

## Genistein이 섬유주세포의 생존과 일산화질소의 생성에 미치는 영향

홍정흠 · 김윤영 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

**목적:** Genistein이 섬유주세포의 생존과 일산화질소의 생성에 미치는 영향에 대해서 알아보고자 하였다.

**대상과 방법:** 섬유주세포를 일차배양한 후 혈청이 결핍된 배지를 이용하여 0, 1, 10  $\mu\text{M}$ 의 genistein으로 처리한 후 10분, 1일에 Griess assay와 RT-PCR을 이용하여 일산화질소의 생성과 eNOS의 활성을 각각 측정하였으며, 1일째에 MTT assay를 이용하여 세포의 생존을 조사하였다.

**결과:** Genistein은 노출 후 10분 후에 10  $\mu\text{M}$ 에서, 1일째에 1  $\mu\text{M}$ 에서 각각 일산화질소의 생성증가시켰다. 또한 Genistein은 eNOS의 활성을 증가시켰으며, 1일째에 세포의 생존을 유의하게 증가시켰다.

**결론:** Genistein은 혈청 결핍상태에서 단기간과 장기간에 일산화질소의 생성을 촉진시키면서 섬유주세포의 생존을 증가시키는 효과를 나타내었다.

(대한안과학회지 2011;52(8):970-974)

섬유주세포는 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 개방각녹내장을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 따라서 섬유주세포를 보호하여 그 기능을 유지 또는 회복할 수 있다면 섬유주를 통한 방수유출을 조절하는 데 많은 도움이 될 것이다. 자유유리기인 일산화질소(nitric oxide, NO)는 세포의 종류에 따라 세포의 생존에 다양한 역할을 나타낼 수 있으며, 평활근 이완효과도 나타내는 것으로 알려져 있다.

섬유주세포는 형태학적 연구와 전기생리학적 연구에서 평활근과 유사한 성질을 가진 것으로 알려져 있으며<sup>3,4</sup> NO는 섬유주를 이완시킴으로써 섬유주를 통한 방수유출을 촉진하는 것으로 이미 잘 알려져 있다.<sup>5,6</sup>

Genistein은 tyrosine-kinase 억제제로서 수축된 섬유주를 이완시키는 효과가 있으며<sup>7</sup> 혈관내피세포의 경우 NO의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 따라서 genistein이 섬유주세포에 대해 NO의 생성을 촉진시켜 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 가능성이 있으나 인체의 섬유주세포의 경우

genistein이 NO의 생성에 미치는 영향과 세포의 생존에 미치는 영향은 아직 자세히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 genistein에 단시간과 장시간에 노출시킨 후 섬유주세포에서의 일산화질소 생성에 미치는 영향을 알아보고, 혈청결핍 상태에서 섬유주세포의 생존에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

### 대상과 방법

#### 세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구로부터 전방각 주위 조직을 제거한 후 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, St Louis, MO, USA)로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 층만해지면 10% 우태아혈청(Gibco)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

■ 접수 일: 2011년 2월 10일 ■ 심사통과일: 2011년 3월 15일  
■ 게재허가일: 2011년 5월 31일

■ 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

\* 이 연구는 2010년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

## 약물처리

24 well 배양접시에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 각 well에 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 이용하여 0, 1, 10  $\mu\text{M}$ 의 genistein (Sigma)에 노출시켰다.

## MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포증식과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 colorimetric test의 일종인 MTT (3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay를<sup>9,10</sup> 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를<sup>11</sup> 이용하였다. MTT assay는 하룻 동안 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100  $\mu\text{l}$  씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 PBS로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma)를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200  $\mu\text{l}$ 씩 옮겨 Spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Lantech, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

Griess assay는 단시간 효과를 알아보기 위해 10분간, 장시간 효과를 알아보기 위해 하룻동안 각 농도의 genistein에 노출시킨 후 세포의 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

## RT-PCR for eNOS

Genistein이 NO를 합성하는 eNOS의 발현에 미치는 영향을 알기 위해 eNOS 억제제인 0.5 mM N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, Sigma)를 동시에 노출시켜 RT-PCR을 시행하였다. Genistein에 노출시킨 섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA에서 eNOS 발현을 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 분리된 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation Mix를 70°C에 5분간 denaturation 시키고 ice에 5분간 둔 다음 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 70°C 10분간 반응시켜 cDNA로 합성하

였다. 합성한 cDNA에 2XGoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA)와 10 pmol의 forward primer (ctg gct ttc cct tcc agt tc, 225 bp), reverse primer (cct tcc aga tta agg cgg ac, 225 bp)를 각각 혼합하여 DNAEngine cyclor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분, 94°C 30초, 54°C 30초, 72°C 30초로 총 30 cycles를 시행한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

## 통계적 처리

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

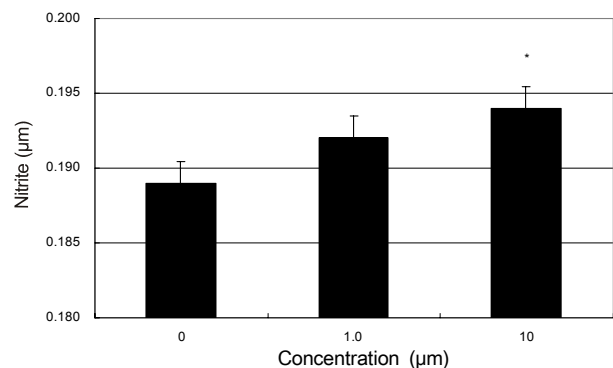
## 결 과

### 세포배양

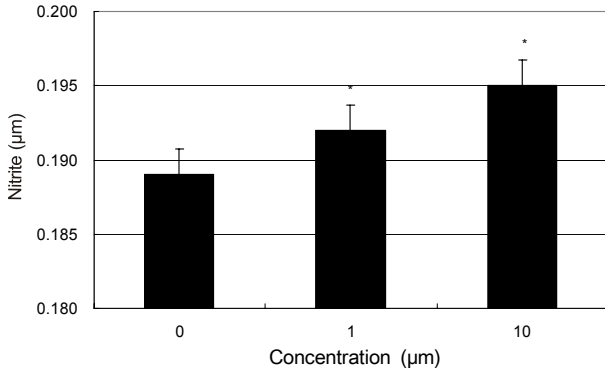
초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주 세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.<sup>12,13</sup>

### Genistein이 NO의 생성에 미치는 영향

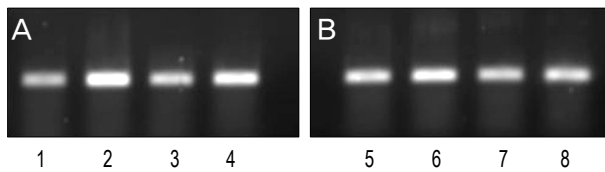
Genistein은 무혈청 상태에서 10분간 노출시켰을 때 10



**Figure 1.** Effect of genistein on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells after exposure for 10 minutes (\**p* < 0.05).



**Figure 2.** Effect of genistein on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells after exposure for 1 day (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Effect of genistein on the activity of eNOS. Genistein activated eNOS after 10 min (A) and 1 day exposures (B). Lane 1, 5 for control, lane 2, 6 for 0.1 μM, lane, 3, 7: for 0.1 μM + L-NAME, lane 4, 8 for 1 μM.

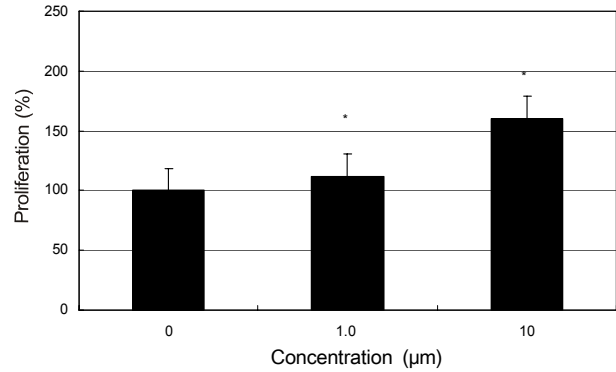
μM의 농도에서 배지에서의 nitrite 생성을 통계학적으로 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 또한 genistein을 무혈청 상태에서 하룻동안 노출시켰을 때는 1 μM의 농도에서부터 통계학적으로 유의하게 nitrite 생성을 증가시켰다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). 따라서 genistein은 단시간과 장시간 노출시킨 경우 모두 NO의 생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

#### Genistein이 eNOS의 활성화에 미치는 영향

Genistein은 10분간 노출시켰을 때 0.1 μM의 농도에서 eNOS의 활성을 증가시켰으며 이는 NOS 억제제인 0.5 mM L-NAME에 의해 억제되었다(Fig. 3). 따라서 genistein은 단시간에 NO의 생성을 증가시키며 이는 eNOS 억제제인 L-NAME에 의해 활성이 억제되는 것으로 보아 NO의 생성증가는 eNOS의 활성화에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

#### Genistein이 섬유주세포의 증식에 미치는 영향

Genistein을 혈청이 결핍된 상태에서 하룻동안 섬유주세포에 노출시켰을 때 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 1 μM의 농도에서부터 농도에 비례하여 세포의 생존을 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ) (Fig. 4). 따라서 genistein



**Figure 4.** Effect of genistein on the survival of trabecular meshwork cells after exposure for 1 days (\* $p < 0.05$ ).

은 혈청이 결핍된 상태에서 NO의 생성증가와 함께 섬유주세포의 생존을 유의하게 증가시킴을 알 수 있었다.

## 고 찰

본 연구의 결과는 사람의 섬유주세포에 대해 genistein은 NO의 생성을 증가시키며 세포의 생존을 촉진할 수 있음을 보여주고 있다.

Genistein은 콩에서 추출되는 자연산 isoflavonoid로서 tyrosine kinase 억제효과 뿐만 아니라 항산화작용 등의 다양한 작용을 나타낸다.<sup>14-17</sup> 그중 하나로 genistein은 NO의 생성을 촉진하는 작용이 있는데, 노출 후 NO합성효소의 작용을 활성화시켜 단시간 내에 NO의 생성을 증가시킬 수 있고 또한 NO합성효소의 합성을 증가시켜 장시간에 걸쳐 NO의 생성을 증가시킬 수 있다.<sup>8,18</sup>

본 연구의 결과 genistein은 10분간 노출 후에 NO의 생성을 증가시켰으며 하룻동안 노출시킨 경우에도 NO의 생성을 증가시켰으므로 비록 자세한 기전은 연구되지 않았으나 인체의 섬유주세포에서도 다른 세포의 경우와 마찬가지로 단시간과 장시간에 모두 NO의 생성을 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 genistein은 NO의 생성 증가에 의해 섬유주를 이완시켜 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었으나 genistein은 NO의 생성 증가에 의한 섬유주의 이완뿐만 아니라 tyrosine kinase 억제제로써 또 다른 기전에<sup>19</sup> 의해서도 섬유주를 이완시킬 수 있다는 점을 고려해야 할 것이다. 이러한 여러 가지 작용의 결과로 tyrosine kinase 억제제인 genistein은 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진시킬 가능성이 매우 높을 것으로 생각한다.

NO는 저농도에서는 인체에서 중요한 생리적인 조절인자로 작용하지만 고농도에서는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발하기도 한다. 본 연구의 결과에

서 genistein은 혈청결핍의 상태에서 NO의 생성증가와 동반하여 세포의 생존을 보호하는 작용을 나타내었는데 이러한 작용이 NO의 생성증가에 의해 촉진되었는지는 불확실하다. NO이 세포의 생존을 보호하는 작용을 나타내었을 수도 있고 다른 기전의 하나로 산화스트레스에 대해 항산화 작용을 나타내어 세포보호효과를 나타내었을 가능성도 있으며<sup>20</sup> NO의 생성촉진은 세포노화를 방지하는 효과도 있으므로 이에 대한 기전은 향후 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.<sup>21,22</sup> 또한 genistein은 섬유주 이완효과와 함께 망막의 혈액순환을 촉진할 수 있으므로<sup>23,24</sup> genistein을 이 상적인 녹내장 치료제로서 연구해 볼 수 있을 것이다.

따라서 genistein은 혈청결핍상태에서 배양된 사람의 섬유주세포에서 NO의 생성을 촉진시켰으며 섬유주세포를 보호하는 효과도 나타내었으므로 비록 생체 내에서의 연구는 아니지만 본 연구의 결과는 genistein이 섬유주를 통한 방수유출을 증가시키고 섬유주세포를 보호하는 작용을 나타낼 가능성이 있음을 시사하며 향후 그 기전과 임상적 효과에 대해 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 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 (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- Wiederholt M, Dörschner N, Groth J. Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 1997;211:153-60.
- Wiederholt M, Stumpff F. The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption. In: Civan MM, ed. *Current topics in membranes. The eye's aqueous Humor: from secretion to glaucoma*. San Diego: Academic Press, Vol. 45. 1998;163-202.
- Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2515-20.
- Behar-Cohen FF, Goureau O, D'Hermies F, Courtois Y. Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1711-5.
- Wiederholt M, Groth J, Strauss O. Role of protein tyrosine kinase on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1012-20.
- Liu D, Homan LL, Dillon JS. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* 2004;145:5532-9.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3727-9.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 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.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987;262:5592-5.
- Wei H, Wei L, Frenkel K, et al. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 1993;20:1-12.
- Wei H, Cai Q, Rahn RO. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis* 1996;17:73-7.
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2690-4.
- Callsen D, Pfeilschifter J, Brüne B. Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J Immunol* 1998;161:4852-8.
- Stumpff F, Que Y, Boxberger M, et al. Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1404-17.
- Hanneken A, Lin FF, Johnson J, Maher P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3164-77.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000;87:540-2.
- Scalera F, Borlak J, Beckmann B, et al. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1816-22.
- Smirnov SV, Aaronson PI. Inhibition of vascular smooth muscle cell K<sup>+</sup> currents by tyrosine kinase inhibitors genistein and ST 638. *Circ Res* 1995;76:310-6.
- Hollenberg MD. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:108-14.

**=ABSTRACT=**

## Effect of Genistein on the Survival and Production of Nitric Oxide in Trabecular Meshwork Cells

Jung Heum Hong, MD, Yun Young Kim, MD, PhD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

**Purpose:** To investigate the effects of genistein on the survival and production of nitric oxide in cultured human trabecular meshwork cells (HTMC).

**Methods:** Primarily cultured HTMC were exposed to 0, 1, and 10  $\mu$ m genistein using serum-deprived media. Production of nitric oxide and eNOS activity were assessed with the Griess assay and RT-PCR after exposure to genistein for 10 min and one day. Cellular survival was assessed via MTT assay after exposure to genistein for one day.

**Results:** Genistein significantly increased the production of nitric oxide after exposure for 1 min at 10  $\mu$ m and for 1 day at 1  $\mu$ m under serum-deprived conditions. Genistein increased eNOS activity and cellular survival in HTMC.

**Conclusions:** Genistein increases cellular survival under serum-deprived conditions, accompanied with an increase in nitric oxide production after both short-term and long-term exposures.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(8):970-974

**Key Words:** Genistein, Nitric oxide, Survival, Trabecular meshwork cells

---

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

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

#3056-6 Daemyeong 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

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