^{21,22} 또한 고농도의 포도당은 망막의 혈관내피세포를 비롯한 다양한 종류의 세포에서 NO의 생성에 영향을 주어 산화스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다.²³ 맥락막혈관에서 시신경세포에 산소와 영양성분의 교환과 대사에 중요한 역할을 하는 망막색소상피세포는 산

소소비량이 많으므로 그에 따른 superoxide를 비롯한 ROS의 생성이 많은 상태일 것인데 만일 다른 요인에 의해 ROS의 생성이 생리적 방어 수단 보다 더 촉진되어 생성된다면 산화스트레스를 유발할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과에서 망막색소상피세포가 고농도의 포도당에 노출될 경우 NO의 생성이 유의하게 증가될 뿐만 아니라 ROS의 일종인 superoxide의 생성과 전반적인 ROS의 생성도 유의하게 증가되는 것으로 보아 고농도의 포도당은 망막색소상피세포에서 산화스트레스를 유발할 수 있음을 의미한다. 이러한 과다한 ROS의 생성은 망막색소상피세포 자체뿐만 아니라 주변의 망막신경세포에도 해로운 영향을 끼칠 수 있을 것이다.

고농도의 포도당에 의한 ROS의 생성증가는 NO 합성을 위한 기질물질로 작용하는 L-arginine에 의해 감소하는 것으로 보아 NO의 생성과 대사과정을 정상적인 생리적 수준으로 유지하는 것이 자유유리기의 생성을 감소시킴으로써 산화스트레스를 억제하는 데 중요한 역할을 하고 있으며, 항산화제인 N-acetyl cysteine에 의해 ROS의 생성이 감소하는 것을 보아 항산화제가 산화스트레스를 감소시켜 손상을 줄일 가능성이 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 망막색소상피세포가 고농도의 포도당에 장기간 노출될 경우에 미치는 영향을 알 수 없었다. 그러나 망막신경세포에서 고농도의 포도당에 노출될 경우 산화스트레스와 세포고사를 유발하며 이에 대한 신경세포보호를 위한 연구가 보고되고 있으므로,²⁴⁻²⁶ 고농도의 포도당이 망막색소상피세포에 미치는 장기간의 영향에 대한 연구가 필요할 것이다. 그리고 향후 생체 내 실험을 통하여 고농도의 포도당이 망막색소상피세포에 미치는 구조적, 기능적 변화와 주변 신경세포에 미치는 영향에 대한 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 고농도의 포도당은 망막색소상피세포에서 NO와 superoxide를 비롯한 ROS의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발할 가능성이 있음을 알 수 있었으며, 이에 대해 NO의 생성을 유지하거나 항산화제를 사용함으로써 고농도의 포도당에 의해 유발되는 산화스트레스에 대해 망막신경세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.
- 2) Sacca SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
- 3) 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.
- 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Park GS, Kwon NS, Kim YM, Kim JC. The role of nitric oxide in ocular surface diseases. *Korean J Ophthalmol* 2001;15:59-66.
- 8) Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: Multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* 1997;42:71-82.
- 9) Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, et al. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:480-6.
- 10) 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.
- 11) Becker B. Diabetes and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1971;1:1-16.
- 12) 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.
- 13) Schraermeyer U, Heiman K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res* 1999;12:219-36.
- 14) Proctor PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phy Med NMR* 1984;16:175-95.
- 15) Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 1996;62:155-69.
- 16) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 17) Green LC, Wagner DA, Glogoski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biologic fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 18) Beauchamp C, Fridovich L. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-87.
- 19) Teufelhofer 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. *Toxicol Sci* 2003;76:376-93.
- 20) Joseph JA, Wang H. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-16.
- 21) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- 22) Kim KO, Yoon TJ, Choi GJ. Induction of angiogenic cytokines in cultured RPE by oxidative stress. *J Korean Ophthalmol Soc* 2004;45:1742-9.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.

=ABSTRACT=

Effect of Glucose on the Production of Reactive Oxygen Species in Retinal Pigment Epithelial Cells

Jae Hyung Lee, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

Purpose: To investigate the effect of high glucose (HG) on the production of reactive oxygen species (ROS) in retinal pigment epithelial (RPE) cells.

Methods: ARPE-19 cells were exposed to low glucose (5 mM) and high glucose (HG, 25 mM) for three days. Additionally, 50 μ M N-acetyl cysteine (NAC) and 100 μ M L-arginine were co-exposed. Productions of nitric oxide (NO), ROS, and superoxide were determined by Griess assay, DCFH-DA assay, and modified cytochrome c assay, respectively.

Results: HG increased production of NO, ROS, and superoxide. HG-induced cells increased production of superoxide and ROS but were suppressed by NAC and L-arginine (substrate for NO production) as an antioxidant.

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

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(2):276-281

Key Words: High glucose, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Retinal pigment epithelial cells

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

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

#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