

망막신경절세포에서 헴산화효소 발현에 의한 Betaxolol의 세포보호효과

Neuroprotective Effects of Betaxolol Mediated by Heme Oxygenase-1 Induction in RGC-5

차재봉¹ · 권민영² · 정수월² · 우제문¹

Jae Bong Cha, MD¹, Min Young Kwon, MD, PhD², Su Wol Chung, MD, PhD², Je Moon Woo, MD, PhD¹

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 안과학교실¹, 울산대학교 자연과학대학 생명과학교실²

Department of Ophthalmology, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine¹, Ulsan, Korea
Biological Sciences, University of Ulsan College of Natural Science², Ulsan, Korea

Purpose: To evaluate the neuroprotective effects of betaxolol (betaxolol hydrochloride) under hypoxic conditions using retinal ganglion cells (RGC-5) and determine whether heme oxygenase-1 (HO-1) expression exerts cytoprotective effects.

Methods: In this study, cultured RGC-5 cells were incubated with different concentrations of betaxolol hydrochloride (0.1 μ M, 1 μ M or 5 μ M) and with 10 μ M zinc protoporphyrin (ZnPP), in a hypoxia incubator (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) for 48 hours and the cell viability of each group was determined. Additionally, cell viability was measured after RGC-5 cells were incubated with 5 μ M of brinzolamide (Azopt[®]), brimonidine tartrate (Alphagan[®]) or travoprost (Travatan[®]). RGC-5 cells were divided into three groups and incubated under three different conditions, normoxia group (20% O₂, 5% CO₂), hypoxia group (1% O₂, 5% CO₂) and the group with 5 μ M of Betoptic S[®] treated under hypoxic conditions (hypoxia, Betoptic S[®]). After incubation for 4, 8, 12 and 24 hours, HO-1 expression was analyzed using Western blotting.

Results: Cell viability significantly increased in RGC-5 cells treated with Betoptic S[®] compared with other antiglaucoma agents. Increased levels of HO-1 expression indicate its relevance in cell viability. Furthermore, increased RGC-5 cell viability by Betoptic S[®] was significantly reduced in the HO-1 inhibitor ZnPP-treated group.

Conclusions: We reaffirmed the known cytoprotective effects of Betoptic S[®] and the results suggests that HO-1 expression exerts cytoprotective effects against hypoxia.

J Korean Ophthalmol Soc 2016;57(1):113-119

Key Words: Betaxolol, Heme oxygenase-1, Hypoxia, Retinal ganglion cells

■ Received: 2015. 7. 17. ■ Revised: 2015. 8. 12.

■ Accepted: 2015. 10. 15.

■ Address reprint requests to **Je Moon Woo, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Ulsan University Hospital, #877
Bangeojinsunhwando-ro, Dong-gu, Ulsan 44033, Korea
Tel: 82-52-250-7177, Fax: 82-52-250-7174
E-mail: limbus68@naver.com

* This study was presented as an e-poster at the 112th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2014.

Betaxolol hydrochloride (Betoptic S[®], Alcon Inc., Fort worth, TX, USA, 베틱픽[®])은 선택적 β_1 -adrenoceptor 길항제로서 전신 부작용이 비교적 적기 때문에 녹내장 치료약제로 널리 사용되고 있다. 비특이적 막-안정화, 섬모체상피의 교감 신경 말단을 차단, 섬모체의 순환을 방해하는 것에 의하여 안압하강 효과를 나타내며 칼슘통로차단제로써 작용하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 또한 베틱픽[®]은 결막조직을 침투하여 테논낭하에서 축적되기 때문에 장기간의 사용을 거칠 때 일일 치료용량 이상으로 축적되어 구후까지 전달되어

황반부의 미세순환 및 대사를 향상시키며 이온 의존적 L-형 전압의존성 칼슘 통로와 나트륨 통로에 직접 작용하여 신경세포로 유입되는 칼슘이온과 나트륨이온의 양을 감소시킨다.^{1,2} 망막 신경세포는 빛에 지속적인 노출로 인해 고도의 산소를 필요로 하여 산화스트레스에 노출되어 있으며, 산화스트레스에 의한 세포사와 세포내로의 칼슘이온의 유입은 긴밀하게 관련되어 있다. 현재까지 연구에 따르면 β -adrenoceptor 길항제와 같은 L-형 전압의존성 칼슘통로차단제와 나트륨통로차단제는 뇌신경조직의 허혈에 반응하여 이를 복구하려는 작용을 가지며, 망막신경절세포(Retinal ganglion cell, RGC-5) 및 다른 신경세포에도 같은 기전으로 작용하여 허혈성 환경에서 신경보호효과를 가진다고 알려져 있다.^{3,4} 그리고 세포(*in vitro*) 실험뿐만 아니라 많은 동물모델 연구에서도 베티프릭®이 저산소 환경에서 신경보호 효과를 가진다는 사실이 알려져 있다.⁵

저산소 상태, 산화스트레스에 중요한 역할을 하는 스트레스 단백질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 중에서도 최근 많은 연구가 진행되고 있는 효소 중 하나가 바로 헴산화효소(Heme oxygenase, HO)이다. HO는 헴(Heme)의 이화작용에서 반응속도를 제어하는 효소로서 한 개의 헴 분자를 이가철 이온(Fe^{2+}), 빌리버딘(Biliverdin), 일산화탄소(CO)로 분해한다.⁶ 이가철 이온은 페리틴 생성을 유도하여 펜톤반응에 의해 유발되는 산화를 감소시키고,⁷ 빌리버딘 역시 빌리루빈(Bilirubin)으로 전환되어 항산화효과를 가지는 것으로 밝혀졌다,⁸ 일산화탄소는 항염증 작용, 혈소판 응집 억제 등의 작용을 가진다.⁹⁻¹¹

저산소 환경에서 베티프릭®이 가지는 세포보호효과와 관련한 기존의 많은 연구 중에서는 HO-1 발현과의 연관성에 대한 연구가 없는 상태이다. HO-1은 다양한 조직 및 세포에서 항염증, 항산화 등의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있어 다양한 질병의 타깃으로 주목 받고 있다. 한편 녹내장에서 미토콘드리아의 기능이상으로 인한 산화스트레스가 중요한 병인으로 작용한다. 본 연구에서는 베티프릭®의 세포보호효과의 많은 기전 중 하나로서 산화스트레스와 관련된 HO-1이 중요한 역할을 할 것이라는 가설 아래, 저산소 조건에서 RGC-5를 이용한 베티프릭®의 HO-1 발현 유도에 따른 세포보호효과를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

RGC-5 배양과 분화

RGC-5 (ATCC, Manassas, VA, USA)는 1% Penicillin-streptomycin glutamine과 10% Fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium;

GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 96 well plate에 0.5×10^4 cell/well의 RGC-5를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 12시간 동안 배양하였고 100 nM staurosporine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 2시간 동안 처리하여 RGC-5를 분화 유도시켰다.

저산소 상태 유도 및 세포 생존율 측정

각 약물의 RGC-5에 대한 독성은 CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTT) assay 방법으로 분석하였다. 그리고 Betaxolol hydrochloride (Betoptic S®, Alcon, Fort Worth, TX, USA, 베티프릭®) 및 세가지 다른 기전의 녹내장 점안제인 Brinzolamide (Azopt®, Alcon, Fort Worth, TX, USA, 아좁트®), Brimonidine tartrate (Alphagan®, Allergan Inc., Irvine, CA, USA, 알파간®), Travoprost (Travatan®, Alcon, Inc, Frimley, Camberley, UK, 트라바탄®)를 이용한 비교 실험을 위해 배양 및 분화된 RGC-5에 아좁트®, 알파간®, 트라바탄®을 각각 5 μ M로 처리하였다.

한편 베티프릭®을 농도별(0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M)로 처리하거나 10 μ M ZnPP (Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA, USA)와 함께 처리한 후 저산소 배양기(1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂)에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후, well당 20 μ L의 MTT solution (5 mg/mL PBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 첨가하여 37°C, 1% O₂, 5% CO₂ 조건하에서 2-4시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 함께 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포생존율을 백분율로 나타내었다. 베티프릭®과 다른 녹내장 점안제 간의 비교 실험도 같은 방법으로 세포생존율을 측정하였다.

HO-1 발현

Western blotting을 위한 단백질 시료의 추출은 시간별로 세포를 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후, Protease inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 첨가한 RIPA buffer (Tris/Cl [pH 7.6]; 100 mM/L, EDTA; 5 mM/L, NaCl; 50 mM/L, b-glycerophosphate; 50 mM/L, NaF; 50 mM/L, Na₃VO₄; 0.1 mM/L, NP-40; 0.5%, Sodium deoxycholate; 0.5%)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000×g에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 각 시료의 단백질 정량은 BCA

protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 동일한 양의 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gels로 분리시킨 후, 단백질을 Immun-Blot® Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 Blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 Tris-buffered solution [TBS] 용액)에서 2시간 동안 반응시킨 후, 1차 항체인 HO-1 (Abcam, Cambridge, UK), β -actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 가하여 12시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액으로 5분간 2번 세척한 다음, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 반응시켰다. 이어서 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 반응시킨 후 X-ray film상에서 HO-1을 확인하였다. 그리고 정상산소 조건(20% O₂, 5% CO₂), 저산소 조건(1% O₂, 5% CO₂), 저산소 조건에서 베톱틱® 5 μ M로 추가 처리한 조건(1% O₂, 5% CO₂, 베톱틱® 처리)으로 나누어 각각 4시간, 8시간, 12시간, 24시간에 Western blotting을 하여 HO-1의 발현 정도를 비교 측정하였다. Western blotting의 결과에 대하여 Image J software로 β -actin 대비 HO-1의 상대적 밴드 밀도비율을 정량화하였다. 데이터는 평균 및 표준편차로 제시되었으며, 동일 그룹에서 시간에 따른 비교를 하기 위하여 Student's paired *t*-test를 사용하였다. 이외의 실험에서는 Student's two-tailed unpaired *t*-test를 사용하였다. 유의한 통계학적 차이는 *p*<0.05인 경우로 해석하였으며 통계 분석에 사용된 프로그램은 SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

저산소 환경에서 다른 종류의 녹내장 점안제와 비교하여 베톱틱®이 RGC-5의 생존에 미치는 영향

RGC-5에 100 nM STD (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)를 2시간 동안 첨가한 후 정상 산소 조건에서 배양된 대조군의 생존율을 100%로 하였을 경우, 저산소 조건에 48시간 노출된 RGC-5의 생존율은 51.02 ± 0.81%로 감소하였다. 한편 저산소 조건에 48시간 노출된 RGC-5에 아좁트®, 알파간®, 그리고 트라바탄®을 처리하였을 경우, 각각 세포의 생존율이 61.22 ± 0.92%, 58.67 ± 1.92%, 그리고 34.18 ± 0.82%로 저산소 조건에 의한 세포 생존율의 감소에 효과가 없거나 오히려 생존율을 다소 감소시켰다. 그러나 이와 대조적으로 베톱틱®을 처리하고 저산소 조건에 48시간 배양하였을 때 세포의 생존율은 95.92 ± 1.22%로 정상 산소

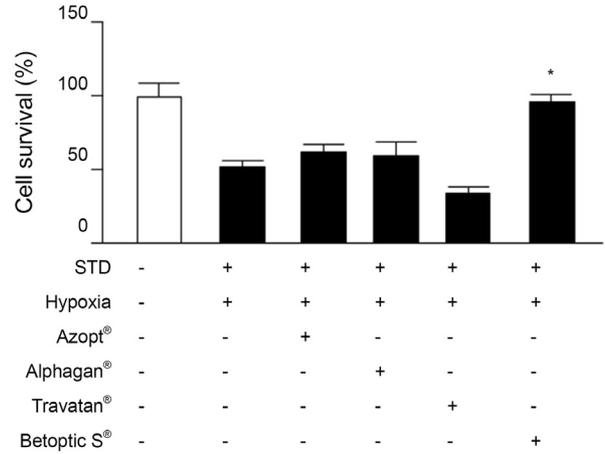


Figure 1. Comparison of retinal ganglion cell (RGC-5) survival rates with anti-glaucomatous agent after 48 hours. Addition of 5 μ M of betaxolol hydrochloride increased cellular survival (-STD: before preconditioning; +STD: after preconditioning). STD = stauroporine; Azopt® = brinzolamide; Alphagan® = brimonidine tartrate; Travatan® = travopost; Betoptic S® = betaxolol hydrochloride. **p* < 0.05 by student's paired *t*-test.

조건에서 배양된 대조군과 거의 비슷한 수준으로 세포의 생존율이 증가하였다(Fig. 1).

저산소 환경에서 베톱틱®의 농도별 처리에 따른 RGC-5 생존율 비교

대조군과 베톱틱® 5 μ M 처리한 군을 48시간 배양한 후 광학 현미경으로 촬영 후 베톱틱® 처리군에서 단위면적당 분화된 RGC-5 수가 대조군과 비교해서 확연하게 많다는 것을 육안적으로 확인하였다(Fig. 2).

RGC-5의 생존율에서 베톱틱®의 농도에 따른 효과를 검증하기 위해 RGC-5에 100 nM STD를 2시간 동안 첨가한 후 베톱틱®을 농도별(0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M)로 처리하여 저산소 조건에서 48시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 비교하였다. 정상 산소 조건의 대조군 생존율(100%)과 비교하여 저산소 조건의 생존율은 55.10 ± 1.02%, 저산소 조건에 베톱틱® 0.1 μ M, 1 μ M, 그리고 5 μ M를 처리하였을 경우, 각각 세포의 생존율은 70.41 ± 0.91%, 93.37 ± 1.34%, 그리고 114.80 ± 1.13%로서 베톱틱®의 농도가 증가함에 따라 RGC-5의 세포생존율도 증가하였다(Fig. 2).

저산소 상태의 RGC-5에서 베톱틱®이 HO-1 발현에 미치는 영향

RGC-5에 100 nM STD 2시간 처리한 후, 정상산소 조건(20% O₂, 5% CO₂), 저산소 조건(1% O₂, 5% CO₂), 저산소 조건에서 베톱틱® 5 μ M로 추가 처리한 조건(1% O₂, 5%

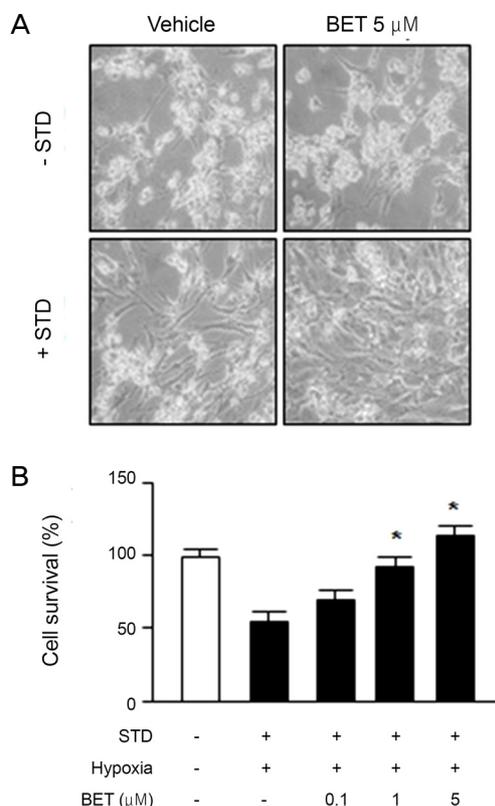


Figure 2. Survival rates and microscopic finding of retinal ganglion cells compared to BET concentration. (A) Control and BET 5 μM-treated group cultured for 48 hours and then taken by an optical microscope magnification 40 times without stain (-STD: before preconditioning; +STD: after preconditioning). (B) Effect of BET on the survival of retinal ganglion cell (RGC-5) compared to BET concentration (Hypoxia: 5% CO₂, 1% O₂). STD = stauroporine; BET = Betoptic S[®]. * *p* < 0.05 by student's paired *t*-test.

CO₂, 베틀틱[®] 처리)으로 나누어 각각 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 후 Western blotting으로 HO-1의 발현 정도를 비교하였다(Fig. 3). 정상산소 조건에서는 β-actin에 대한 HO-1의 비율에 대하여 STD를 처리하지 않았을 때의 비율을 1로 보았으며, HO-1/β-actin의 비율은 4시간, 8시간 후에 1.51, 2.04로 HO-1 발현이 순차적으로 증가하는 양상을 보이다가 12시간 후에 1.57로 감소하는 양상을 보였다. 반면, 저산소 조건에서 HO-1/β-actin의 비율은 4시간, 8시간 후에 0.61, 0.59로 매우 약하게 발현되다가 12시간 이후부터는 0.2로 HO-1의 발현이 거의 관찰되지 않았다. 그러나 저산소 조건에서 베틀틱[®] 5 μM로 추가 처리한 조건에서 HO-1/β-actin의 비율은 12시간 후에 2.63을 최대로 증가하며 그 이후에는 감소되는 양상을 보였다. 저산소 조건과 저산소 조건에서 베틀틱[®] 5μM을 추가 처리한 조건을 비교할 때 4시간(*p*=0.000), 8시간(*p*=0.0003), 12시간(*p*=0.0014) 후에는 유의하게 감소하였으며 24시간(*p*=0.053) 후에는 유의하지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 3).

베틀틱[®]에 의해 증가된 HO-1과 RGC-5 세포 생존율과의 상관관계를 분석하기 위해 HO-1 억제제인 Zinc protoporphyrin-IX (ZnPP)과 베틀틱[®]을 처리하여 베틀틱[®]에 의한 저산소 조건에서 감소된 RGC-5 세포 생존을 회복 효과에 대한 HO-1의 역할을 검증하였다. 한편 RGC-5에 100 nM STD를 2시간 동안 처리한 후 저산소 조건에서 48시간 동안 배양한 경우와 동일 조건에서 베틀틱[®] 5 μM 처리군, 그리고 HO-1 억제제인 ZnPP 10 μM과 베틀틱[®] 5 μM 처리군(ZnPP+베틀틱[®]군)에서 각각의 RGC-5 세포 생존율을 비

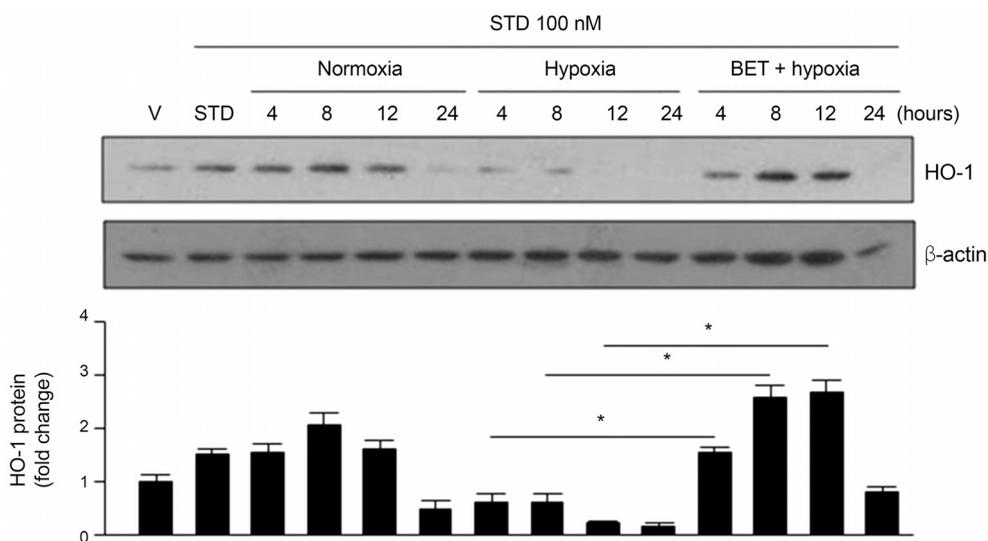


Figure 3. Expression of HO-1 in accordance with the period in control group, hypoxia group, hypoxia and BET-treated group. Histogram presents the ratio of HO-1/β-actin expression. Western blotting was analyzed by the Image J software (Normoxia: 5% CO₂, 20% O₂; Hypoxia: 5% CO₂, 1% O₂). STD = stauroporine; BET = Betoptic S[®] 5 μM; HO-1 = heme oxygenase-1. * *p* < 0.05 by student's unpaired *t*-test.

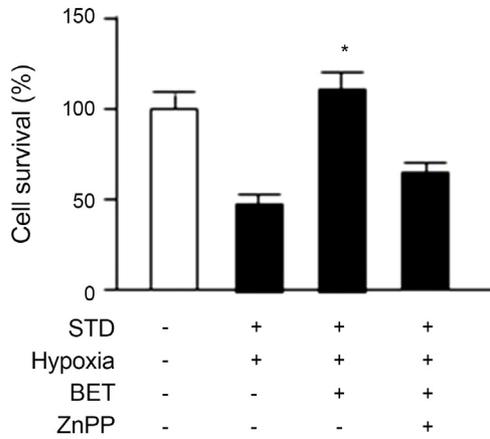


Figure 4. Effect of HO-1 inhibitor on cell survival rates after addition of BET. When compared to non-addition of HO-1 inhibitor (ZnPP), Increased retinal ganglion cell (RGC-5) due to BET neuroprotective effect was reduced after addition of HO-1 inhibitor (ZnPP; -STD, -Hypoxia, -BET and -ZnPP: before preconditioning; +STD, +Hypoxia, -BET and -ZnPP: just after the preconditioning). STD = stauroporine; BET = Betoptic S®; ZnPP = zinc protoporphyrin 10 μM; HO-1 = heme oxygenase-1. * $p < 0.05$ by student's paired *t*-test.

교하였다. 정상 산소 조건의 대조군 생존율(100%)과 비교하여, 저산소 조건군에서 세포 생존율은 $48.47 \pm 0.93\%$ 로 감소하였고, 베티렉®군에서 세포 생존율은 $112.27 \pm 1.21\%$ 증가되었으나, ZnPP+베티렉®군에서 세포 생존율은 $64.29 \pm 0.87\%$ 로 감소되었다(Fig. 4).

고 찰

망막신경절세포의 손상 또는 사멸은 결국 시야결손이나 시력저하를 유발하므로 이에 대한 예방 및 치료를 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 안압상승, 저산소증, 글루타민의 증가, 과량의 산화질소 등과 같은 여러 가지 스트레스 인자에 망막신경절세포가 노출될 때 나타나는 반응에 대한 연구를 비롯하여 이러한 반응작용, 즉 시신경보호작용에 관여하는 방어기전과 그와 관련한 다양한 물질들에 대한 연구가 최근 많은 조명을 받고 있다.

선택적 β_1 -adrenoceptor 길항제로서 전신 부작용이 비교적 적은 녹내장 치료약제로 널리 사용되고 있는 베티렉® (betaxolol hydrochloride)이 신경보호효과를 가지고 있다는 사실 및 기전에 대하여 기존의 많은 연구에서 밝혀졌다. 저산소 상태에서 베티렉®의 신경보호효과에는 이온 통로에 대한 작용 이외에도 다양한 기전이 있음이 여러 연구에서 밝혀지고 있다. 동물 실험을 통하여 베티렉®이 aspartate aminotransferase의 활성을 감소시켜 신경보호효과를 가지

며, 세포내 칼슘의 유출을 저해한다는 연구가 있으며,¹² 베티렉®을 점안하였을 때 산화스트레스에 반응하여 내망상층 두께의 감소 및 망막 콜린아세틸전환효소의 면역학적 활동이 저하됨이 확인되었다.⁵ N-methyl-D-aspartate 수용체(NMDA receptor)의 기능을 직접 억제하여 신경보호효과를 가진다는 연구도 있다.¹³ 그리고 β -adrenoceptor 길항제는 항산화 효과를 가져 저산소 상태, 산화스트레스에 대응한다고 알려져 있다.¹⁴

한편 인체 내 산화스트레스에 대한 세포방어기전에 관하여 가장 잘 알려져 있는 물질 중 하나인 HO에 대하여 세 가지 isoform이 발견되었으며, 이 중 HO-1은 인체 장기 전반에 걸쳐 분포되어 있고, 산화스트레스를 포함한 다양한 자극에 반응하여 생성이 증가되며, 또한 망막신경절 세포에서 HO-1의 증가에 의한 세포보호효과가 잘 알려져 있다.^{15,16} 자외선조사, 과산화수소, Cytokine, 저산소증, Glutathione (GSH) 소모 등에 의해 발현이 증가되는 것이 확인되었다.^{17,18} 망막신경절 세포에서는 Glutamate oxidative injury, 저산소증, 과산화수소에 의해 HO-1의 발현이 증가된다는 연구결과들이 있다.^{19,20} 한편 HO-2 역시 인체 장기 전반에 고루 분포되어 있으며 특히 뇌에 많이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 HO-2는 HO-1을 유도하는 어떤 외부 자극에도 반응하지 않는 특징이 있다.²¹ HO-3는 HO-1, HO-2와는 달리 촉매작용이 거의 없으나 산소에 반응하여 특정한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.²²

본 연구 역시 베티렉®의 신경보호효과를 확인하고 이와 관련한 기전에 대한 연구로서, 다만 기존 연구에서는 아직 밝혀진 바가 없는 베티렉®과 HO-1의 관련성에 초점을 맞추었다. 즉 베티렉®의 신경보호효과 과정에 스트레스 단백질로 알려져 있는 HO-1의 발현이 관여할 것이라는 가설을 세우고 저산소 상태의 망막신경절세포를 이용하여 이를 확인하고자 하였다.

본 연구는 몇 가지 단계로 진행되었다. 우선 베티렉®과 세 가지 다른 기전의 녹내장 점안제인 아즙트®, 알파간®, 트라바탄® 각각에 대하여 저산소상태에서의 세포보호효과를 비교하였다. 이를 위해서 각 집단의 세포 생존율을 비교하였으며 그 결과 베티렉®의 저산소상태에서 세포보호효과가 다른 세 가지 녹내장 점안제에 비해 월등히 높다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 한편 β -adrenoceptor 길항제 중 비선택적인 β -adrenoceptor 길항제인 Timolol, Metipranolol과 선택적 β_1 -adrenoceptor 길항제인 베티렉®의 신경보호효과 비교에서 베티렉®은 나머지 두 약제에 비해 신경보호효과가 우수하였다.²³ 그리고 베티렉®의 농도에 따른 신경보호효과의 정도를 알아보기 위한 실험에서는 5 μM의 베티렉® 농도에서 망막신경절세포 생존율이 가장 높았으며, 베티

토틱[®]의 농도에 비례하여 신경보호효과도 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2).

한편 베틱[®]의 신경보호효과의 기전 중 HO-1이 관여할 것이라는 가설을 검증하기 위해 저산소상태에서 베틱[®] 5 μ M 처리를 한 경우와 베틱[®] 5 μ M에 HO-1 억제제로 작용하는 ZnPP를 10 μ M 농도로 추가 처리한 경우를 비교한 실험에서는 ZnPP를 추가적으로 처리한 군의 세포생존율의 증가가 유의하게 낮았다. 이는 베틱[®]의 HO-1의 증가에 의한 세포보호 효과가 ZnPP로 인하여 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). 이러한 사실은 베틱[®]의 신경보호효과의 기전에 대한 기존의 연구에는 밝혀진 바가 없었던 사실로서 HO-1이 신경보호효과에 있어서 중요한 요소임을 시사한다.

HO-1은 스트레스 단백질로서 다양한 조건에 반응하여 생성이 증가되며 세포를 스트레스로부터 보호하는 역할을 하므로 정상 상태의 경우보다 저산소 상태에서 발현이 더 증가될 것이다. 그러나 본 실험에서 시행한 Western blotting의 결과(Fig. 3)는 이러한 예상과는 달리 어떠한 처리도 하지 않은 저산소 상태의 망막신경절세포에서 HO-1 발현이 오히려 감소하는 것처럼 보이는데, 이는 세포사멸로 인한 절대적인 세포 수의 감소에 의한 것으로 사료된다. 즉 정상 상태의 경우보다 저산소 상태에서 HO-1의 발현은 증가하나 세포사멸로 망막신경절세포의 총 수가 감소함으로 인하여 HO-1 발현의 전체적인 양은 감소하는 것처럼 보이는 것이다. 한편 HO-1의 발현은 세 경우(정상산소 조건, 저산소 조건, 저산소 조건에서 베틱[®] 5 μ M로 추가 처리한 조건) 모두 4시간에서 8시간까지는 점차 증가하다가 12시간부터 24시간으로 가면서 감소하는 경향을 보인다. 이에 대한 정확한 기전은 알 수 없지만 각 군에서 같은 경향을 보인다는 점에서 HO-1의 발현 정도는 세포손상이나 스트레스뿐만 아니라 이와는 별개로 시간경과에 따른 자연적인 발현 주기가 있음을 시사하며 이에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구로 베틱[®]의 저산소 스트레스에 대한 신경보호 효과가 다른 세 가지 녹내장 점안제에 비해 월등히 높다는 것, 신경보호효과의 기전에 HO-1이 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 실제로 본 약들을 점안한 경우와 실험적으로 처리한 경우는 다소 차이가 있을 수 있으며 신경보호효과의 기전에 HO-1 외에도 다른 기전이 관여할 수 있다는 점, 비교대상의 약에서 β -adrenoceptor 길항제 종류들 간의 비교는 없었다는 것이 한계점이다. Timolol, Betaxolol, Carteolol 등의 약에서 서로 차이를 보였던 연구도 있었으므로 본 연구를 접목해서 여러 가지 β -adrenoceptor 길항제를 포함하여 베틱[®]과 HO-1의 발현에 대한 좀 더 구체적인

실험을 통해 그 연관성을 정확히 밝히는 연구가 필요할 것으로 사료된다.²⁴ 또한 HO-1의 시간적 경과에 따른 발현 주기에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Hirooka K, Kelly ME, Baldrige WH, et al. Suppressive actions of betaxolol on ionic currents in retinal ganglion cells may explain its neuroprotective effects. *Exp Eye Res* 2000;70:611-21.
- 2) Kobayashi H, Kobayashi K, Okinami S. Randomized clinical trial of topical betaxolol for persistent macular edema after vitrectomy and epiretinal membrane removal. *Am J Ophthalmol* 2003;136:244-51.
- 3) Chidlow G, Melena J, Osborne NN. Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces Na(+) influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na(+) channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2000;130:759-66.
- 4) Kobayashi T, Mori Y. Ca²⁺ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 1998;363:1-15.
- 5) Cheon EW, Park CH, Kang SS, et al. Betaxolol attenuates retinal ischemia/reperfusion damage in the rat. *Neuroreport* 2003;14:1913-7.
- 6) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-55.
- 7) Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 2000;348 Pt 3:615-9.
- 8) Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, et al. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem* 2000;275:15166-73.
- 9) Peyton KJ, Reyna SV, Chapman GB, et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood* 2002;99:4443-8.
- 10) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
- 11) Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 2003;9:183-90.
- 12) Endo S, Tomita H, Ishiguro S, Tamai M. Effect of betaxolol on aspartate aminotransferase activity in hypoxic rat retina in vitro. *Jpn J Pharmacol* 2002;90:121-4.
- 13) Nagata T, Ueno S, Morita H, et al. Direct inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor function by antiglaucomatous beta-antagonists. *J Pharmacol Sci* 2008;106:423-34.
- 14) Melena J, Osborne NN. Metipranolol attenuates lipid peroxidation in rat brain: a comparative study with other antiglaucoma drugs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:827-33.
- 15) Bach FH. Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wien Klin Wochenschr* 2002;114 Suppl 4:1-3
- 16) Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Kato S. Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline. *Brain Res* 2013;1499:145-57.

- 17) Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988;2:2557-68.
- 18) McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-32.
- 19) Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, et al. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014; 92:1134-42.
- 20) Osborne NN, Ji D, Majid AS, et al. Glutamate oxidative injury to RGC-5 cells in culture is necrostatin sensitive and blunted by a hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative of aspirin (ACS14). *Neurochem Int* 2012;60:365-78.
- 21) McCoubrey WK Jr, Maines MD. The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 1994;139:155-61.
- 22) Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:558-67.
- 23) Wood JP, Schmidt KG, Melena J, et al. The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp Eye Res* 2003;76:505-16.
- 24) Yu ZK, Chen YN, Aihara M, et al. Effects of beta-adrenergic receptor antagonists on oxidative stress in purified rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2007;13:833-9.

= 국문초록 =

망막신경절세포에서 헴산화효소 발현에 의한 Betaxolol의 세포보호효과

목적: 망막신경절세포(Retinal ganglion cell, RGC-5)를 이용하여 Betaxolol hydrochloride (Betoptic S[®], 베티픽[®])의 저산소 환경에서 세포보호효과를 확인하고 여기에 헴산화효소-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 발현이 관여함을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: RGC-5에 Betaxolol hydrochloride를 농도별로 처리하거나 Zinc protoporphyrin (ZnPP)과 함께 처리한 후 저산소 배양기에서 48시간 동안 배양하여 세포생존율을 비교 측정하였다. 베티픽[®]과 다른 기전의 녹내장 점안제인 Brinzolamide (Azopt[®]), Brimonidine tartrate (Alphagan[®]), Travopost (Travatan[®])을 각각 5 μM로 RGC-5에 처리하여 같은 방법으로 저산소 배양하여 세포생존율을 비교 측정하였다. RGC-5에 정상산소 조건, 저산소 조건, 저산소 조건에서 베티픽[®] 5 μM로 추가 처리한 조건으로 나누어 시간에 따라 Western blotting을 하여 HO-1의 발현 정도를 비교하였다.

결과: 베티픽[®]은 다른 세 가지 녹내장 점안제에 비하여 저산소 조건하의 RGC-5 세포생존을 가장 유의하게 증가시켰으며, HO-1 발현 증가와 연관성이 있음을 확인하였다. 또한 HO-1 억제제 ZnPP를 첨가한 그룹에서 베티픽[®]에 의한 세포생존율 증가가 감소됨을 확인하였다.

결론: 베티픽[®]의 세포보호효과를 재확인하였으며, 보호효과에 대한 기전들 중 하나로서 HO-1의 발현이 관여함을 확인하였다.

(대한안과학회지 2016;57(1):113-119)
