

섬유주세포에서 Rho Kinase 저해제가 일산화질소의 생성에 미치는 영향

Effect of Rho Kinase Inhibitor on the Production of Nitric Oxide in Trabecular Meshwork Cells

김재우 · 김근해 · 황석진

Jae Woo Kim, MD, PhD, Keun Hae Kim, MD, Seok Jin Hwang, MD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: To investigate the effects of Rho kinase (ROCK) inhibitor on the production of nitric oxide (NO) and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cultured human trabecular meshwork cells (HTMC).

Methods: Primarily cultured HTMC were exposed to 0 μ M, 10 μ M or 100 μ M Y-27632 for 3 days and NO production was assessed using Griess assay. After 24 hours, the effect of Y-27632 on the contraction of collagen matrix and the permeability of the HTMC monolayer was determined. The expression of eNOS mRNA was assessed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cellular survival with the 3-(4, 5 -dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Results: In HTMC, 10 μ M and 100 μ M Y-27632 significantly increased NO production after 1 day and 3 days ($p = 0.020$ and 0.001 , respectively). At 1 day after exposure, Y-276320 significantly relaxed the collagen matrix and increased the permeability of the HTMC monolayer (all $p = 0.001$) and the eNOS mRNA expression ($p = 0.039$).

Conclusions: Increased NO production may play a role in the mechanism of increased trabecular outflow associated with ROCK inhibitor.

J Korean Ophthalmol Soc 2016;57(4):650-656

Keywords: Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), Nitric oxide, Rho kinase (ROCK) inhibitor, Trabecular meshwork, Y-276320

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 방수유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있는 기전이 된다.^{1,2} 기

존의 녹내장 치료 약제의 대부분은 방수의 생성을 줄여 안압하강 효과를 나타내지만 최근에는 섬유주를 통한 방수유출을 직접 증가시키는 약제가 많이 연구되고 있으며³ 이러한 약제로는 Rho kinase (ROCK) 저해제와 아데노신 A1 길항제가 있다.⁴

ROCK 저해제는 섬유주를 이완시켜 방수유출을 증가시킨는데, 그 기전은 F-액틴의 중합을 저해하고 세포내 칼슘을 조절함으로써 세포간 밀착연접(tight junction)을 해체시켜 섬유주를 통한 방수유출을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁵ 뿐만 아니라 ROCK 저해제는 망막혈관을 이완시켜 신경보호작용을 나타내며,^{6,7} 섬유아세포의 분화에 영향을 미쳐 섬유주절제술 후 여과포의 생존을 증가시키는 작용을

■ Received: 2015. 12. 17. ■ Revised: 2016. 1. 15.

■ Accepted: 2016. 2. 25.

■ Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University
Medical Center, #33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu
42472, Korea
Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

* This work was supported by the grant of Research Institute of Medical Science, Catholic University of Daegu (2015).

© 2016 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나타낸다.^{8,9} ROCK 저해제의 일종인 Y-27632는 여러 연구에서 방수유출을 증가시키는 작용을 나타내는 것으로 보고되어 있으며,¹⁰⁻¹² 다양한 ROCK 저해제가 사람을 대상으로 임상시험 중이다.¹³

자유유리기인 일산화질소(nitric oxide, NO)는 세포의 종류에 따라 다양한 역할을 나타낼 수 있으며, 평활근 이완효과도 나타내는 것으로 알려져 있다. 섬유주세포는 형태학적 연구와 전기생리학적 연구에서 평활근과 유사한 성질을 가진 것으로 알려져 있으며^{14,15} endothelial nitric oxide synthase (eNOS)에서 생산하는 NO는 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸

ROCK 저해제의 주된 작용기전은 섬유주 주변 세포의 형태학적 변화와 액틴스트레스 섬유에 영향을 미쳐 섬유주를 이완시키고 실렘관세포의 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있는데^{11,19} 혈관내피세포를 이용한 연구에서는 ROCK 저해제가 NO의 생성을 증가시킨다는 보고도 있다.^{20,21} 따라서 안구 내에서 혈관내피세포와 평활근 세포의 성질을 가진 섬유주세포에서도 ROCK 저해제에 의해 eNOS의 발현과 NO의 생성을 증가시킬 가능성이 있으나 ROCK 저해제가 섬유주세포에서 NO의 생성과 섬유주의 투과도에 미치는 영향에 대해서는 아직 자세히 연구되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 섬유주단층세포층에서 ROCK 저해제가 섬유주의 이완과 투과도에 미치는 영향을 알아보고, 섬유주세포에서 NO의 생성에 미치는 영향과 eNOS의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양과 약물처리

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 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, ThermoScientific, Carlsbad, CA, 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 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다. 일차 배양한 섬유주세포를 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 다음 배지를 제거하고 나

서 10% 혈청이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 ROCK 저해제인 Y-26732 (Sigma, St Louis, MO, USA)를 실험실 내 연구에서 실렘관세포의 투과도와 형태학적 변화를 유발하는 것으로 알려진^{8,9,11} 10, 100 μ M의 농도로 단계적으로 희석한 후 1일 또는 3일간 노출시킨 다음 아래의 실험을 시행하였다.

3-(4, 5 -dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 선별검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 3-(4, 5 -dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St Louis, MO, USA) assay를 이용하였다.²² 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ L씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 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, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

교원질 겔의 수축성 실험(collagen gel contraction assay)

쥐의 꼬리에 있는 힘줄에서 추출한 교원질 섬유에 0.1% glacial acetic acid (Sigma, St Louis, MO, USA)를 첨가하여 교원질 용액을 만들어 교원질 겔 수축성 실험을 시행하였다.²³ 섬유주세포가 포함된 교원질 겔을 만들기 위하여 교원질 용액과 4배 농도의 DMEM 배지, 혈청, 그리고 세포부유액을 4:2:1:1의 비율로 섞은 후 24-well 배양접시에서 수 분간 정치배양하여 굳힌 다음(gelatinization) 12 well 배양접시로 옮긴 후 섬유주세포의 증식에 의한 영향을 배제하기 위하여 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지를 넣고 나서 각 농도의 약물에 노출시켰다. 교원질 겔의 수축 정도를 알아보기 위하여 각각의 교원질 겔의 직경을 노출 후 2시간 간격으로 10시간 동안 각각 측정하여 교원질 겔의 직경이 변화한 정도를 %로 나타내었다.

섬유주단층세포층의 투과도 실험

일차배양한 인체의 섬유주세포를 트립신 처리한 후 12-well의 Transwell (No.3460, Corning, Tewksbury, MA, USA)의 내측 chamber (insert diameter 12 mm, pore size 0.4 mm)에 2×10^4 cells/mL의 농도로 각 well에 고르게 세포를 분주하여 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 배양하였다.^{11,24} 역위상차현미경으로 섬유주세포가 단층으로 층만하게 자란 것

을 확인한 후 혈청에 포함된 단백질 등의 영향을 배제하기 위하여 1% 우태아혈청을 포함한 배지로 교환한 다음 각 약제에 노출시킨 후 투과도 검사를 시행하였다. 내측 chamber에 자라고 있는 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 다음 50 mM Carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 노출시켰다. 노출 2시간 후 transwell을 통하여 외측 chamber로 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 532 nm에서 spectrofluorometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 측정하여 백분율로 나타내었다.

Griess assay

섬유주세포에서 NO의 생성은 Griess assay를 이용하여 측정하였다.²⁵ 일차배양한 섬유주세포를 Y-26732에 농도와 시간별로 노출시킨 다음 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

eNOS mRNA 발현을 측정하기 위한 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) Y-26732에 노출시킨 섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리된 RNA에서 eNOS mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 섬유주세포에서 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 5분간 denaturation시키고 얼음에 5분간 둔 다음 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 70°C에서 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)를 이용하여 분석하였다. 이때 β -action을 internal standard로 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였다. 교원질

겔의 수축 변화는 %로 나타내었고, 세포의 생존과 투과도, NO의 생성, eNOS mRNA의 변화는 평균 \pm 표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 유의성을 비교하였으며 유의수준은 5%로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 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.^{26,27}

Y-26732가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

10, 100 μ M 농도의 Y-26732에 노출시킨 후 시행한 MTT assay에서 모든 농도에서 약물에 노출되지 않은 대조군에 비해 세포의 생존율에 유의한 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$, Fig. 1).

Y-26732가 섬유주세포에 의한 교원질 겔의 수축에 미치는 영향

Y-26732가 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알아보기 위하여 섬유주세포를 교원질 겔 내부에 봉입하여 배양한 다음 약물에 노출시킨 결과 약물처리를 하지 않은 대조군에서는 2시간 후부터 교원질 겔의 직경이 감소하기 시작하여 시간이 지날수록 73.8%까지 직경이 감소하였으나, Y-26732에 노출시킨 경우에는 10, 100 μ M Y-26732 모두 노출 2시간부터

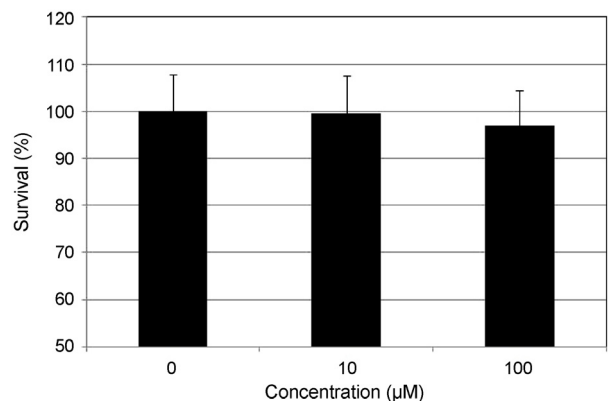


Figure 1. Effects of Y-26732 on the survival of trabecular meshwork cells. Y-26732 did not affect the survival significantly compared to non-exposed controls ($p > 0.05$).

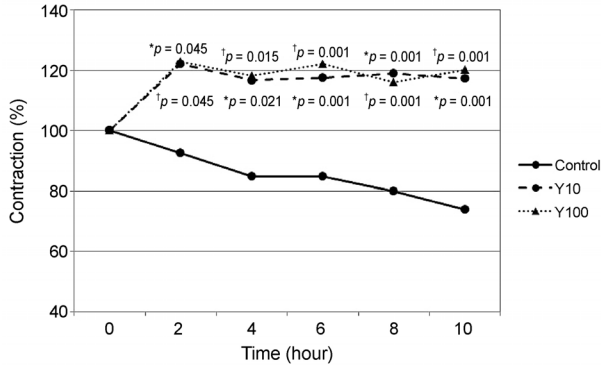


Figure 2. Effects of Y-26732 on the contraction of collagen gels embedded with trabecular meshwork cells. Both 10 μ M (Y10) and 100 μ M (Y100) Y-26732 increased the diameter of collagen gels up to 120% compared with non-exposed controls (* p and $\dagger p$ represent Y10 and Y100, respectively).

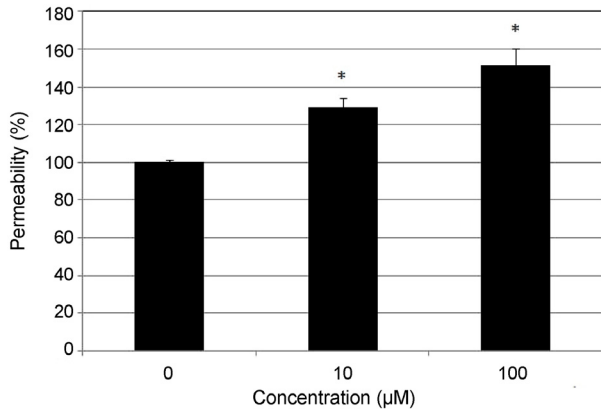


Figure 3. Effects of Y-26732 on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer. Exposure to 10 μ M and 100 μ M Y-26732 increased the permeability of carboxyfluorescein significantly compared with non-exposed controls. Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using non-exposed control (permeability 100%). * p = 0.001.

직경이 증가하기 시작하여 10시간 동안 유지되었다(Fig. 2).

Y-26732가 섬유주단층세포층의 투과도에 미치는 영향
약제에 노출되지 않은 대조군에 비하여 Y-26732는 1일 후에 carboxyfluorescein의 섬유주단층세포층의 투과도를 10 μ M 농도에서 29.2%, 100 μ M 농도에서 51.3% 더 증가시켰다($p=0.001$, 0.001; Fig. 3). 이러한 결과는 노출 3일째에도 유사하게 나타났다(Data not shown).

Y-26732가 섬유주세포에서 NO의 생성에 미치는 영향
섬유주세포에서 Y-26732는 약물 처리 후 1일째에 각 농도에서 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 배지에서의

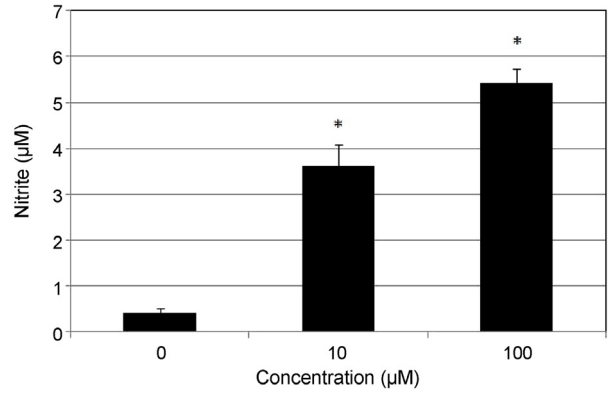


Figure 4. Effects of Y-26732 on the production of nitric oxide (NO) in trabecular meshwork cells after exposure for 24 hours. Both 10 μ M and 100 μ M Y-26732 increased production of NO significantly in a dose-dependent manner. * p = 0.020 and 0.001, respectively.

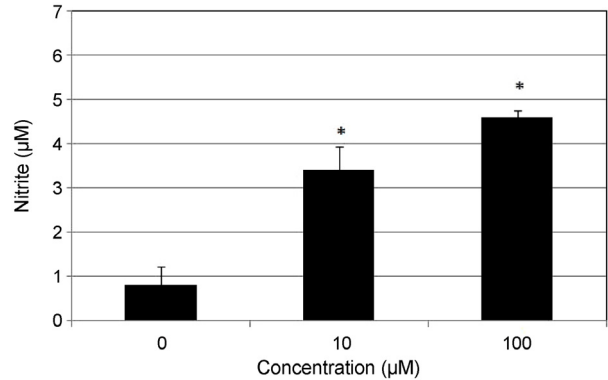


Figure 5. Effects of Y-26732 on the production of nitric oxide (NO) in trabecular meshwork cells after exposure for 3 days. Both 10 μ M and 100 μ M Y-26732 increased production of NO significantly in a dose-dependent manner. * p = 0.046 and 0.021, respectively.

nitrite 생성량에서 농도에 비례하여 유의하게 증가하였다($p=0.020$ 0.001; Fig. 4). 또한 약물 처리 3일째에도 농도에 비례하여 유의하게 배지에서의 nitrite 생성량을 증가시켰다($p=0.046$, 0.021; Fig. 5).

Y-26732가 eNOS mRNA의 발현에 미치는 영향

약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 Y-26732는 약물 처리 후 1일째에 eNOS mRNA의 발현을 증가시켰다(Fig. 6). 약물에 노출되지 않은 대조군에 비해 10 μ M Y-26732는 eNOS mRNA의 발현은 6.5% 증가시켰으나 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.450$). 그러나 100 μ M Y-26732는 eNOS mRNA의 발현을 23.56% 증가시켜 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($p=0.039$).

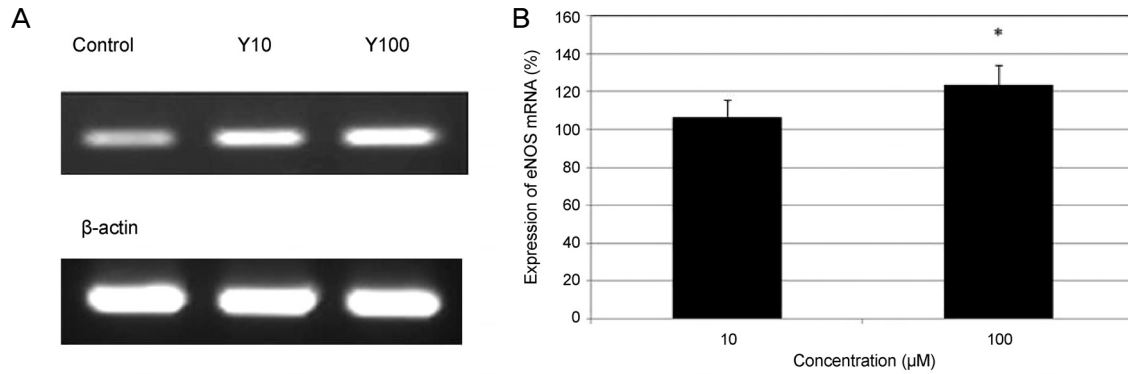


Figure 6. Expression of eNOS mRNA after exposure to Y-27632 (Y) in trabecular meshwork cells (A). Exposure to 100 μM Y-27632 for 1 day (B) increased the degree of eNOS mRNA expression significantly (* $p = 0.039$). β-actin used as internal standard. eNOS = endothelial nitric oxide synthase.

고 찰

본 연구의 결과는 사람의 섬유주세포에서 Y-26732가 eNOS의 발현을 증가시키면서 NO의 생성을 촉진하는 작용이 있음을 보여주고 있다. ROCK 저해제가 섬유주를 통한 방수유출을 촉진하는 주된 기전은 섬유주를 이완시키며 액틴스트레스 섬유와 초점접착역(focal adhesion)에 작용하여 세포 주변을 통해 방수유출을 촉진하는 것이다.¹¹ ROCK 저해제의 또 다른 작용으로 혈관내피세포를 이용한 연구에서 eNOS mRNA의 발현과 일산화질소의 생성을 증가시키는 것으로 보고되었으나^{20,21} 섬유주세포에 미치는 영향은 아직 밝혀지지 않았다. NO 역시 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하므로 ROCK 저해제가 혈관내피세포에서처럼 NO의 생성에 영향을 미친다면 ROCK 저해제에 의한 NO 생성 증가가 ROCK 저해제의 또 다른 작용기전이 될 수 있을 것이다.

ROCK 저해제가 섬유주와 섬모체를 모두 이완시킨다면 섬유주를 통한 방수유출을 상쇄시켜 안압하강효과가 미약할 것이지만, 원숭이와 사람의 섬유주 조직을 이용하여 ROCK 저해제가 섬유주의 수축에 미치는 영향을 연구한 논문에서 의하면 ROCK 저해제는 섬유주 조직을 이완시키지만 섬모체 조직에 미치는 영향은 적은 것으로 밝혀졌다.²²⁻³⁰ 따라서 ROCK 저해제는 섬유주에서 주로 작용을 나타낸다는 것을 알 수 있는데 본 연구에서는 섬유주세포를 교원질 겔에 봉입하여 Y-26732가 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 알아본 결과 유의하게 교원질 겔을 이완시켰다.

섬유주는 실렘관연접부를 경계로 실렘관과 접하고 있는데 실렘관내피세포를 단층으로 배양하여 투과도를 조사한 연구에서 ROCK 저해제는 실렘관단층세포층의 투과도를 유의하게 증가시키는 것으로 알려졌다.^{11,24} 본 연구에서는 ROCK 저해제가 섬유주의 투과도에 미치는 영향을 알아보

기 위하여 섬유주세포를 단층으로 배양한 다음 carboxy-fluorescein을 이용하여 투과도를 조사한 결과 Y-26732는 섬유주단층세포층의 투과도를 농도에 비례하여 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 ROCK 저해제가 실렘관내피세포뿐만 아니라 섬유주세포를 통한 투과도를 증가시킬 수 있음을 보여주고 있다.

NO 또한 섬유주를 이완시키는 작용을 나타내므로 본 연구에서는 섬유주세포에서 ROCK 저해제가 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였는데, Y-26732는 노출 1일째와 3일째에 모두 농도에 비례하여 유의하게 NO의 생성을 증가시켰으며, 100 μM의 농도에서 eNOS mRNA의 발현이 증가하였다. 따라서 ROCK 저해제의 작용기전에 있어 NO의 생성을 촉진하여 섬유주를 이완시키고 투과도를 증가시킬 가능성도 있을 것이다. 비록 본 실험에서는 eNOS 단백질을 정량하지는 못했으나 본 실험의 결과는 ROCK 저해제가 인체의 섬유주세포에서 eNOS의 발현을 증가시켜 NO의 생성을 증가시킴으로써 방수유출을 촉진할 가능성이 있음을 보여주고 있다.³¹

결론적으로 ROCK 저해제는 기존의 작용기전인 섬유주의 이완과 실렘관연접부세포의 형태학적 변화와 더불어 섬유주세포에서의 eNOS mRNA의 발현과 NO 생성을 증가시킴으로써 섬유주를 통한 방수유출을 증가시키는 작용을 할 가능성이 있으며 향후 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 2) Rohen JW, Lütjen-drecoll E, Flügge C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle

- glaucoma (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 3) Schmidl D, Schmetterer D, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Pharmacotherapy of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;31: 63-77.
- 4) Kocczynski CC, Epstein DL. Emerging trabecular outflow drugs. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30:85-7.
- 5) Inoue T, Tanihara H. Rho-associated kinase inhibitors: a novel glaucoma therapy. *Prog Retin Eye Res* 2013;37:1-12.
- 6) Hein TW, Rosa RH Jr, Yuan Z, et al. Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1583-90.
- 7) Okamura N, Saito M, Mori A, et al. Vasodilator effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:207-12.
- 8) Meyer-ter-Vehn T, Sieprath S, Katzenberger B, et al. Contractility as a prerequisite for TGF-beta-induced myofibroblast trans-differentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4895-904.
- 9) Honjo M, Tanihara H, Kameda T, et al. Potential role of Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5549-57.
- 10) Thieme H, Nuskovski M, Nass JU, et al. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4240-6.
- 11) Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1029-37.
- 12) Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:137-44.
- 13) Novack GD. Rho kinase inhibitors for the treatment of glaucoma. *Drugs Future* 2013;38:107-13.
- 14) 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.
- 15) 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*, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1998; v. 45. chap. 7.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Dismuke WM, Mbadugha CC, Ellis DZ. NO-induced regulation of human trabecular meshwork cell volume and aqueous humor outflow facility involve the BKCa ion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1378-86.
- 19) Sanka K, Maddala R, Epstein DL, Rao PV. Influence of actin cytoskeletal integrity on matrix metalloproteinase-2 activation in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2105-14.
- 20) Ming X-F, Viswambharan H, Barandier C, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:8467-77.
- 21) Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;106:57-62.
- 22) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 23) Liu XD, Skold CM, Umino T, et al. Sodium nitroprusside augments human lung fibroblast collagen gel contraction independently of NO-cGMP pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L1032-8.
- 24) Kameda T, Inoue T, Inatani M, et al. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:3092-103.
- 25) Green, LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-8.
- 26) 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.
- 27) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 28) Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005;97:1232-5.
- 29) Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C661-8.
- 30) Nakajima E, Nakajima T, Minagawa Y, et al. Contribution of ROCK in contraction of trabecular meshwork: proposed mechanism for regulating aqueous outflow in monkey and human Eyes. *J Pharm Sci* 2005;94:701-8.
- 31) Kim HY, Kim JW. Effect of nitric oxide on the permeability of trabecular meshwork cell monolayer. *J Korean Ophthalmol Soc* 2015; 56:771-5.

= 국문초록 =

섬유주세포에서 Rho Kinase 저해제가 일산화질소의 생성에 미치는 영향

목적: 섬유주세포에서 Rho kinase (ROCK) 저해제가 일산화질소의 생성과 일산화질소합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 사람의 섬유주세포를 일차배양한 후 ROCK 저해제인 Y-27632를 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M의 농도로 노출시킨 후 1일, 3일째에 Griess assay를 이용하여 일산화질소의 생성량을 측정하였다. 노출 1일째에 섬유주단층세포층의 투과도와 교원질 겔의 수축에 미치는 영향을 조사하였고, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 eNOS mRNA의 발현 정도를 측정하였다.

결과: 10 μ M, 100 μ M 농도의 Y-27632는 24시간 노출 후 섬유주단층세포층의 투과도를 농도에 비례하여 유의하게 증가시켰으며(all $p=0.001$), 교원질 겔을 이완시켰다. 또한 Y-27632는 1일과 3일째 모두 일산화질소의 생성량을 증가시켰으며(각각 $p=0.020$, 0.001), eNOS mRNA의 발현도 함께 증가하였다($p=0.039$).

결론: 섬유주세포에서 ROCK 저해제가 섬유주를 통한 방수유출을 증가시키는 기전에 있어서 일산화질소의 생성 증가가 관여할 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2016;57(4):650-656〉
