

섬유주세포에서 Erythropoietin이 일산화질소의 생성에 미치는 영향

이승희 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: Erythropoietin (EPO)이 배양된 섬유주세포에서 일산화질소의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포를 일차배양한 후 혈청이 결핍된 배지를 이용하여 0, 0.5, 1.0 U/ml의 EPO에 이틀간 노출시킨 후 Griess assay를 이용하여 일산화질소의 생성량을 측정하였고, RT-PCR을 이용하여 EPO 수용체 mRNA와 eNOS의 발현을 조사하였다.

결과: EPO는 혈청결핍상태에서 섬유주세포의 생존에 영향을 미치지 않았다($p>0.05$). 섬유주세포에서 EPO 수용체 mRNA가 발현되었다. EPO는 일산화질소의 생성을 증가시켰으며($p<0.05$) eNOS의 발현도 증가되었다.

결론: EPO는 섬유주세포의 생존에 영향을 주지 않았다. EPO는 eNOS의 발현을 증가시켰으며 일산화질소의 생성을 증가시켰다.

(대한안과학회지 2011;52(12):1514-1518)

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 개방각녹내장을 유발할 수 있으므로^{1,2} 섬유주세포를 보호하여 그 기능을 유지 또는 회복할 수 있다면 섬유주를 통한 방수유출을 개선하는 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^{3,4} eNOS (endothelial nitric oxide synthase)에서 생산하는 NO는 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{5,6}

Erythropoietin (EPO)은 신장에서 주로 만들어지는 싸이토키인으로 적혈구 생산에 필수적인 역할을 할 뿐만 아니라 신경세포, 혈관내피세포, 평활근세포 등에서 세포고사를 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며⁷⁻¹⁰ 심근세포에서 eNOS의 발현을 증가시켜 세포보호효과가 나타나는 것으로 보고되어 있다.^{11,12}

EPO 수용체는 인체의 망막에서 발현되며¹³ 녹내장에서 신경보호제제로서 연구가 되고 있으나¹⁴ 인체의 섬유주

세포에서는 EPO수용체의 존재 여부가 아직 알려져 있지 않다. 인체의 섬유주세포에서도 EPO이 섬유주세포에 대해 NO의 생성을 촉진시켜 섬유주세포의 보호효과를 나타내거나 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 가능성이 있으나 EPO수용체의 발현이나 EPO이 NO의 생성에 미치는 영향과 세포의 생존에 미치는 영향은 아직 자세히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 EPO 수용체의 발현 유무를 조사하고, EPO이 섬유주세포에서 NO의 생성과 eNOS의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적절한 안구의 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대 배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 층만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 배

■ 접수 일: 2011년 4월 6일 ■ 심사통과일: 2011년 5월 10일
■ 게재허가일: 2011년 9월 30일

■ 책임저자: 김 재 우

대구시 남구 대명 4동 3056-6
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

약물처리

24 well 배양접시에 2×10^4 cells/ml의 농도로 각 well에 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 이용하여 EPO (Sigma, St Louis, MO, USA)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, St Louis, MO, USA) assay를^{15,16} 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를¹⁷ 이용하였다. MTT assay는 48시간 동안 0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 U/ml의 EPO로 처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, St Louis, MO, USA)를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 μ l씩 옮겨 spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

Griess assay는 48시간 동안 0, 0.5, 1.0 U/ml의 EPO에 노출시킨 후 세포의 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma, St Louis, MO, USA)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, St Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

eNOS 수용체와 eNOS 발현을 측정하기 위한 RT-PCR

섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리된 RNA에서 eNOS 수용체와 eNOS의 발현을 RT-PCR을 이용해 확인하였다. eNOS의 발현을 알아보기 위해 24시간 동안 0.5, 1.0 U/ml의 EPO에 노출시킨 후 섬유주세포에서 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 5분간 denaturation 시키고 얼음에 5분간 둔 다음 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 70°C 10분간

반응시켜 cDNA로 합성하였다. 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 cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분, 94°C 30초, 54°C 30초, 72°C 30초로 총 30 cycles를 시행한 후 57°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. eNOS 수용체의 경우 0.5 U/ml의 EPO에 노출시킨 후 forward primer (ttc tgg tgt tcg ctg cct ac, 137 bp), reverse primer (ggg gcg tct agg agc act ac, 137 bp)를 각각 사용하여 54°C에서 5분간 반응시켜 eNOS 수용체 mRNA를 측정하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 각각의 농도에 따라 8회 측정된 값을 평균 \pm 표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 비교하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

EPO이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

EPO를 혈청이 결핍된 상태에서 48시간 동안 섬유주세포에 노출시켰을 때 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 세포의 생존을 유의한 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 1). 따라서 EPO는 혈청이 결핍된 상태에서는 섬유주세포에 보호효과를 나타내지 않음을 알 수 있었다.

EPO이 NO의 생성에 미치는 영향

EPO는 무혈청 상태에서 48 시간 동안 노출시켰을 때 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 0.5 U/ml와 1.0 U/ml의 농도에서 nitrite 생성을 통계학적으로 유의하게 각각 증가시켰다($p = 0.042, 0.027$) (Fig. 2).

섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체 mRNA의 발현

RT-PCR을 이용하여 EPO에 대한 eNOS 수용체 mRNA

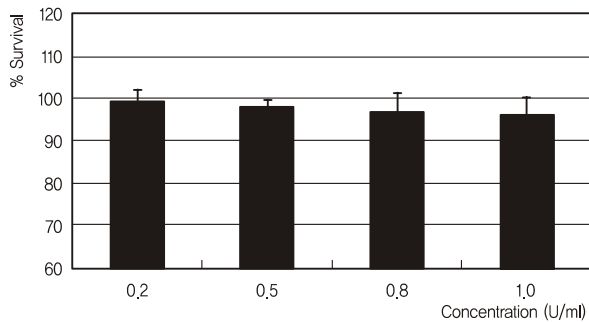


Figure 1. Effects of erythropoietin on the survival of trabecular meshwork cells. Erythropoietin did not affect cellular survival ($p > 0.05$).

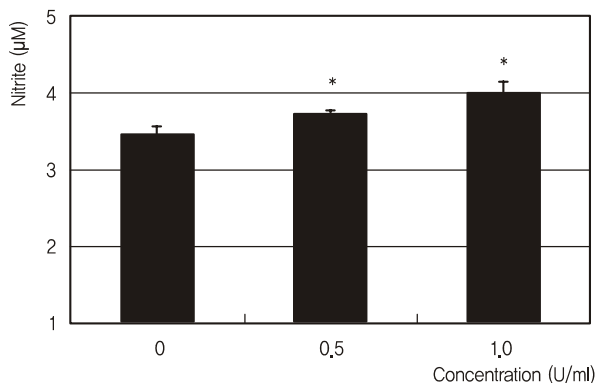


Figure 2. Effects of erythropoietin on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. Erythropoietin increased NO production (* $p < 0.05$).

의 발현을 조사한 결과 대조군에 비하여 0.5 U/ml의 EPO에 노출시켰을 때 eNOS 수용체 mRNA의 발현이 유의하게 증가하였다. 따라서 섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체가 존재할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

EPO이 eNOS의 활성화에 미치는 영향

EPO를 24시간 섬유주세포에 노출시켰을 때 대조군에 비하여 0.5 U/ml의 농도에서 44.5%, 1.0 U/ml의 농도에서 41.2% eNOS의 활성을 증가시켰다(Fig. 4). 따라서 EPO에 의한 NO의 생성증가는 eNOS의 활성화에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구의 결과는 사람의 섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체가 존재하며 EPO이 eNOS의 활성을 증가시켜 NO의 생성을 촉진할 가능성이 있음을 보여주고 있다.

EPO는 조절작용뿐만 아니라 생체 조직을 보호하는 역할도 하는데¹⁸ 기존의 연구에 따르면 혈관조직에서 EPO이 조



Figure 3. Expression of erythropoietin mRNA receptor in trabecular meshwork cells. Exposure of 0.5 U/ml erythropoietin (right) increased expression of erythropoietin mRNA receptor compare to the non-exposed control (left).



Figure 4. Effects of erythropoietin on the activity of eNOS in trabecular meshwork cells. Exposure to 0.5, 1.0 U/ml erythropoietin increased eNOS expression up to 44.5% and 41.2%, respectively compared to the non-exposed control.

직 손상에 대해 방어하는 기전은 eNOS의 활성화와 tetrahydrobiopterin의 생합성에 의한다고 알려져 있다.¹⁹⁻²² 또한 EPO는 항산화작용을 하는 superoxide dismutase의 발현을 증가시켜 산화스트레스에 대한 방어작용을 하는 것으로도 알려져 있다.²³

EPO이 세포 내로 신호가 전달되어 작용을 나타내기 위해서는 세포에 수용체가 존재하여야 한다. 아직 인체의 섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체의 존재 여부는 알려져 있지 않았으나 본 연구에서 섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체가 존재하는 것을 확인하였으며 EPO를 섬유주세포에 노출시킬 경우 작용을 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과에 따라 EPO를 섬유주세포에 노출시켜 EPO에 의한 NO 생성촉진을 조사한 결과 eNOS의 발현이 증가되었을 뿐만 아니라 NO의 생성도 증가하였다. 따라서 EPO는 NO에 의해 섬유주를 이완시켜 방수유출을 증가시킬 가능성이 있음을 알 수 있었다. 비록 혈관내피세포에서 EPO가 NOS의 발현을 감소시켰다는 보고가 있기도 했지만²⁴ 현재까지 알려진 대부분의 연구는 EPO이 NO의 생성을 촉진하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구의 결과에서 EPO는 섬유주세포에서 NO의 생성을 촉진한다는 점을 확인하였으며 그 기전으로는 기존에 보고된 바와 같이 eNOS의 활성화와 tetrahydrobiopterin의 생합성 증가가 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

개방각녹내장 환자의 방수에서 EPO이 증가된다는 보고

가 있는데²⁵ 이러한 EPO의 증가는 녹내장에 의한 손상에 대한 보상 작용과 관련이 있다고 한다.²⁶ EPO는 망막신경절세포에서는 세포고사를 방지하여 세포를 보호한다고 보고되어 있으나²⁷ 본 연구의 결과에서 EPO는 섬유주세포에서는 혈청결핍의 상태에서 세포생존을 보호하는 작용을 나타내지는 않았는데 이는 기존에 보고된 신경세포의 보호작용과는 다른 결과이다.^{28,29} 그러나 본 연구의 결과와 같이 EPO는 NO의 생성을 촉진하였으며 산화스트레스에 대해 항산화작용을 나타내므로²² 섬유주세포에서도 세포보호효과를 나타낼 가능성은 있다. 이러한 결과가 나타나는 이유 중 하나는 신경세포와는 다른 섬유주세포의 특성에 기인할 것으로도 생각되며 다른 여러 가지 실험 조건이나 기간에 따른 좀 더 상세한 연구와 생체 내 실험도 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 섬유주세포에서 EPO에 대한 eNOS 수용체가 발현되었으며, EPO는 eNOS의 활성을 증가시키고 NO의 생성을 촉진시켰다. 따라서 EPO는 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 가능성이 있으며 향후 그 기전과 임상적 효과에 대해 보다 자세한 연구가 필요할 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 (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- Wiederholt M, Dorschner 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*. Vol. 45. San Diego: Academic Press, 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.
- Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R977-88.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4044-9.
- Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, et al. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999;55:546-53.
- Akimoto T, Kusano E, Inaba T, et al. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *Kidney Int* 2000;58:269-82.
- Rui T, Feng Q, Lei M, et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005;65:719-27.
- Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, et al. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2006;72:51-9.
- Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Simo R. Expression of Erythropoietin and Its Receptor in the Human Retina: comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:1189-94.
- Tsai JC, Song BJ, Wu L, Forbes M. Erythropoietin: A candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. *J Glaucoma* 2007;16:567-71.
- 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.
- Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2003;59:538-48.
- Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, et al. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke* 2005;36:2731-7.
- Urao N, Okigaki M, Yamada H, et al. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006;98:1405-13.
- d'Uscio LV, Smith LA, Santhanam AV, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* 2007;49:1142-8.
- d'Uscio LV, Katusic ZS. Erythropoietin increases endothelial biosynthesis of tetrahydrobiopterin by activation of protein kinase B alpha/Akt1. *Hypertension* 2008;52:93-9.
- d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Erythropoietin increases expression and function of vascular copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Hypertension* 2010;55:998-1004.
- Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 1999;33:894-9.
- Mokbel TH, Ghanem AA, Kishk H, et al. Erythropoietin and soluble CD44 levels in patients with primary open-angle glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:560-5.
- Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem* 2001;276:39469-75.
- Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006;83:473-83.
- Milano M, Collomp R. Erythropoietin and neuroprotection: a ther-

apeutic perspective. J Oncol Pharm Pract 2005;11:145-9.
29) Zhong Y, Yao H, Deng L, et al. Promotion of neurite outgrowth and

protective effect of erythropoietin on the retinal neurons of rats.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2007;245:1859-67.

=ABSTRACT=

Effect of Erythropoietin on the Production of Nitric Oxide in Trabecular Meshwork Cells

Seung Hee Lee, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

Purpose: To investigate the effects of erythropoietin (EPO) on the production of nitric oxide in cultured human trabecular meshwork cells (HTMC).

Methods: Primarily cultured HTMC were exposed to 0, 0.5, and 1.0 U/ml EPO using serum-deprived media for 2 days. Production of nitric oxide and cellular survival were assessed with Griess assay and MTT assay, respectively. Expression of EPO mRNA receptor and activity of eNOS were assessed with RT-PCR.

Results: EPO did not affect the survival of HTMC ($p > 0.05$). EPO increased the production of nitric oxide ($p < 0.05$) accompanied with increased eNOS activity.

Conclusions: EPO had no effect on the cellular survival under serum-deprived conditions. EPO increases the production of nitric oxide by increasing eNOS activity.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(12):1514-1518

Key Words: Erythropoietin, Nitric oxide, 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