대한안과학회지 2012년 제 53 권 제 8 호
J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(8):1150-1156
pISSN: 0378-6471
eISSN: 2092-9374
http://dx.doi.org/10.3341/jkos.2012.53.8.1150

시신경절단모델에서 라파마이신의 신경보호효과에 대한 연구

김석환[1,2] · 한영근[1,2] · 박기호[1,3] · 김유정[4]

서울대학교 의과대학 안과학교실[1], 서울특별시보라매병원 안과[2], 서울대학교병원 안과[3], 서울대학교병원 의생명연구원[4]

목적: 흰쥐의 시신경절단모델에서 라파마이신(rapamycin)을 이용한 자가포식현상(autophagy)의 활성화가 망막신경절세포를 보호하는지 알아보았다.
대상과 방법: 흰쥐의 유리체강 내 라파마이신을 주입한 후 망막신경절세포에서 자가포식현상이 활성화되는지 면역조직화학염색으로 관찰하였다. 시신경을 절단한 직후 유리체강 내 5 ng/㎕의 라파마이신을 주입하였고, 7일 및 14일 후의 망막신경절세포수를 구하였다. 한편, 시신경 절단 후 라파마이신과 자가포식현상억제제를 유리체강 내 동시 주입하여 7일 후 망막신경절세포수를 관찰하였다.
결과: 라파마이신 주입 후 망막신경절세포에서 phospho-S6 ribosomal protein의 발현이 감소하였다. 시신경 절단 후 라파마이신을 주입한 군은 7일 후 대조군에 비해 유의하게 많은 망막신경절세포가 관찰되었으나 14일째 차이가 없었다. 7일 후 라파마이신을 재주입한 경우 14일째 신경보호효과를 보였다. 시신경 절단 후 라파마이신과 자가포식현상억제제를 동시에 주입했을 때 망막신경절세포수에 차이가 없었다.
결론: 라파마이신으로 활성화된 자가포식현상이 시신경절단모델에서 망막신경절세포에 대한 신경보호효과가 있음을 보였다.
〈대한안과학회지 2012;53(8):1150-1156〉

자가포식현상(autophagy)은 세포내 구조물을 분해하고 재생시키는 과정으로 효모에서 고등진핵세포에 이르기까지 발생학적으로 잘 유지된 기전이다. 거의 대부분의 세포에서 세포내 항상성 유지를 위해 어느 정도의 자가포식현상이 존재하지만, 영양분의 부족이나 기타 스트레스 상황에서 이 기전이 크게 활성화된다.[1,2] 자가포식현상이 활성화되면 단백질이나 세포소기관들이 오토파고솜(utophagosome)이라고 불리는 이중막에 둘러싸이게 되고 오토파고솜이 리소좀(lysosome)과 결합하여 오토리소좀(autolysosome)을 형성한다. 오토리소좀(autolysosome) 내에서 단백질이나 세포소기관이 분해되어 생긴 아미노산과 자유지방산은 ATP 합성이나 새로운 단백질 합성의 원료로 재활용하여 결국 세포의 생존에 기여하게 된다.[3]

신경세포에서도 자가포식현상의 역할에 대해서 많은 보고가 있는데, 외상과 허혈과 같은 스트레스 상황에서 신경세포의 자가포식현상이 크게 활성화되며[4,5] 세포를 보호한다.[6-8] 최근 중추신경계에서 자가포식현상을 녹아웃(knock-out)시킨 생쥐모델에서 신경변성(neurodegeneration)이 발생한다고 보고하여 자가포식현상이 신경세포의 생존에도 필수적임이 알려졌다.[9,10] 또한 라파마이신을 이용하여 중추신경계세포에서 자가포식현상을 인위적으로 활성화시켰을 때 외상성 뇌손상모델을 포함한 여러 신경퇴행성질환모델에서 신경보호효과가 있음이 밝혀졌다.[4,11-14]

본 연구진은 시신경을 절단하여 망막신경절세포의 급격한 소실을 유발하는 모델에서 망막신경절세포 내에서 자가포식현상이 활성화됨을 보인 바 있다.[15] 하지만 시신경 절단 3일째 자가포식현상이 최대한으로 활성화되었으므로, 손상 직후에 자가포식현상을 인위적으로 활성화시키면 신경보호효과를 나타낼 가능성이 있다. 이 연구에서는 시신경절단모델에서 라파마이신을 이용한 자가포식현상의 활성화가 신경세포를 보호하는지 알아보고자 연구를 수행하였다.

■ 접 수 일: 2012년 1월 8일 ■ 심사통과일: 2012년 1월 30일
■ 게재허가일: 2012년 6월 19일

■ 책 임 저 자: 한 영 근
서울특별시 동작구 보라매로 5길 20
서울특별시보라매병원 안과
Tel: 02-870-2411, Fax: 02-831-2826
E-mail: eye129@paran.com

* 이 연구는 2010년도 서울특별시보라매병원 임상공동연구비의 지원에 의해 이루어진 것임.

대상과 방법

시신경절단모델

실험에는 체중 250-300 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)

64마리를 사용하였다. 쥐들은 온도 20-24℃, 습도 40-60%, 12시간 주기의 밤낮이 조절되는 동물사육실에서 사육되었으며 서울대병원 동물실험위원회가 정한 지침에 따라 취급되었다. 시신경절단모델을 만들기 위해 흰쥐의 시신경을 노출하여 절단하였다. 자세한 방법은 이전의 논문에서 소개되었고,[15] 간단히 요약하면 다음과 같다. 흰쥐에 케타민(Ketamine hydrochloride, 유한양행, 대한민국) 100 mg/kg과 자일라진(Xylazine hydrochloride, 바이엘코리아, 대한민국) 10 mg/kg을 복강 내 주사하고 프로파라케인 0.5% 안약(Alcaine, Alcon, USA)을 점안하여 마취하였다. 결막을 박리하여 시신경을 노출시킨 후, 혈관을 피하여 시신경을 감싸는 sheath에 2 mm 길이의 절개를 가하였다. 출혈이 생기지 않게 조심하여 시신경을 반나(Vannas) 가위로 절단하였다. 절단 후 안구 측에 붙어있는 시신경 절단면에 덱스트란 데트라메틸로다민 크리스탈(Dextran tetramethylrhodamine crystal, Molecular probes, USA)을 적용하여 망막신경절세포를 염색하였다. 결막을 봉합하고 커버글라스를 이용하여 망막혈관의 개통상태를 확인하였다.

자가포식현상의 활성화 및 평가

자가포식현상을 활성화시키는 라파마이신의 적합한 농도를 찾기 위해 해밀턴주사기(Hamilton syringe, Hamilton company, USA)를 이용하여 실험군 흰쥐의 유리체강 내에 0.5 ng/μl, 5 ng/μl, 50 ng/μl 농도의 라파마이신(Rapamycin, Sigma-Aldrich, USA) 5 μl를 각각 주입하였고, 대조군은 0.1% DMSO 5 μl를 유리체강 내 주입하였다. 24시간 후 자가포식현상의 주요 조절인자 mTOR (mammalian target of rapamycin)의 활성화를 나타내는 지표인 phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) antibody (Cell Signaling Technology, USA)[16]를 이용한 면역조직화학염색을 시행하여 자가포식현상의 활성화 여부를 확인하였다. 라파마이신 주입 24시간 후 안구를 적출하여 OCT compound에 처리하여 Cryotome으로 4 μm 두께의 절편을 시신경유두의 수직단면을 따라 만들었다. 0.05% Tween20 (Amresco, USA)이 포함된 PBS (phosphate buffered saline)로 씻은 후 normal goat serum (Vector Laboratories, USA)으로 30분 동안 처리하였다. 4℃에서 하루 동안 Anti-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) antibody (1:100)를 처리하였다. 항원-항체 복합체는 avidin-biotin-peroxidase (Vectastatin ABC kit, Vector Laboratories, USA)를 이용하여 검출하였고, Diaminobenzidine with nickel chloride (DAB substrate kit; Vector Laboratories, USA)으로 염색하였다. 자가포식현상을 뚜렷이 활성화시키는 가장 낮은 농도의 라파마이신을 실험에 사용하였다.

라파마이신 투약 후 망막신경절세포 생존율의 평가

시신경절단 직후 5 ng/μl 농도의 라파마이신 5 μl를 10마리 10안의 유리체강 내 주사하였고, 0.1% DMSO 5 μl를 6마리 6안의 유리체강 내 주사하였다. 시신경절단 7일 후 케타민(100 mg/kg)과 자일라진(10 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취하였다. 안구를 적출하여 4% 파라포름알데하이드에 2시간 넣어 둔 뒤 각막, 렌즈 등 전안부를 제거하고, 망막을 맥락막으로부터 분리하여 시신경유두를 중심으로 4개의 방사상 절개를 하고, 슬라이드 위에 클로버잎 모양으로 펼쳤다. 시신경유두를 중심으로 각 분획당 1 mm, 2 mm, 3 mm 떨어진 위치 총 12영역에서 염색된 망막신경절세포를 400배 배율의 형광현미경하에 촬영하여 필드 당 세포수를 평가하였다. 세포수는 mm^2당 세포 밀도로 계산하였다. 세포수는 2명의 검사자에 의해 맹검법으로 측정된 평균값으로부터 구하였다.

라파마이신 투약 후 망막신경절세포 보호작용의 지속기간 평가

시신경절단 직후 5 ng/μl 농도의 라파마이신 5 μl를 10마리 10안의 유리체강 내 주사하였고(1회 주입군), 0.1% DMSO 5 μl를 6마리 6안의 유리체강 내 주사한 뒤(대조군) 2주 후 안구를 적출하여 위와 같은 방법으로 망막신경절세포수를 평가하였다. 이와 별도로 신경절단 직후 5 ng/μl 농도의 라파마이신 5 μl를 10마리 10안의 유리체강 내 주사하였고, 7일 후 동일한 양의 라파마이신(재주입군)을 1회 반복 주사 후 시신경절단 후 14일에 안구를 적출하여 위와 같은 방법으로 망막신경절세포 밀도를 평가하였다.

라파마이신과 자가포식현상 억제제 동시 투약 후 망막신경절세포 생존율의 평가

시신경절단 직후 5 ng/μl 농도의 라파마이신 5 μl를 다른 16마리 16안의 유리체강 내 주사하였다. 자가포식현상을 억제하는 3 nM의 3-methyladenine (M9281, Sigma-Aldrich, USA) 3 μl를 그중 8마리 8안에 추가 주사하였고, 5 mM의 Wortmannin (W1628, Sigma-Aldrich, USA) 3 μl를 나머지 8마리 8안에 추가로 주사하였다. 시신경절단 직후 0.1% DMSO 5 μl를 대조군 6마리 6안의 유리체강 내 주사하였다. 7일 후 위와 같은 방법으로 망막신경절세포 밀도를 평가하였다.

통계분석

두 군 간의 평균값의 비교는 SPSS 16.0을 이용하여 Mann-Whitney test로 분석하였다. 세 군 간의 비교는 one-way ANOVA 및 post Hoc Tukey test로 분석하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$을 기준으로 평가하였다.

결 과

라파마이신에 의한 자가포식현상의 활성화 및 농도 결정

유리체강 내 라파마이신 주입 24시간 후 면역조직화학염색을 시행하였다. Phospho-S6 ribosomal protein은 mTOR의 활성화를 나타내는 지표이며, 발현의 감소는 자가포식현상의 활성화를 의미한다.[16] 5 ng/μl 및 50 ng/μl의 라파마이신 농도에서 phospho-S6 ribosomal protein의 발현이 뚜렷이 감소하여 자가포식현상이 활성화되었음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이상의 결과에서 5 ng/μl 라파마이신을 적합한 농도로 결정하였다.

라파마이신 투약 후 망막신경절세포의 신경보호효과

시신경 절단 직후 5 ng/μl의 라파마이신을 유리체강 내 주입한 지 7일 후 망막신경절세포 밀도를 측정한 결과 대조군(954.0 ± 86.6개/mm^2)에 비해 실험군(1279.9 ± 74.4개/mm^2)에서 유의하게 많은 망막신경절세포가 관찰되었다(Mann-Whitney test, $p<0.01$, Fig. 2).

라파마이신 투약 후 망막신경절세포 보호작용의 지속기간

시신경 절단 직후 5 ng/μl의 라파마이신을 유리체강 내 주입한 지 14일 후 망막신경절세포밀도를 측정한 결과 대조군은 mm^2당 348.3 ± 75.7개, 1회 주입군은 mm^2당

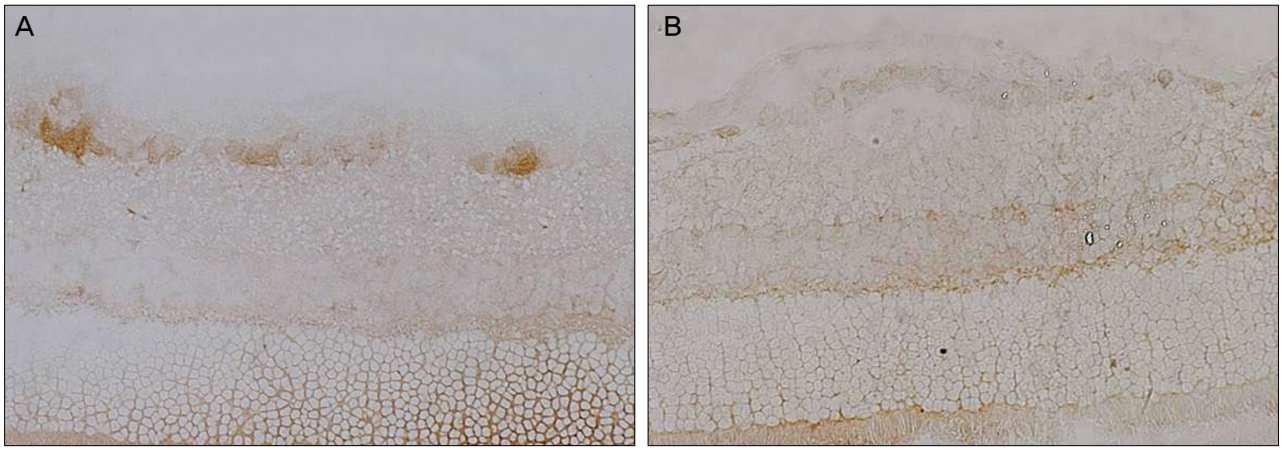


Figure 1. Immunohistochemistry of phospho-S6 ribosomal protein in retinal ganglion cells. (A) Phospho-S6 ribosomal protein was predominantly expressed in retinal ganglion cells of normal rat retina. (B) Expression of phospho-S6 ribosomal protein was markedly reduced in retinal ganglion cells after intravitreal injection of rapamycin (5 ng/μl).

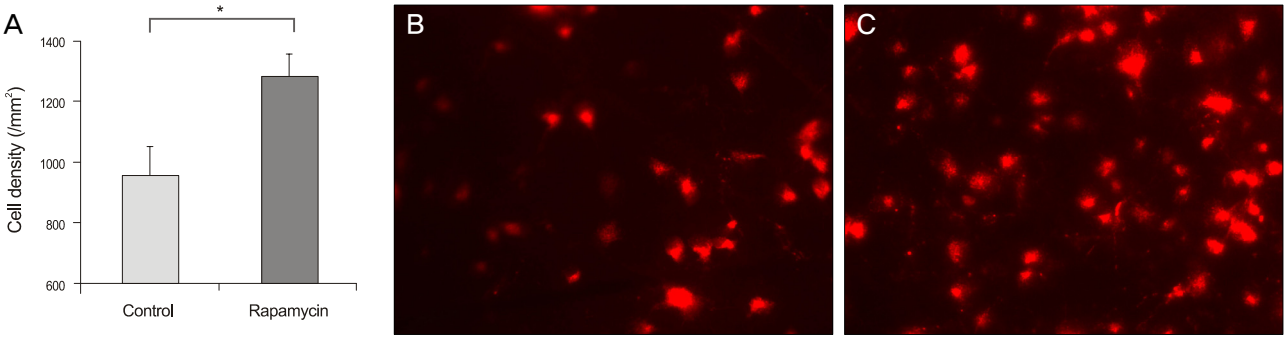


Figure 2. Retinal ganglion cells (RGCs) survival 1 week after optic nerve transection (ONT). (A) Intravitreal injection of rapamycin showed neuroprotective effect after ONT (*Mann-Whitney test, $p < 0.01$). RGCs were retrogradely labeled in the control group (B) and the rapamycin injection group (C).

369.7 ± 68.2개의 망막신경절세포수를 보였다. 시신경 절단 직후 5 ng/㎕의 라파마이신을 유리체강 내 주입한지 7일 후 5 ng/㎕의 라파마이신을 재주입하였고, 시신경절단 이후 14일째 망막신경절세포수를 측정한 재주입군에서는 mm^2 당 521.1 ± 72.7개로 대조군 및 실험군에 비해 유의하게 많은 망막신경절세포가 관찰되었다(one-way ANOVA, post Hoc Tukey test, $p<0.05$, Fig. 3).

라파마이신과 자가포식현상 억제제 동시 투약 후 망막신경절세포 생존율

시신경 절단 직후 5 ng/㎕의 라파마이신과 3 nM의 3-methyladenine을 동시에 주입한 군(940.4 ± 154.1개/mm^2)과 시신경 절단 직후 5 ng/㎕의 라파마이신과 5 mM의 Wortmannin을 동시에 주입한 군(886.1 ± 149.7개

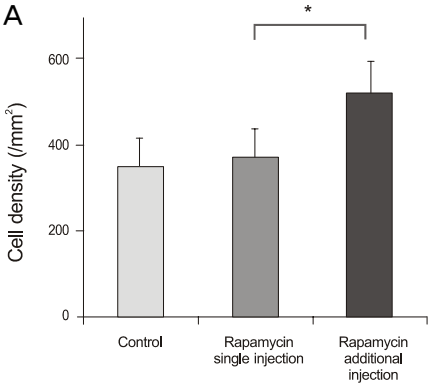
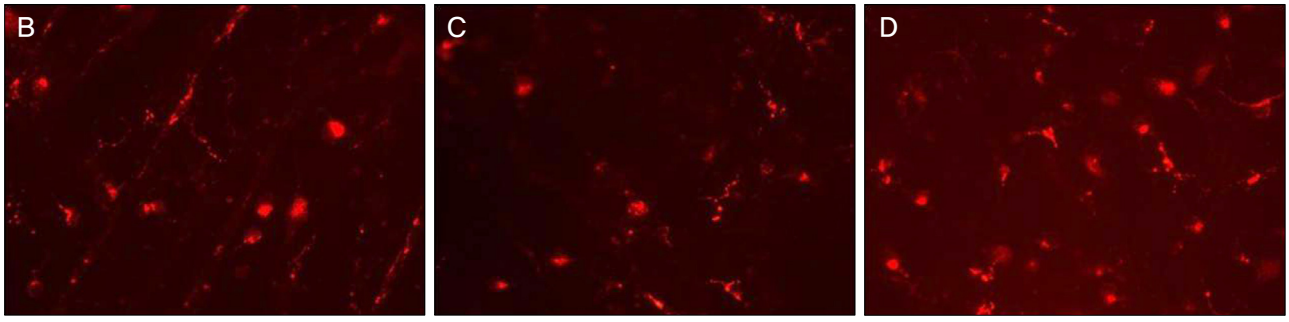


Figure 3. Effect of rapamycin for retinal ganglion cells (RGC) survival 2 weeks after optic nerve transaction (ONT). (A) Repeated intravitreal injection of rapamycin showed neuroprotection at 2 weeks after ONT (*One-way ANOVA, post Hoc Tukey test, $p < 0.05$). RGCs were retrogradely labeled in the control group (B), the rapamycin single injection group (C), and the rapamycin additional injection group (D).



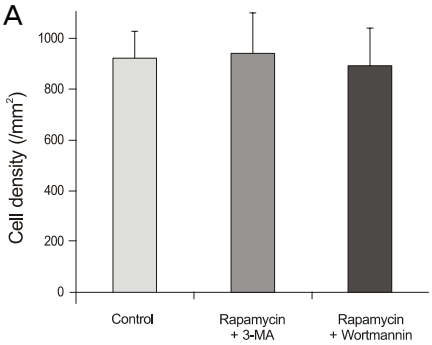
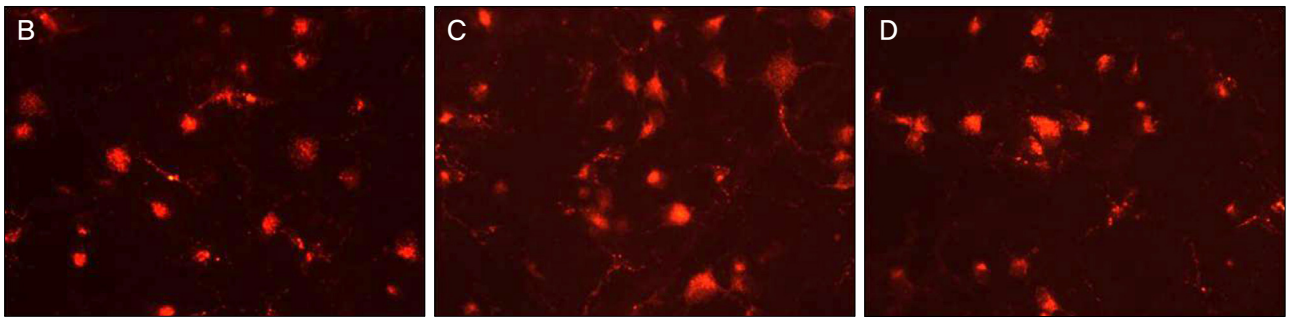


Figure 4. Retinal ganglion cells survival 1 week after optic nerve transection (ONT) and co-injection of rapamycin and autophagy inhibitors; 3-methyladenine (3-MA) or Wortmannin (A). RGCs were retrogradely labeled in the control group (B), the co-injection group of rapamycin and 3-MA (C) and the co-injection group of rapamycin and Wortmannin (D).



/mm^2) 모두에서 대조군(920.1 ± 107.3개/mm^2)과 비교하여 시신경절단 7일 후 망막신경절세포수에 통계적인 차이가 관찰되지 않았다(one-way ANOVA, p>0.05, Fig. 4).

고 찰

이 연구에서 저자들은 라파마이신의 유리체강 내 주입으로 망막신경절세포에서 자가포식현상의 인위적인 활성화가 가능함을 보였고, 활성화된 자가포식현상이 시신경절단모델에서 망막신경절세포에 대한 신경보호효과가 있음을 확인하였다.

라파마이신은 처음에는 항진균제로 개발된 macrolide antibiotics였으나, 강력한 면역억제작용과 증식억제작용을 가지는 것으로 잘 알려졌다.[17] 라파마이신은 cytosolic protein FK-binding protein 12 (FKBP12)에 부착하여 mTOR (mammalian target of rapamycin)의 작용을 억제한다.[18] mTOR은 phosphatidylinositol kinase-related serine-threonine kinase로, 세포외 아미노산, 성장인자 및 호르몬의 레벨과 세포내의 에너지 상태를 종합해서 전사(transcription) 속도와 대사과정을 조절하는 역할을 한다. mTOR이 활성화되면 전사를 개시하여 세포 성장과 분열을 촉진시키고, 자가포식현상을 억제한다. 결국 라파마이신은 mTOR을 억제함으로써 자가포식현상을 활성화시켜 세포내 구조물을 분해하고, 유리된 아미노산과 영양분을 재활용하게 된다.

라파마이신은 여러 신경퇴행성질환모델에서 신경보호효과가 보고되었다. 헌팅턴병의 세포, 파리, 생쥐 모델에서 라파마이신에 의한 자가포식현상의 활성화가 신경세포를 보호함이 입증되었으며,[11,12] 파킨슨병모델에서도 자가포식현상이 병인론에 중요하며, 라파마이신에 의한 신경보호효과가 보고된 바 있다.[13] 또한 외상성 뇌손상에서 자가포식현상이 활성화되며, 라파마이신에 의한 자가포식현상의 활성화가 신경세포를 보호함이 알려졌다.[4,14]

이 연구에서는 먼저 유리체강 내에 주입한 라파마이신이 망막신경절세포에서 자가포식현상을 활성화시키는지 phospho-S6 ribosomal protein을 이용하여 확인하였다. 라파마이신 주입 후 정상 상태의 망막신경절세포에서 자가포식현상이 활성화되었으며, 이는 기존에 영양분이 풍부한 정상배지에서도 라파마이신이 세포의 자가포식현상을 인위적으로 활성화시킨다는 보고와 일치하였다.[19,20]

이 연구에서 유리체강 내 주입한 라파마이신은 시신경절단 1주 후 망막신경절세포에 대한 신경보호효과를 보였으나 그 효과가 2주 후까지 지속되지 않았다. 하지만 1주 후 라파마이신을 재주입한 경우에는 2주 후에도 신경보호효과를 나타내었다. 따라서 유리체강내 주입된 라파마이신에 의한 신경보호효과를 장기간 지속시키기 위해서는 반복적인 약제의 주입이 필요할 것으로 생각하며, 추후 라파마이신의 경구 투약 및 복강 내 투약 시의 결과에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

라파마이신은 자가포식현상의 활성화 외에 다른 작용에도 관여한다. Erlich et al[14]은 traumatic brain injury에서 라파마이신의 효과가 microglia의 활성화를 억제한 항염증작용에도 일부 기인함을 보인 바 있다. 따라서 라파마이신 주입에 따른 망막신경절세포의 신경보호효과가 활성화된 자가포식현상 외의 다른 기전에 의한 가능성을 배제할 수 없다. 이 연구에서는 라파마이신의 신경보호효과가 활성화된 자가포식현상에 의한 것인지 알아보기 위해 자가포식현상의 억제제로 널리 쓰이는 3-methyladenine과 Wortmannin을 유리체강 내 주입하였고, 그 결과 라파마이신의 효과가 상쇄되었음을 보였다. 3-methyladenine과 Wortmannin은 오토파고솜(autophagosome) 형성을 방해하여 mTOR과는 무관하게 자가포식현상을 억제한다고 알려졌다.[21] 화학적 자가포식현상 억제제는 자가포식현상 억제 외에 다른 작용에도 관여할 가능성이 있으므로, 이 연구에서는 널리 쓰이는 서로 다른 자가포식현상 억제제를 사용하였다. 이상의 결과는 라파마이신의 신경보호효과가 활성화된 자가포식현상에 의한 것임을 시사하였다.

시신경절단 후 망막신경절세포의 사멸기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 축삭운반(axoplasmic transport)의 차단에 의한 신경영양인자(neurotrophic factor)의 부족이 그 원인으로 생각하고 있다.[22,23] 이러한 세포의 스트레스 상황에서는 세포내 구조물을 분해하고 재생시키는 자가포식현상이 세포의 항상성 유지를 위해서 중요한데, 라파마이신이 이를 활성화시켜 신경보호효과를 나타낼 가능성이 있다. 자가포식현상의 활성화가 신경보호작용에 어떻게 기여하는지에 대해서는 앞으로 추가 연구가 필요하다.

결론적으로 이 연구에서 유리체강 내 라파마이신을 주입하여 망막신경절세포에 인위적으로 자가포식현상을 활성화시켰고, 이는 시신경절단 후 망막신경절세포의 신경보호효과를 나타내었다. 이러한 결과는 추후 망막신경절세포의 변성으로 인한 질환에서 새로운 치료법 개발에 기초지식을 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

1) Mariño G, López-Otín C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. Cell Mol Life Sci 2004;61:1439-54.
2) Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science 2004;306:990-5.
3) Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? J

Clin Invest 2005;115:2679-88.
4) Diskin T, Tal-Or P, Erlich S, et al. Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. J Neurotrauma 2005;22:750-62.
5) Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, et al. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. Biochem Biophys Res Commun 2005;337:1206-13.
6) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:439-48.
7) Iwata A, Christianson JC, Bucci M, et al. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:13135-40.
8) Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. Lancet Neurol 2007;6:352-61.
9) Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. Nature 2006;441:885-9.
10) Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature 2006;441:880-4.
11) Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. Hum Mol Genet 2002;11:1107-17.
12) Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat Genet 2004;36:585-95.
13) Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, et al. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. J Neurosci 2010;30:1166-75.
14) Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. Neurobiol Dis 2007;26:86-93.
15) Kim SH, Munemasa Y, Kwong JM, et al. Activation of autophagy in retinal ganglion cells. J Neurosci Res 2008;86:2943-51.
16) Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2012;71:575-81.
17) Bové J, Martínez-Vicente M, Vila M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. Nat Rev Neurosci 2011;12:437-52.
18) Pignataro G, Capone D, Polichetti G, et al. Neuroprotective, immunosuppressant and antineoplastic properties of mTOR inhibitors: current and emerging therapeutic options. Curr Opin Pharmacol 2011;11:378-94.
19) Blommaart EF, Luiken JJ, Blommaart PJ, et al. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. J Biol Chem 1995;270:2320-6.
20) Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. J Biol Chem 1998;273:3963-6.
21) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J 2000;19:5720-8.
22) Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. J Neurobiol 1992;23:1231-46.
23) Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:489-500.

=ABSTRACT=

Neuroprotective Effect of Rapamycin in Optic Nerve Transection Model

Seok Hwan Kim, MD[1,2], Young Keun Han, MD[1,2], Ki Ho Park, MD[1,3], Yoo Jung Kim, MS[4]

Department of Ophthalmology, Seoul National University College of Medicine[1], Seoul, Korea
Department of Ophthalmology, SMG - SNU Boramae Medical Center[2], Seoul, Korea
Department of Ophthalmology, Seoul National University Hospital[3], Seoul, Korea
Seoul National University Clinical Research Institute[4], Seoul, Korea

Purpose: The present study investigated whether rapamycin activated autophagy in retinal ganglion cells (RGC) and evaluated its effect on RGC survival following optic nerve transection (ONT).
Methods: The activation of autophagy in RGCs after intravitreal injection of rapamycin was evaluated with the immunohistochemical staining of phospho-S6 ribosomal protein. Rapamycin or 0.1% DMSO was injected intravitreally immediately after ONT. At 1 and 2 weeks after ONT, the RGCs were counted. Rapamycin and autophagy inhibitors, 3-methyladenine or Wortmannin were co-injected intravitreally after ONT and the RGCs were counted 1 week later.
Results: Expression of phospho-S6 ribosomal protein was decreased in RGCs after intravitreal injection of rapamycin. The RGC number was significantly higher in the rapamycin group than in the control group 1 week after ONT. However, the RGC number was not different between the 2 groups 2 weeks after ONT. Repeated intravitreal injection of rapamycin at 1-week intervals showed neuroprotection 2 weeks after ONT. The RGC number was not different between the control group and the co-injection group of rapamycin-autophagy inhibitor.
Conclusions: Activated autophagy by rapamycin was neuroprotective in RGC after ONT.
J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(8):1150-1156

Key Words: Autophagy, Neuroprotection, Optic nerve transaction, Rapamycin, Retinal ganglion cells

Address reprint requests to **Young Keun Han, MD**
Department of Ophthalmology, SMG - SNU Boramae Medical Center
#20 Boramae-ro 5-gil, Dongjak-gu, Seoul 156-707, Korea
Tel: 82-2-870-2411, Fax: 82-2-831-2826, E-mail: eye129@paran.com