

고포도당과 덱사메타손이 섬유주세포의 투과도에 미치는 영향

Effects of High Glucose and Dexamethasone on the Permeability in Trabecular Meshwork Cells

강선희 · 김재우

Sun Hee Kang, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: To investigate the effects of high glucose (HG) and dexamethasone (DEX) on the survival and permeability of trabecular meshwork cells (HTMC), and associated changes in tight junctions.

Methods: Primary cultured HTMC were exposed to 5 mM low glucose (LG) or 25 mM HG with or without 1.0 μ M DEX for 3 days. The permeability of the HTMC monolayer was assessed using carboxyfluorescein or transendothelial electrical resistance (TEER). Gene and protein expressions of claudin-5 and occludin were assessed with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

Results: HG was significantly associated with greater HTMC monolayer permeability compared to LG by both the carboxyfluorescein permeability test and TEER ($p = 0.022, 0.028$). HG also decreased claudin-5 and occludin mRNA expression, respectively (7.5%, 12.9%). DEX abolished HG-induced increased permeability, and increased the protein expression of claudin-5 and occludin, respectively ($p = 0.015, 0.012$).

Conclusions: In HTMCs, DEX reversed HG-induced permeability increase. DEX increased tight junction molecules claudin-5 and occludin. Thus, DEX-induced changes in junctional proteins could be another mechanism of increased resistance through the trabecular meshwork and may result in steroid-induced glaucoma.

J Korean Ophthalmol Soc 2018;59(3):252-260

Keywords: Dexamethasone, High glucose, Permeability, Tight junction, Trabecular meshwork

당뇨병이 있는 경우 녹내장이 발병할 위험이 높은 것으로 알려져 있고¹ 당뇨병이 있는 환자의 방수에서의 포도당 농도가 정상인에 비해 약 2배 정도 높다고 보고되어 있다.² 혈관내피세포를 배양한 연구에서 포도당의 농도가 높

은 경우 세포의 손상을 유발하며 혈관내피세포의 투과도에 영향을 미친다.³⁻⁶ 망막내피세포에서 고농도포도당(high glucose, HG)은 투과도를 증가시키며, 이러한 투과도의 증가는 세포 밀착연접(tight junction)의 변화와 관련이 있다.⁷⁻⁹ 망막과 맥락막 내피세포를 HG에 노출시키면 occludin과 claudin-5와 같은 밀착연접을 구성하는 분자의 감소가 동반되어 세포 주위를 통한 유출이 증가되며¹⁰ 합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손(dexamethasone, DEX)은 HG에 의해 유도된 망막 내피세포의 투과도 증가를 상쇄시킨다.¹¹

글루코코르티코이드는 섬유주에서도 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데¹² DEX를 장기간 노출시킬 경

■ Received: 2017. 6. 15. ■ Revised: 2017. 8. 1.

■ Accepted: 2018. 2. 13

■ 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

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2018 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.

우 섬유주세포의 변성을 유발하여 구조적 기능적 변화를 일으켜 안압상승을 유발하여 이차성개방각녹내장을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{13,14} 섬유주세포와 실렘관세포를 이용한 한 연구에서 DEX를 장기간 노출시킨 경우 섬유주세포를 통한 수리전도도(hydraulic conductivity)에 대한 저항이 증가되며 이때 세포결합에 관여하는 zonula occludens-1 (ZO-1) 유전자와 단백질 발현이 동반된다고 하였다.¹⁵

세포간 밀착연접(tight junction, TJ) 단백질은 occludin, claudin 그리고 세포막 경유단백 등이 있는데, 세포막 경유단백은 zonular occludens (ZO) 또는 cingulin과 같은 세포질 내 분자와 결합하여 작용을 나타낸다.¹⁶ 혈관내피세포의 경우 주된 TJ 단백질은 occludin과 claudin-5이며 이러한 단백질의 증가에 비례하여 단층세포층의 투과도가 감소하며 HG에 의해 망막내피세포층과 맥락막내피세포층의 투과도가 변화하는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 따라서 섬유주세포의 경우에도 HG에 노출되면 섬유주단층세포층의 투과도에 영향을 미칠 수 있으며, TJ를 기능적으로 구성하는 단백질인 occludin과 claudin-5의 발현에 영향을 줄 가능성이 있으나 이에 대해서는 아직 자세히 연구되지 않았다.

본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 HG에 노출시킨 다음 섬유주세포의 생존과 투과도에 미치는 영향을 알아보고, 이와 동반하여 TJ 단백질인 occludin과 claudin-5의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또한 HG에 의한 이러한 효과에 대해 DEX가 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양과 약물처리

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 받았고(승인번호: CR-17-013) 헬싱키 선언에 따라 시행되었다. 안구는 행에서 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 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신(Sigma, St. Louis, MO, USA) 처리하여 계대배양하였다.

일차배양한 섬유주세포를 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 다음 배지를 제거하고 나서 정상 상태의 세포배양에서 흔히 사용하는 5 mM low glucose (LG) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 비해 25 mM HG (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 미치는 영향을 알아보고자 3일간 각각 노출시켜 아래의 실험을 시행하였다. 또한 LG에 노출시킨 경우를 기준으로 HG에 의한 변화에 대해 DEX가 미치는 영향을 알아보기 위하여 1.0 µM DEX (Sigma, St. Louis, MO, USA)에도 노출시켜 비교하였다.

3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

세포의 생존에 대한 효과를 알아보기 위해 세포의 생존과 활성도 검사로 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT assay (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다.¹⁷ 각 농도의 포도당으로 3일간 처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 µL씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 µL씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Offenbourg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

섬유주단층세포층의 투과도 측정

일차배양한 인체의 섬유주세포를 트립신 처리한 후 12-well의 Transwell (Corning, No.3460, 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.^{18,19} 역위상차 현미경으로 섬유주세포가 단층으로 충만하게 자란 것을 확인한 후 혈청에 포함된 단백질 등의 영향을 배제하기 위하여 1% 우태아혈청을 포함한 배지로 교환한 다음 LG, HG, DEX에 3일간 각각 노출시킨 후 투과도 검사를 시행하였다. 내측 chamber에 자라고 있는 세포를 phosphated buffered saline (PBS)로 3회 세척한 다음 50 mM carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 노출시켰다. 노출 2시간 후 transwell을 통하여 외측 chamber로 투과된 carboxyfluorescein의 농도를 532 nm에서 Spectrofluorometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenbourg, Germany)로 측정하여 백분율로 나타내었다.

Transendothelial Electrical Resistance (TEER)의 측정
 섬유주단층세포층의 투과도를 측정하기 위한 또 다른
 방법으로 TEER을 측정하였다. 인체의 섬유주세포를 12
 well의 transwell insert에 각각 2×10^4 농도로 분주한 다음
 배양하여 충분한 배양된 세포를 확인 후, 각각의 포도당
 과 DEX에 3일간 노출시킨 후 epithelial volttohmmeter
 (EVOM², World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)
 를 이용하여 TEER 값을 측정하였다.^{20,21} 측정된 TEER 값
 과 plate의 면적을 이용하여 단위 면적당 TEER 값($\Omega \text{ cm}^2$)
 을 계산하였다.

Occludin mRNA와 Claudin-5 mRNA의 발현 측정

각 약물에 노출시킨 섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen,
 Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리된
 RNA에서 occludin mRNA와 claudin-5 mRNA의 발현을
 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
 을 이용해 확인하였다. 섬유주세포에서 분리한 RNA와
 Oligo dT primer, Nuclease-free water (Invitrogen, Carlsbad,
 CA, USA)를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C
 에 5분간 변성시키고 얼음에 5분간 둔 다음 Prime RT pre-
 mix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간,
 70°C에서 10분간 반응시켜 cDNA로 합성하였다. 합성한
 cDNA에 2X GoTaq Green Master Mix (Promega,
 Fitchburg, WI, USA)와 10 pM의 primer (claudin-5; for-
 ward primer, GCC ACC GCT TTT TGC CAG A, 139 bp;
 reverse primer TCC CAG CAC TGT CTC TCT CAT, 139
 bp, and occludin; forward primer, AAG GTT CCA TCC
 GAA GCA GG, 252 bp; reverse primer, GGG AGT GTA
 GGT GTG GTG TG, 252 bp)를 각각 혼합하여 DNA
 Engine 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
 polymerase chain reaction (PCR) 산물을 1% agarose gel에
 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm,
 Tokyo, Japan)을 이용하여 각각 분석하였다. 이때 β -actin
 을 internal standard로 사용하였다.

Western blotting

단백질 추출에는 RIPA buffer (Thermoscientific, Carlsbad,
 CA, USA)를 사용하였다. Cell lifter (Corning, Acton, MA,
 USA)로 세포를 모아 4°C에서 1,200 rpm으로 10분 동안 원
 심 분리하여 상층액을 모아 -80°C에 보관하였다. 단백질량은
 BCA protein assay reagent kit (Thermoscientific, Carlsbad,
 CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

정량한 샘플을 같은 양으로 NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel
 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 전기영동한 후 Xcell
 Surelock (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 니
 트로셀룰로오스 막(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 1시
 간 transfer하였다. Transfer가 끝난 니트로셀룰로오스 막을
 세척한 후, 막 차단 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
 에서 1시간 동안 정치배양하였다. 준비된 막에 claudin-5
 (Santacruz, Dallas, TX, USA)와 occludin (Santacruz, Dallas,
 TX, USA)을 각각 막 차단 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA,
 USA)에 1:1,000으로 희석하여 처리하고 4°C에서 24시간
 반응시킨 후 세척하고 Goat Anti-rabbit horseradish perox-
 idase (HRP)-conjugated된 이차 항체(Santacruz, Dallas, TX,
 USA)를 막 차단 용액에 1:3,000으로 희석하여 처리하고 상온
 에서 1시간 반응시켰다. 항체를 반응시킨 막을 SuperSignal
 West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermoscientific,
 Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 Gel Doc XR+ (Bio-rad,
 Hercules, CA, USA)으로 단백질 발현량을 확인하였다. 이때
 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 in-
 ternal standard로 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였
 고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였다. 세포의
 생존과 투과도, TEER은 평균 \pm 표준오차로 나타내어 un-
 paired *t*-test를 사용하여 유의성을 비교하였으며 유의수준
 은 5%로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유
 주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인
 은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분
 지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를
 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주
 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주
 세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{22,23}

섬유주세포의 생존에 미치는 영향

3일간 LG, HG, DEX에 노출시킨 후 세포의 생존에 미
 치는 영향을 측정하기 위해 시행한 MTT assay에서 LG에
 노출시킨 경우에 비해 HG에 노출시킨 경우 세포의 생존
 이 $92.8 \pm 2.1\%$ 로 유의하게 감소하였다($p=0.023$) (Fig. 1).
 LG, HG에 DEX를 첨가한 경우 세포의 생존에 유의한 차

이를 보이지 않았으며($p>0.05$), DEX에 동시에 노출시킨 경우를 비교해 보면 LG와 함께 노출시킨 경우에 비해 HG에 함께 노출시킨 경우 세포의 생존이 유의하게 감소하였다($p=0.018$).

섬유주단층세포층의 투과도와 저항도에 미치는 영향

LG에 노출시킨 경우에 비해 HG에 노출시킨 경우 carboxyfluorescein의 섬유주단층세포층의 투과도가 $8.81 \pm 3.2\%$ 높게 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p=0.022$) (Fig. 2). 또한 LG와 HG에 DEX를 동시에 노출시킨 경우 LG와 HG에서 섬유주단층세포층의 투과도가 각각 94.99

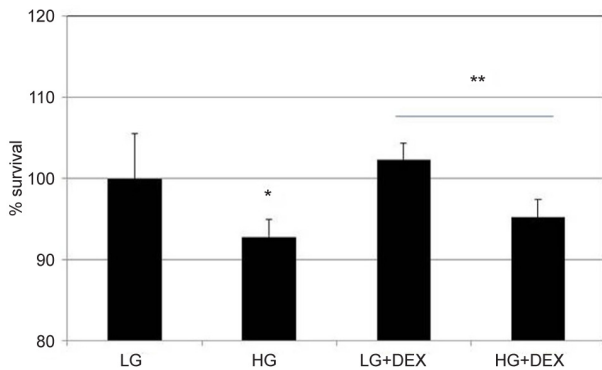


Figure 1. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μ M, DEX) on the survival of trabecular meshwork cells. HG showed decreased the cellular survival significantly compared to LG. With co-exposure to DEX, HG also decreased the cellular survival compared to LG (*, **; $p < 0.05$).

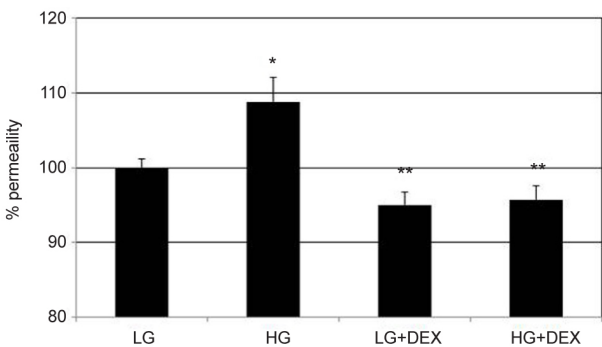


Figure 2. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μ M, DEX) on the permeability of carboxyfluorescein through the trabecular meshwork cell monolayer. Exposure to HG showed a greater permeability of carboxyfluorescein significantly compared with LG (* $p = 0.022$). The permeability of LG and HG was significantly decreased when co-exposed to DEX, respectively (* $p = 0.023$, 0.048). Carboxyfluorescein intensity of outer chamber normalized to the mean value obtained using non-exposed control (permeability 100%).

$\pm 1.7\%$ 와 $95.73 \pm 1.9\%$ 로 유의하게 적게 나타났으며($p=0.023$, 0.048), HG에 DEX를 함께 노출시킨 경우에는 LG에 DEX를 함께 노출시킨 경우에 비해 LG와 HG 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.068$).

LG에 노출시킨 경우 TEER은 $38.56 \pm 4.8 \Omega \text{ cm}^2$ 였으며, HG에 노출시킨 경우에는 $34.75 \pm 2.3 \Omega \text{ cm}^2$ 로 유의하게 저항도가 작게 나타났다($p=0.028$) (Fig. 3). 그러나 LG와 HG에 DEX를 동시에 노출시킨 경우에는 LG 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 각각 유의한 차이를 나타내지 않았다($p=0.529$, 0.668). 한편 HG를 단독으로 노출시킨 경우에 비해 HG와 DEX를 동시에 노출시킨 경우 저항

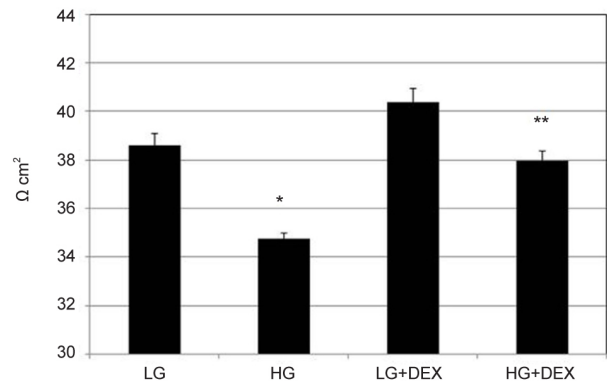


Figure 3. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μ M, DEX) on the transepithelial electrical resistance of the trabecular meshwork cell monolayer. HG showed a smaller resistance significantly compared to LG (* $p = 0.028$). Co-exposure to HG with DEX showed a greater resistance significantly compared to HG (** $p = 0.045$).

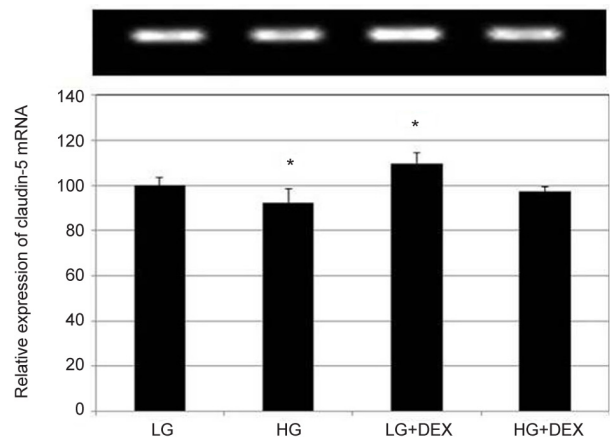


Figure 4. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μ M, DEX) on the expression of claudin-5 mRNA in trabecular meshwork cells. Exposure to HG showed a smaller expression of claudin-5 mRNA compared to LG. Expression of occludin mRNA was increased significantly by adding to DEX to LG (* $p < 0.05$). β -actin was used as internal standard.

도가 $37.88 \pm 1.4 \Omega \text{ cm}^2$ 로 높게 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p=0.045$).

Claudin-5와 occludin의 mRNA 발현에 미치는 영향

LG에 노출된 경우와 비교하여 claudin-5 mRNA의 발현은 HG에 노출된 경우 7.5% 더 낮았으며 LG에 DEX를 함께 노출시킨 경우는 LG 단독 노출보다 claudin-5 mRNA의

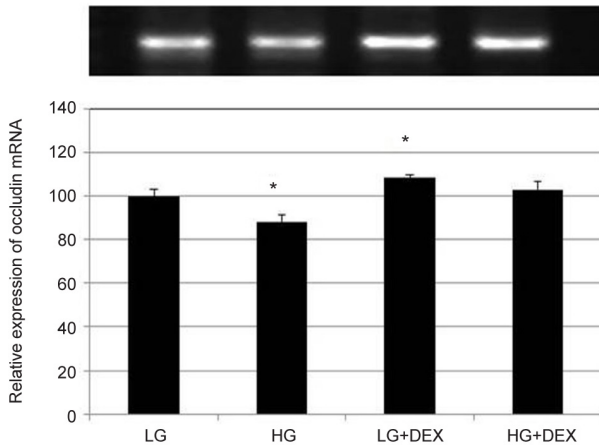


Figure 5. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μM , DEX) on the expression of occludin mRNA in trabecular meshwork cells. Exposure to HG showed a smaller expression of occludin mRNA significantly compared to LG. Expression of occludin mRNA was increased significantly by adding to DEX to LG ($p < 0.05$). β -actin was used as internal standard.

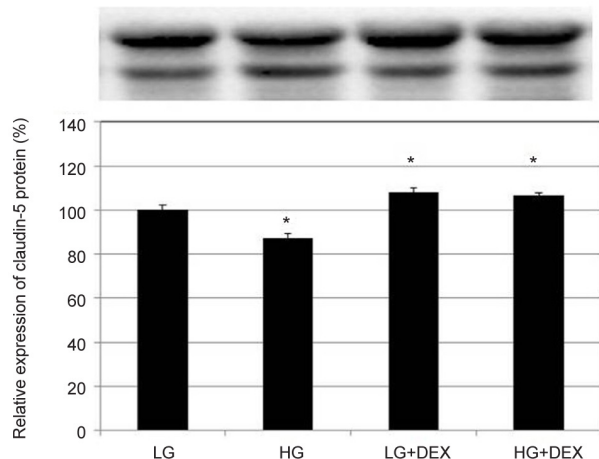


Figure 6. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μM , DEX) on the expression of claudin-5 in trabecular meshwork cells by western blot. Exposure to HG showed a smaller expression of claudin-5 compared to LG significantly. In both LG or HG, addition of DEX increased claudin-5 expression significantly ($p < 0.05$). GAPDH was used as internal standard.

발현이 9.7% 더 증가하였다($p=0.041$, Fig. 4). 그러나 HG 단독으로 노출된 경우와 비교하여 DEX와 HG에 동시에 노출시킨 경우에는 유의한 차이를 나타내지 않았다($p=0.475$).

Occludin mRNA는 HG에 노출된 경우에 LG에 노출된 경우보다 12.9% 더 낮은 발현을 보였으며($p=0.013$), DEX와 LG에 동시에 노출시킨 경우에는 LG 단독으로 노출된 경우와 비교하여 8.58%로 발현이 유의하게 더 증가하였다($p=0.041$) (Fig. 5). 그러나 DEX와 HG에 동시에 노출시킨 경우에는 LG 단독으로 노출된 경우와 비교하여 2.89% 발현이 더 증가하였으나 유의한 차이를 나타내지 않았다($p=0.391$).

Claudin-5와 occludin의 단백질 발현에 미치는 영향

LG에 노출된 경우와 비교하여 claudin-5 단백질의 발현은 HG에 노출된 경우 12.65% 더 적게 나타났다($p=0.002$) (Fig. 6). LG와 HG에 DEX를 동시에 노출시킨 경우에는 LG 단독으로 노출된 경우와 비교하여 각각 7.83%, 6.51%씩 모두 유의하게 발현이 더 증가하였다($p=0.016$, 0.015). Occludin 단백질의 발현은 LG, HG와 함께 DEX를 동시에 노출시킨 경우 LG 단독으로 노출된 경우와 비교하여 각각 6.79%, 8.55%씩 유의하게 발현이 더 증가하였다($p=0.037$, 0.012) (Fig. 7).

고 찰

기존의 많은 실험실 내 연구들에서 코티코스테로이드는 주로 세포의 단백질과 프로티오글리칸의 변화를 유발함

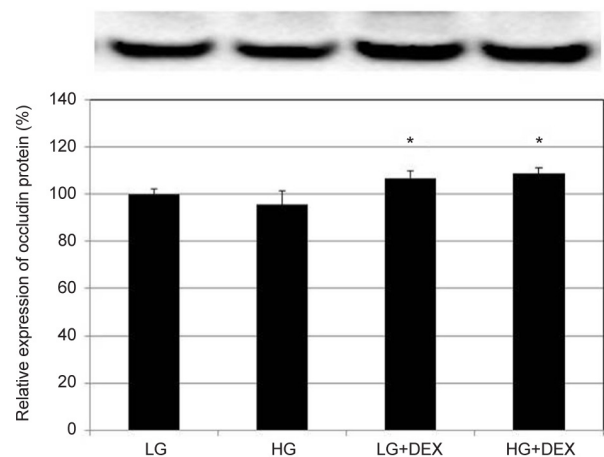


Figure 7. Effects of low glucose (5 mM, LG) and high glucose (25 mM, HG) with or without co-exposure of dexamethasone (1.0 μM , DEX) on the expression of occludin in trabecular meshwork cells by western blot. In both LG or HG, addition of DEX increased occludin expression significantly ($p < 0.05$). GAPDH was used as internal standard.

으로써 섬유주를 통한 저항을 증가시켜 스테로이드 녹내장을 일으키는 것으로 알려져 왔는데^{24,26} 세포 모양 변화와 부착에 미치는 영향도 그 기전에 관여하는 것으로 보고되었다.²⁷ 당뇨망막증에서 내피세포간의 밀착연접에 의해 유지되는 망막혈관장벽이 파괴됨으로써 황반부종이 유발된다.²⁸ 이때 포도당의 농도가 증가하면 망막혈관내피세포와 맥락막 내피세포에 영향을 미쳐 합병증을 유발하게 되는데 주로 망막혈관내피세포에서 ZO-1을 비롯한 TJ의 구성요소를 저해하여 투과도를 증가시켜 부종을 유발하며, 이때 DEX를 투여하면 TJ를 안정시켜 망막의 혈관내피세포 사이를 통한 투과도를 감소시킴으로써 부종이 감소하게 된다.^{10,11}

녹내장의 경우 DEX에 노출시켰을 때 수리전도도가 감소하며 이때 ZO-1의 발현의 증가가 동반되므로 DEX에 의한 방수유출에 대한 저항의 증가가 세포간 결합의 변화와 관련이 있을 것이라는 보고가 있었으나,¹⁵ 포도당 농도의 증가가 섬유주를 통한 투과도에 미치는 영향은 아직 자세히 밝혀지지 않았으므로 본 연구에서 이를 알아보기 위해 섬유주단층세포층에서 HG에 노출시켜 본 결과 carboxypermability test와 TEER 두 가지 모두에서 섬유주를 통한 투과도가 유의하게 높게 나타남을 알 수 있었다. 한편, LG와 HG에 DEX를 함께 노출시킨 경우 LG와 HG를 단독으로 노출시킨 경우보다 두 경우 모두 투과도가 유의하게 작게 나타났다. DEX는 LG에 함께 노출시켰을 때 LG 단독으로 노출한 경우에 비해 유의하게 투과도를 감소시킬 뿐만 아니라 HG와 함께 노출시킨 경우에도 LG 단독노출에 비해 투과도가 낮아 HG에 의해 증가된 투과도를 상쇄시켰다. 따라서 DEX는 LG와 HG에 노출시킨 두 경우 모두에서 섬유주를 통한 투과도를 감소시켰으므로, DEX를 장기간 사용할 경우 방수 내 포도당의 농도와 무관하게 섬유주를 통한 방수유출에 대한 저항을 증가시켜 안압을 상승시킬 가능성이 있다. 또한 방수 내 포도당의 농도가 높은 경우 포도당에 의해 방수유출이 증가하여 안압이 정상적으로 나타날 가능성이 있으며, 포도당의 농도가 감소하면 안압이 증가할 가능성도 있으므로 이는 당뇨 환자에서 혈액투석 치료를 시행할 때²⁹ 삼투압의 변동과 함께 안압의 심한 변동이 나타나는 또 다른 기전의 하나로도 생각해 볼 수 있다.

TJ는 단순한 세포간 장벽뿐만 아니라 다양한 조직에서 세포 사이의 투과도를 조절하는 역할을 하는데, TJ를 구성하는 다양한 요소의 발현에 따라 이러한 투과도가 조절되게 된다.^{30,31} TJ는 세포 내에 존재하는 ZO-1과 세포 사이에 존재해서 ZO-1과 결합하여 복합체를 형성해서 기능적인 실제적인 장벽 역할을 하는 occludin으로 주로 구성

된다.¹⁶ 그동안의 TJ를 구성하는 단백질에 관한 연구에서는 주로 ZO-1과 연관된 보고가 많았으나, 세포 내에 존재하는 ZO-1에 비해 세포간에 실제 장벽을 구성하는 기능적 단위체인 occludin이 좀더 TJ에 특이적이며 TJ의 기능과 연관이 있다고 한다.^{32,33} 또한 녹내장과 관련하여 방수유출로의 세포에 압력을 증가시켜 관찰한 연구에서 TEER의 증가와 함께 TJ를 구성하는 claudin-5 단백질의 발현의 증가가 동반되었다는 보고가 있었고³⁴ 망막혈관내피에서 TJ를 구성하는 주된 단백질 성분은 occludin과 claudin-5라고 한다.³⁵ 섬유주를 대상으로 DEX가 TJ에 미치는 영향에 관한 연구에서 ZO-1의 발현이 증가되었다는 연구가 있었으나¹⁵ occludin과 claudin-5에 대한 연구는 아직 행해지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 HG와 DEX가 TJ에 미치는 영향을 알아보기 위해 TJ에서 실제 장벽 역할을 하는 기능적 요소인 occludin과 가해진 압력에 반응하여 발현해서 수리전도도의 조절에 관여하는 것으로 알려진 claudin-5 유전자와 단백질의 변화를 조사하였다.

본 연구에서 claudin-5의 발현에 관한 결과를 보면 HG에 노출시킨 경우 claudin-5 mRNA와 단백질 발현이 유의하게 감소하였다. DEX에 동시에 노출시킨 경우에는 claudin-5 단백질 발현이 유의하게 증가하였다. occludin의 발현을 보면, HG에 노출시킨 경우 유전자의 발현이 감소하였으며, DEX에 동시에 노출시킨 경우에는 유전자의 발현이 증가하였다. DEX에 동시에 노출시킨 경우에는 LG와 HG 모두 occludin 단백질 발현이 유의하게 증가하였다. 위의 결과를 종합해 보면 HG에 노출된 경우 섬유주를 통한 투과도의 감소와 동반되어 occludin과 claudin-5 유전자와 단백질 발현이 감소된 것으로 나타났으므로, 포도당 농도 변화에 따른 섬유주 투과도 조절의 기전으로 세포간 TJ의 변화가 관여함을 알 수 있다. DEX에 노출시킨 경우 섬유주 단층세포층의 투과도 감소와 동반하여 occludin과 claudin-5의 변화가 나타났는데, 유전자의 발현은 occludin이 유의하게 증가하였으나, 단백질 발현은 occludin과 claudin-5 모두 DEX에 의해 유의하게 증가되었다. DEX에 의한 섬유주 단층세포층의 투과도 감소는 포도당의 농도와 무관하게 나타났었는데, TJ에 의한 occludin과 claudin-5 유전자와 단백질 발현 역시 포도당의 농도와 무관하게 증가하였다. 위의 결과를 종합해 보면 포도당의 농도가 증가하면 섬유주 단층세포층의 투과도를 증가시키지만 DEX는 포도당 농도와 상관없이 TJ의 occludin과 claudin-5 유전자와 단백질 발현을 증가시켜 결과적으로 섬유주 단층세포층의 투과도가 낮아지게 된다. 이러한 결과의 임상적 의미는 방수 내 포도당의 농도, 즉 당뇨의 조절과 무관하게 DEX는 안압상승을 유발할 수 있음을 시사한다.

따라서 당뇨망막증에 의한 부종을 치료하기 위해 글루코코르티코이드를 사용할 경우 손상된 망막혈관내피세포의 TJ를 회복시켜 망막부종은 개선될 수 있으나 장기간 사용할 경우 섬유주의 기능을 저하시켜 안압상승을 초래하여 이차성으로 스테로이드녹내장을 유발할 수 있음을 시사한다.³⁶

스테로이드는 이외에도 다양한 기전으로 작용할 수 있는데 액틴과 같은 스트레스성 섬유질의 증가가 관찰된다.^{25,26,37} 본 연구의 결과에 따르면 기존에 알려진 기전에 더하여 글루코코르티코이드는 섬유주세포 사이의 TJ를 강화시켜 방수 유출을 감소시킴으로써 안압상승을 유발할 수 있다. 스테로이드 제제에 의해 유발되는 미세소관(microtubule)이나 액틴 섬유의 변화가 없더라도 DEX에 의해 TJ의 강화가 먼저 일어날 수 있다고 한다.²⁷ 따라서 스테로이드 제제는 형태학적 변화에 선행하여 세포연접부의 기능적 변화를 유발하여 세포간 유출의 조절에 관여함으로써 안압상승을 유발할 수 있다. 스테로이드녹내장의 발병에는 myocillin 같은 유전자를 포함하여 다양한 기전이 관여하는 것으로 알려져 있다.^{12,13,38} 한편, 본 연구에서 얻은 섬유주단층세포층을 이용한 결과가 실제 생리적 환경과는 많은 차이가 있을 것인데, 포도당이나 DEX가 섬유주에만 영향을 주는 것이 아니고 실렘관과 공막을 비롯한 섬유주 주위의 여러 조직에도 영향을 줄 수 있음을 고려해야 할 것이다. 또한 TJ를 구성하는 다양한 단백질의 역할에 대해서는 향후 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

본 연구의 결과에서 HG가 섬유주를 통한 방수유출을 증가시켜 안압을 낮추는 효과를 나타낼 수 있을 것이라고 생각해 볼 수 있겠으나 당뇨와 녹내장, 혈중 포도당 농도와 안압과의 연관성에 대해서는 논란이 많다. 당뇨가 있거나 혈중 포도당 농도가 높은 경우 정상인에 비해 0.18 mmHg 정도 안압이 높다는 보고도 있으나³⁹⁻⁴² 반대로 뚜렷한 연관성이 없다는 보고들도 있다.⁴³⁻⁴⁷ 그러나 당뇨를 장기간 앓을 경우의 혈중 포도당의 변화 정도와 조절 여부, 그리고 이환 기간에 따라 다양한 양상을 나타낼 수 있으며, 섬유주뿐만 아니라 주위의 다른 유출로의 조직에도 영향을 미칠 수 있을 것이므로 본 연구와 같이 섬유주단층세포층에서만 단기간 고농도포도당에 노출된 결과를 실제 임상적으로 안압이 미치는 영향과 비교하기는 하는 힘들 것이다. 그러나 망막내피세포를 이용한 연구들에서 HG는 투과도를 증가시키며, 이러한 투과도의 증가는 TJ의 변화와 관련이 있다고 알려져 있으므로⁷⁻¹⁰ 혈관내피세포의 성질을 가진 섬유주세포에서도^{48,49} 단 기간에 노출될 경우 HG가 투과도를 증가시킬 수 가능성을 배제할 수는 없을 것이다. 한편 본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 HG가 TJ의 형성을 저해하며 세포 생존과 활성을 저하

시킨 점을 고려해 보면 장기간 HG에 노출될 경우 섬유주세포의 건전성이 떨어지고 섬유주세포가 소실되면서 결과적으로 섬유주의 방수 유출에 대한 조절능력이 떨어질 가능성도 있으므로 장기간의 효과에 대해 향후 좀더 자세한 연구가 필요할 것이다. 또한 DEX에 섬유주 유출 감소는 TJ 연접부의 변화뿐만 아니라 세포외기질의 변화에 의해서도 나타날 수 있으며,³⁶ 이러한 DEX에 의한 변화는 모든 사람에게 항상 일관되게 나타나는 것이 아니고 각 개인에 따라 다르게 나타날 수 있다고 알려져 있으므로 임상적으로 환자 개개인에게 적용해서 의미를 부여하는데에는 유의해야 할 것이다.

결론적으로 섬유주세포에서 고농도의 포도당은 TJ를 구성하는 단백질의 감소를 유도하여 세포 사이의 유출을 증가시켜 섬유주를 통한 유출을 증가시킬 수 있다. 이에 반하여 DEX는 TJ를 안정시킴으로써 섬유주세포 사이를 통한 유출을 감소시켜 안압상승을 유발할 가능성이 있는데 이러한 기능적 구성성분의 일종으로 occludin과 claudin-5가 관여하는 것으로 나타났다.

REFERENCES

- 1) Becker B. Diabetes mellitus and primary open-angle glaucoma. The XXVII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1971;71(1 Pt 1):1-16.
- 2) Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humour glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 1984;39:605-9.
- 3) Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 1985;34:621-7.
- 4) Lorenzi M, Montisano DF, Toledo S, Barrioux A. High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1986;77:322-5.
- 5) Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Diabetes Care* 2003;26:2653-64.
- 6) Mohr S. Potential new strategies to prevent the development of diabetic retinopathy. *Expert Opin Invest Drugs* 2004;13:189-98.
- 7) Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, et al. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Penn State Retina Research Group. Diabetes* 1998;47:1953-9.
- 8) Penfold PL, Wen L, Madigan MC, et al. Modulation of permeability and adhesion molecule expression by human choroidal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3125-30.
- 9) Felinski EA, Antonetti DA. Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression: novel treatments for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2005;30:949-57.
- 10) Saker S, Stewart EA, Browning AC, et al. The effect of hyperglycemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2014;121:161-7.

- 11) Stewart EA, Saker S, Amoaku WM. Dexamethasone reverses the effects of high glucose on human retinal endothelial cell permeability and proliferation in vitro. *Exp Eye Res* 2016;151:75-81.
- 12) Wordinger RJ, Clark AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:629-67.
- 13) François J. Corticosteroid glaucoma. *Ann Ophthalmol* 1977;9:1075-80.
- 14) Clark AF, Wilson K, McCartney MD, et al. Glucocorticoid-induced formation of cross-linked actin networks in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:281-94.
- 15) Underwood JL, Murphy CG, Chen J, et al. Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):C330-42.
- 16) Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998;60:121-42.
- 17) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 18) Song J, Deng PF, Stinnett SS, et al. Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2424-32.
- 19) 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.
- 20) Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinasespecific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1029-37.
- 21) Alvarado JA, Betanzos A, Franse-Carman L, et al. Endothelia of Schlemm's canal and trabecular meshwork: distinct molecular, functional, and anatomic features. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C621-34.
- 22) 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.
- 23) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 24) Partridge T, Jones GE, Gillett R. Cytochalasin B inhibits stabilisation of adhesions in fast-aggregating cell systems. *Nature* 1975;253:632-4.
- 25) Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, et al. Proteins secreted by human trabecular cells. Glucocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2012-22.
- 26) Steely HT, Browder SL, Julian MB, et al. The effects of dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:242-50.
- 27) O'Brien ET, Perkin SL, Roberts BC, Epstein DL. Dexamethasone inhibits trabecular cell retraction. *Exp Eye Res* 1996;62:675-88.
- 28) Vitale S, Maguire MG, Murphy RP, et al. Clinically significant macular edema in type I diabetes. Incidence and risk factors. *Ophthalmology* 1995;102:1170-6.
- 29) Levy J, Tovbin D, Lifshitz T, et al. Intraocular pressure during haemodialysis: a review. *Eye (Lond)* 2005;19:1249-56.
- 30) Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995;269(4 Pt 1):G467-75.
- 31) Balda MS, Whitney JA, Flores C, et al. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996;134:1031-49.
- 32) Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
- 33) McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, et al. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 9):2287-98.
- 34) Lei Y, Stamer WD, Wu J, Sun X. Cell senescence reduced the mechanotransduction sensitivity of porcine angular aqueous plexus cells to elevation of pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2324-8.
- 35) Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 2001;86:308-15.
- 36) Raghunathan VK, Morgan JT, Park SA, et al. Dexamethasone stiffens trabecular meshwork, trabecular meshwork cells, and matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:4447-59.
- 37) Zhang X, Clark AF, Yorio T. Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabeculae meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5301-8.
- 38) Clark AF, Steely HT, Dickerson JE Jr, et al. Glucocorticoid induction of the glaucoma gene MYOC in human and monkey trabecular meshwork cells and tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1769-80.
- 39) Hennis A, Wu SY, Nemesure B, et al. Hypertension, diabetes, and longitudinal changes in intraocular pressure. *Ophthalmology* 2003;110:908-14.
- 40) Dielemans I, de Jong PT, Stolk R, et al. Primary open-angle glaucoma, intraocular pressure, and diabetes mellitus in the general elderly population. The Rotterdam Study. *Ophthalmology* 1996;103:271-5.
- 41) Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains Eye Study, Australia. *Ophthalmology* 1997;104:712-8.
- 42) Zhao D, Cho J, Kim MH, et al. Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2015;122:72-8.
- 43) Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, et al. Diabetes, intraocular pressure, and primary open-angle glaucoma in the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 1995;102:48-53.
- 44) Wormald RP, Basauri E, Wright LA, Evans JR. The African Caribbean Eye Survey: risk factors for glaucoma in a sample of African Caribbean people living in London. *Eye (Lond)* 1994;8(Pt 3):315-20.
- 45) Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:714-20; discussion 829-30.
- 46) Gordon MO, Beiser JA, Kass MA. Is a history of diabetes mellitus protective against developing primary open-angle glaucoma? *Arch Ophthalmol* 2008;126:280-1.
- 47) Quigley HA. Can diabetes be good for glaucoma? Why can't we believe our own eyes (or data)? *Arch Ophthalmol* 2009;127:227-9.
- 48) 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.
49) 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.

= 국문초록 =

고포도당과 덱사메타손이 섬유주세포의 투과도에 미치는 영향

목적: 인체의 섬유주세포에서 고농도포도당이 섬유주의 투과도와 세포생존에 미치는 영향을 알아보고 이에 대한 덱사메타손의 역할을 알아보고자 한다. 또한 투과도의 변화에 영향을 미치는 섬유주세포의 밀착연접의 변화를 알아보고자 한다.

대상과 방법: 일차배양한 인체의 섬유주세포에 저농도(5 mM)와 고농도(25 mM)의 포도당에 각각 3일간 노출시켰으며 이때 1.0 μ M의 덱사메타손에도 함께 노출시켰다. 섬유주단층세포층의 투과도를 carboxyfluorescein permeability test와 transendothelial electrical resistance (TEER)로 각각 측정하였다. 섬유주세포의 접합부에 미치는 영향을 알아보기 위하여 밀착연접의 claudin-5와 occludin의 mRNA와 단백질의 발현을 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 western blot으로 각각 측정하였다.

결과: Carboxyfluorescein permeability test와 TEER 결과 모두 고농도포도당은 저농도포도당에 비해 섬유주단층세포층 투과도가 유의하게 크게 나타났으며($p=0.022$, 0.028), claudin-5와 occludin mRNA의 발현이 각각 7.5%와 12.9% 작게 나타났다. 덱사메타손에 함께 노출시킨 경우 고농도포도당에 노출시킨 경우에 비해 투과도가 감소되었으며, claudin-5와 occludin mRNA의 발현은 유의한 차이를 나타내지 않았고, claudin-5와 occludin 단백질의 발현은 각각 6.51%, 8.55%로 유의하게 증가하였다($p=0.015$, 0.012).

결론: 덱사메타손은 고농도포도당에 의한 섬유주단층세포층의 투과도 증가를 상쇄하였다. 덱사메타손은 섬유주세포의 밀착연접부에 있는 claudin-5와 occludin의 발현을 증가시켰는데 이러한 밀착연접부의 변화는 스테로이드에 의한 섬유주 저항 증가의 기전이 될 수 있을 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2018;59(3):252-260〉
