

토끼 망막에서 NMDA에 의한 아포프토시스의 발현

박용욱¹ · 채선희¹ · 이지웅¹ · 권오주² · 신재필¹ · 전창진³ · 김시열¹

경북대학교 의과대학 안과학교실¹, 부산정보대학교 안경광학과², 경북대학교 자연과학대학 생물학과³

목적: 토끼 망막에서 NMDA에 의한 아포프토시스와 Bcl-2, Bax, caspase-3의 발현을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 20마리 토끼를 대상으로 680과 2,000 nmole의 NMDA를 유리체강내로 주입 후 2, 16, 60시간 및 1, 2주에 각각 안구를 적출하여 TUNEL 염색과 면역조직화학염색을 시행하였다.

결과: NMDA 주입 후 16시간 후에 신경절세포층 및 속핵층에서 TUNEL 염색에 양성을 보이는 세포가 가장 많이 나타났고 60시간에서 줄어들었고 2,000 nmole의 NMDA를 주입 후 680 nmole에 비해 TUNEL 양성세포 수가 더 많았다. Bcl-2, Bax, caspase-3의 면역조직화학염색에서도 신경절세포층과 속핵층의 세포가 염색이 되었고, 2시간에 이미 염색된 세포가 보였다. NMDA 주입 후 2시간에서 윌러세포도 Bcl-2, Bax, caspase-3에 염색이 되었다.

결론: NMDA에 의한 망막신경세포의 흥분성 신경독성에 아포프토시스가 관여되며, 비록 대조군 실험은 하지 않았지만 Bcl-2, Bax, caspase-3의 발현이 apoptosis의 유발에 중요한 역할을 하며 윌러세포도 관여할 것으로 생각된다.

〈한안지 49(7):1146-1153, 2008〉

허혈성 망막 세포사에 대한 연구를 보면 다양한 기전에 의하여 세포가 죽는 것으로 관찰되고 있는데 형태학적으로 크게 나누면 괴사(necrosis)와 아포프토시스(apoptosis)로 나눌 수 있다.^{1,2} 괴사는 세포가 팽창하고 세포막이 터지면서 세포액의 누출이 일어나고 염증반응이 동반되며 주변세포가 함께 죽게 되는 과정을 이야기한다. 반면 아포프토시스는 세포가 죽는 과정에 세포막의 물집(blebbing)을 형성하지만 세포막의 연속성이 유지되어 세포액의 누출이 없으며 세포가 쭈그러들어 크기가 작아지고 핵내 염색질이 응축되면서 염증반응이나 주위세포의 손상 없이 개개의 세포가 탐식 과정을 통해 사라지는 세포사를 말하는데 programmed cell death(PCD)의 한 형태로 세포가 죽을 때 이미 준비된 상황에서 사망 프로그램을 가동함으로써 능동적

인 죽음을 맞이한다는 개념이다.³ 이 과정에서 세포는 능동적으로 죽음에 필요한 단백질을 유전자로부터 합성해 내고 에너지를 사용하여 세포 구성 성분이 세포 바깥으로 새어 나가는 것을 막음으로써 주위세포의 손상이나 염증반응의 유발을 최소화 한다.

글루타민산염은 시세포, 두극세포 및 신경절세포의 신경전달물질로서 중요한 역할을 한다.⁴ 망막의 신경세포는 다양한 종류의 글루타민산염 수용체를 가지며 이러한 NMDA (N-methyl-D-aspartate)와 non-NMDA 수용체의 과도한 자극은 흥분성 세포사(excitotoxic cell death)를 유발하는 것으로 알려져 있다.⁵ 이와 같은 흥분성 신경전달물질에 의한 흥분성 세포독성은 중풍, 외상, 간질과 만성 신경변성질환과 같은 다양한 병적 상태와 연관되어 있다.⁶ 망막에서 흥분성 세포독성은 망막 허혈-재관류 손상에, 그리고 나아가 녹내장에서 신경 손상에 중요한 역할을 할 것으로 여겨져 왔다.^{7,8}

이미 여러 동물모델에서 NMDA로 인한 망막의 아포프토시스가 보고 되었다.^{9,10} 그러나 이러한 동물시험에서 아포프토시스와 연관된 Bcl-2, Bax, caspase-3 등에 대해서는 직접적으로 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 이러한 아포프토시스의 발현양상이 NMDA의 주입양에 따른 차이가 있는지를 알아보고 아포프토시스와 연관된 대표적인 단백질인 Bcl-2, Bax, caspase-3의 발현양상을 알아보고자 하였다.

〈접수일 : 2007년 6월 14일, 심사통과일 : 2008년 3월 18일〉

통신저자 : 신 재 필

대구시 중구 삼덕 2가 50

경북대학교병원 안과

Tel: 053-420-5817, Fax: 053-426-6552

E-mail: jpshin@hitel.net

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제96회 추계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

* 이 연구는 2005년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

대상과 방법

1. 유리체내 NMDA 주입

체중 2.5~3.0 kg의 백색토끼 20마리를 대상으로 하였다. 10마리씩 2군으로 나누어 각각 680 nmoles와 2,000 nmoles의 NMDA를 유리체강내로 주입하였다. 먼저 50 mg/kg의 ketamine hydrochloride와 5 mg/kg의 xylazine hydrochloride를 근육 주사하여 마취시킨 후 0.5% Alcaine®으로 점안마취를 하고 1% Mydriacyl®로 산동하였다. NMDA (Sigma chemical Co., USA) 680 nmoles (0.1 ml)과 2,000 nmoles (0.1 ml)의 농도가 되도록 0.1 M의 PBS(phosphate buffered saline) 용액에 녹인 후 멸균한 Hamilton 주사기에 30-G 주사침을 사용하여 상비측 평면부를 통해 유리체내로 주입하였다. 대조군에서는 같은 용량의 0.1 M PBS를 주입하였다. 우안은 각군마다 680 nmoles와 2,000 nmoles의 NMDA를 주사하였고 좌안은 대조군으로 하여 동량의 PBS를 유리체강내에 주사하였다.

2. TUNEL 염색

NMDA를 유리체내로 주입 후 2시간, 16시간, 60시간, 1주, 2주에 각각 안구적출을 시행하였다. 안구 적출 후 안구의 약 2/3 되는 부위에서 절개 후 수정체와 유리체를 제거하고 망막을 분리하였다. 분리한 망막조직은 -30℃에서 냉동한 후 특정 부위를 선택하여 10 μ m의 두께로 절단하였다. 아포프토시스에 대한 염색은 TUNEL 방법을 이용한 Apoptosis detection kit (Chemicon, Co., USA)을 사용하였다. 조직절편을 37℃에서 Digoxigenin-11-deoxynucleotidyl triphosphate와 Terminal deoxynucleotidyl transferase에 보관하여 잘라진 DNA 조각의 말단부위에 digoxigenin과 연결된 deoxynucleotidyl triphosphate (dUTP와 dATP)가 결합되도록 한 후 anti-digoxigenin conjugate를 사용하여 표지를 하였다. Propidium iodide를 이용하여 대조염색을 시행하였고, 조직을 glass slides에 mounting하고 Vecta-

shield (a glycerol-based antifading medium, Vector Lab, Burlingame, CA)로 coverslip하여 관찰하였다. TUNEL 염색에 양성으로 나타난 세포를 400배에서 수를 세어 결과를 비교하였고 통계처리는 Mann Whitney U-test를 사용하였다.

3. Bcl-2, Bax, caspase-3의 면역조직화학염색

안구 적출 후 즉시 망막을 분리하여 4% paraformaldehyde에서 2시간 동안 고정하였다. 고정과정을 거치고 PBS (1x, pH 7.4)로 3회 세척 한 후 면역조직화학염색법을 실시 하였다. 고정 된 망막은 -30℃에서 10 μ m의 두께로 절단한 후 20% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)에 1시간 동안 실온에서 반응을 시켰다. Bcl-2, Bax, caspase-3에 대한 각각의 일차 항체(R&D Syssetms, Minneapolis, MN, USA)로 실온에서 2 시간 동안 반응시키고, PBS (1x, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 일차항체는 1:100 (Bcl-2), 1:50 (Bax), 1:250 (caspase-3)으로 희석하였다. 이차 항체로는 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-rabbit IgG (Vector Lab, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 PBS(1x, pH 7.4)로 3회 세척 후 Vectashield로 coverslip하였다. Bcl-2, Bax, caspase-3에 대한 PBS주입후 대조군 실험은 하지 않았다.

결 과

망막 조직 표본에서 TUNEL 염색을 시행하여 형광 빛을 보이는 아포프토시스로 인한 세포사를 관찰하였다. NMDA 주입 후 TUNEL 염색에서 2시간에는 염색되는 세포가 나타나지 않다가(Fig. 1A, B) 16시간에 최대로 나타나고(Fig. 1D, E) 60시간에는 다시 염색되는 세포수가 줄어 들었고(Fig. 1G, H) 1주와 2주에는 나타나지 않았다. 대조군으로 PBS를 주입한 군은 TUNEL 염색에서 형광빛을 보이는 세포는 없었다(Fig. 1C, F, I). TUNEL 염색뿐 아니라, Bcl-2, Bax, caspase-3에서도 1주와 2주에는 염색되는 세포

Table 1. Result of TUNEL-positive cell count in NMDA-induced apoptosis of rabbit retinas after different concentration of NMDA injection

Cell count	2 hours	16 hours	60 hours	1 week	2 weeks
680 nmole	0	8.33±2.08*	0 [†]	0	0
2,000 nmole	0	23.33±7.09*	7.67±2.08 [†]	0	0

*, [†] $p < 0.05$ by Mann-Whitney U-test.

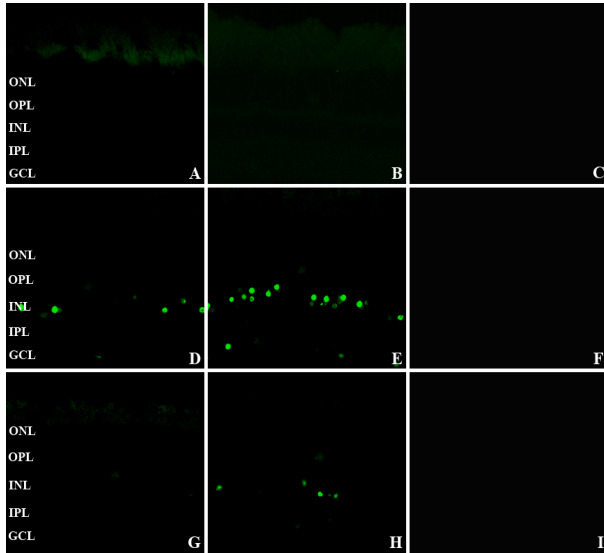


Figure 1. TUNEL stain of the retinas at 2 (A), 16 (D), 60 (G) hours after 680 nmoles of intravitreal NMDA injection and at 2 (B), 16 (E), 60 (H) hours after 2,000 nmoles of intravitreal NMDA injection and at 2 (C), 16 (F), 60 (I) hours after PBS injection ($\times 400$). A, B: No noticeable labeled nuclei are seen in the ganglion cell layer (GCL) and the inner nuclear layer (INL). (D, E, H) Scattered and intensely labeled nuclei are seen in the GCL and INL. G: No labeled nuclei are seen at 60 hours after 680 nmoles of NMDA injection. (C, F, I) No noticeable nuclei are stained after intravitreal PBS injection. GCL=ganglion cell layer; IPL=inner plexiform layer; INL=inner nuclear layer; OPL=outer plexiform layer; ONL=outer nuclear layer.

가 없었다. 16시간과 60시간에서 680 nmole을 주입한 군보다 2,000 nmole을 주입한 군에서 TUNEL 양성 세포 수가 더욱 많았으며($p < 0.05$, Table 1, Fig. 1D, E, G, H) 주로 염색되는 세포는 신경절세포층과 속핵층의 세포로 이 중에서는 속핵층에서 더 많이 염색되었다(Fig. 1D, E). 680 nmole을 주입한 경우 60 시간에서 TUNEL 양성 세포가 보이지 않았으나(Fig. 1G) 2,000 nmole을 주입한 경우 60시간까지 TUNEL 양성 세포가 나타나 아포토시스가 더 오래 지속됨을 알 수 있었다(Fig. 1H). 본 연구에서는 PBS 주입 후 Bax, Bcl-2, caspase-3에 대한 대조군 실험은 하지 않았으나 Bcl-2에 대한 면역조직화학염색에서는 2시간 후에 680 nmole을 주입한 군에서 신경절세포에서 염색이 되었다(Fig. 2A). 신경절세포층에서 수직으로 속핵층을 지나는 진한 염색이 다수 관찰되는데 이는 주로 뿔세포로 구성되어있으며 일부는 양극 세포의 축삭 및 수지상돌기도 포함되었을 것으로 추정된다(Fig. 2A).

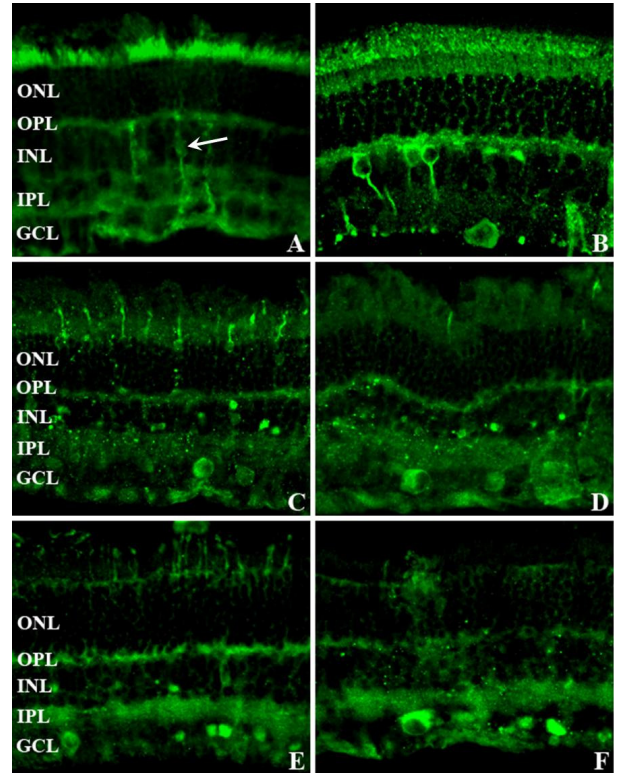


Figure 2. Bcl-2 immunohistochemical staining of the retinas at 2 (A), 16 (C), 60 (E) hours after 680 nmoles of intravitreal NMDA injection and at 2 (B), 16 (D), 60 (F) hours after 2,000 nmoles of intravitreal NMDA injection ($\times 400$). A, B: Bcl-2 are stained in the ganglion cell layer and Müller cell (arrow). C, D, E, F: Bcl-2 are stained strongly in the GCL and INL. GCL=ganglion cell layer; IPL=inner plexiform layer; INL=inner nuclear layer; OPL=outer plexiform layer; ONL=outer nuclear layer.

2,000 nmole을 주입한 군에서도 신경절 세포 및 속핵층에서 염색이 되었다(Fig. 2B). 16시간과 60시간에서는 신경절세포와 속핵층의 세포가 염색이 되었다(Fig. 2C, D, E, F). Bax 면역조직화학염색에서도 각 군에서 Bcl-2 염색시와 비슷한 소견으로 나타났으며, 주로 신경절세포와 속핵층의 세포가 염색되었고 뿔세포의 염색소견도 보였다(Fig. 3A).

Caspase -3 면역조직화학염색에서도 2시간에서 뿔세포가 염색되었으며 주로 염색되는 세포는 신경절세포와 속핵층의 세포였다(Fig. 4A). Bcl-2, Bax, caspase-3의 면역조직화학염색에서 680 nmole과 2,000 nmole 두 군간에 큰 차이는 보이지 않았고, TUNEL 염색에서는 NMDA 주입 후 2시간 후에는 아포토시스 소견을 보이지 않았으나 Bcl-2, Bax, caspase-3는 2시간 후에 이미 염색되는 세포를 볼 수 있었다.

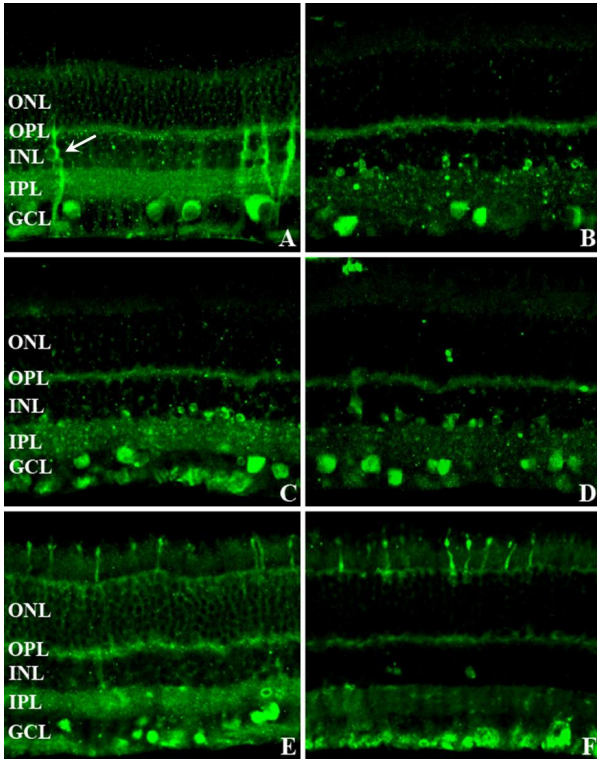


Figure 3. Bax immunohistochemical staining of the retinas at 2 (A), 16 (C), 60 (E) hours after 680 nmoles of intravitreal NMDA injection and at 2 (B), 16 (D), 60 (F) hours after 2,000 nmoles of intravitreal NMDA injection ($\times 400$). (A) Bax are stained in the ganglion cell layer and Müller cell (arrow). (B, C, D, E, F) Bax are stained in the GCL and INL. GCL=ganglion cell layer; IPL=inner plexiform layer; INL=inner nuclear layer; OPL=outer plexiform layer; ONL=outer nuclear layer.

고 찰

허혈성 망막 신경 세포사를 유발하는 방법에는 시신경을 결찰하는 방법이 있고 약물로 유도하는 방법, 안압을 올리는 방법 등이 사용된다. 본 실험에서 사용한 약물로 유도하는 방법은 잘 알려진 글루타민산염 길항제나 자유라디칼을 생성하는 약물을 주입하여 세포사를 관찰하는 방법으로 이것은 생체 내 및 실험관 실험 양쪽에서 모두 사용되는 방법이다.¹¹ 그러나 이러한 약물에 의한 방법은 한가지 기전에 의한 세포사를 관찰할 수 있는 장점은 있으나, 생체내에서 다양한 원인으로 인한 세포사를 관찰하기란 어렵다.

허혈 상태에서 세포손상의 한가지 기전으로는 신경세포의 허혈상태에서 흥분성 전달 물질인 글루타민산염의 다량 방출로 인한 신경독성으로 설명할 수 있다.¹²⁻¹⁵ 글루타민산염은 조직내에 μM 농도로 존재하며 자극전달에 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 흥분성 아미

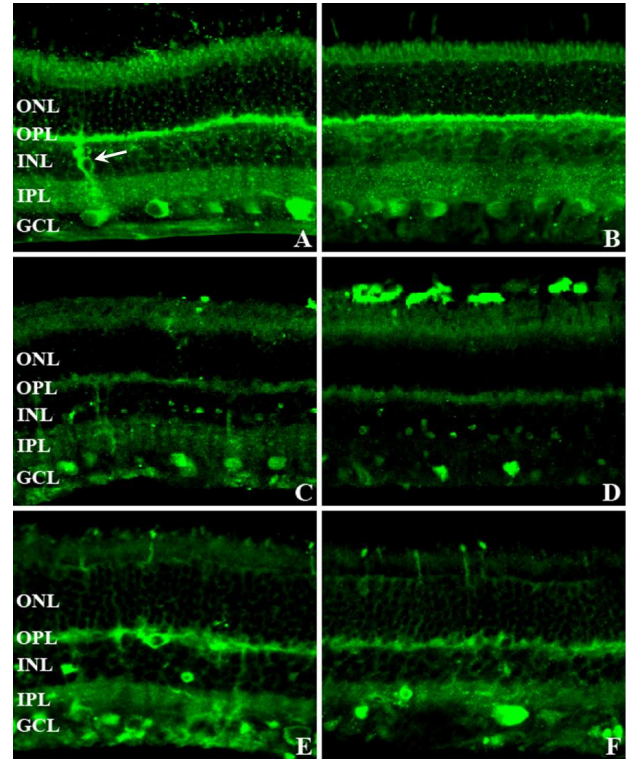


Figure 4. Caspase-3 immunohistochemical staining of retinas at 2 (A), 16 (C), 60 (E) hours after 680 nmoles of intravitreal NMDA injection and at 2 (B), 16 (D), 60 (F) hours after 2,000 nmoles of intravitreal NMDA injection ($\times 400$). (A) Caspase-3 are stained in the ganglion cell and Müller cell (arrow). (B) Caspase-3 are stained in the ganglion cell layer. (C, D, E, F) Caspase-3 are stained strongly in the GCL and INL. GCL=ganglion cell layer; IPL=inner plexiform layer; INL=inner nuclear layer; OPL=outer plexiform layer; ONL=outer nuclear layer.

노산이 다량(수백 μM 이상)으로 세포외로 분비되면 독성으로 작용하여 신경세포를 사멸시킨다.¹⁶ 신경세포의 허혈상태에서 세포의 글루타민산염이 증가하는 메커니즘에는 두 가지가 알려져 있다.¹⁷ 허혈상태의 초기에는 신경세포의 허혈로 인한 세포막의 탈분극으로 인하여 voltage-dependent Ca^{2+} channel이 활성화되어 세포 외 글루타민산염의 농도가 증가하는 것이고, 후기에는 세포내의 ATP 감소로 인하여 과량으로 분비된 세포 외 글루타민산염의 처리가 안되는 경우인데 Ca^{2+} channel과는 관계가 없다. 이렇게 과량으로 분비된 글루타민산염에 의해 신경세포내로 과량의 칼슘이 유입되게 되고 세포내의 여러 효소들을 활성화시키고 미토콘드리아에도 작용하여 결국 세포사로 이어지게 된다.¹⁸⁻²⁰ 또한 세포내 inducible nitric oxide synthase를 활성화 시켜 자유라디칼인 산화질소(nitric oxide)의 생성을 증가시켜 세포사에 이르게

된다. 이러한 글루타민산염의 흥분성세포독성은 글루타민산염 작용제인 NMDA에 의한 처리에 의해서도 관찰되었다.^{9,10,21,22}

아포프토시스 시에 세포핵 내의 DNA가 180~200개 염기의 단위로 잘리고, 이러한 뉴클레오솜 크기의 DNA 절편의 양끝에 존재하는 3'-OH group을 발견함으로써 아포프토시스를 증명할 수 있다. DNA 절편의 증명은 겔 전기영동법을 이용하는 방법²³과 TUNEL 염색을 이용하는 방법²⁴이 있다. 저자들은 TUNEL 염색을 통해 NMDA에 의한 흥분성 신경독성에서 망막 조직의 손상기전으로 아포프토시스가 관여함을 확인하였다(Fig. 1). Kwong and Lam¹⁰은 토끼망막에서 400 nmole의 NMDA를 유리체강내로 투여 후 4시간째 TUNEL 양성세포를 볼 수 있었으며 18시간에 최대에 달했다가 48시간에는 보이지 않았다고 하였다. 본 연구에서는 680 및 2,000 nmole 모두에서 2시간에는 TUNEL 양성세포가 나타나지 않다가 16시간에 최대로 나타났으며, 60시간까지도 TUNEL 양성세포가 보였다. 680 nmole보다는 2,000 nmole에서 TUNEL 양성세포가 더 많이 나타나고 더 늦게까지 나타남을 알 수 있었다. 즉 유리체내 주입한 NMDA의 양에 따라 아포프토시스의 양상이 달라짐을 알 수 있었다. 또한 주로 염색되는 세포가 신경절세포층과 속핵층에서 발견되어 NMDA로 인한 세포사는 주로 망막의 내층에서 일어남을 알 수 있었다. TUNEL 염색은 조직의 괴사에 의해 염색질이 파괴되었을 때도 위양성 반응을 나타낼 수 있다는 점에서 문제가 있으나 조직슬라이드상에서 세포들의 위치관계를 알 수 있다는 점에서 장점이 있으며 본 실험에서와 같이 망막의 특정세포층의 아포프토시스를 발견하는데 적합하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 아포프토시스와 관련되어 많이 알려진 Bcl-2, Bax, Caspase-3의 발현양상을 알아 보았는데 Bcl-2 단백질은 Bcl-2 homology (BH) domain에 따라 크게 3군으로 나뉘어진다. 아포프토시스를 억제하는 anti-apoptotic protein에는 BH1-BH4 domain을 가지는 Bcl-2와 Bcl-X_L이 있으며, 아포프토시스를 조장하는 pro-apoptotic protein에는 BH1, BH2, BH3 domain을 가지는 Bax와 Bak, 그리고 BH3 domain만을 가지는 Bad, Bim 등이다.²⁵⁻²⁸ Bcl-2 유전자는 사람의 B 세포성 림프종에서 발견된 proto-oncogene으로서 이 유전자로부터 만들어진 단백질인 Bcl-2는 아포프토시스를 억제하는 기능을 가지고 있으며 핵막, 사립체 외막, 내형질세막에 분포한다.²⁹ Bcl-2가 아포프토시스를 억제하는 기전에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없는데 Bcl-2가 항산화 기전에 관여함으로써 아포프토시스를 억제한다는 결과가 보고되었

고 Bcl-2가 세포분열의 G1 phase를 30~60% 늘임으로써 세포분열의 주기에 관여하여 아포프토시스로 가는 것을 막는다는 연구결과도 있었다.³⁰⁻³² 또한 최근 연구에 따르면 Bcl-2는 미토콘드리아의 매트릭스의 부종을 억제하고, 활성산소에 의한 손상을 감소시키며 cytochrome-c의 유리를 억제하고 미토콘드리아 막전위의 손상을 억제하여 세포사를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한 Bax 단백질과 결합하여 Bax로 인한 미토콘드리아 외막의 변화를 억제하는 것으로 보고되었다.³³

Bcl-2와 함께 Bax 단백질은 아포프토시스의 발현에 관여한다고 알려져 있다. Bax는 아포프토시스의 억제에 관여하는 Bcl-2의 활성을 떨어뜨리며, Bax의 과발현은 아포프토시스로 인한 세포사를 촉진시킨다.³⁴ 또한 Bax의 과발현은 미토콘드리아 외막의 투과성을 감소시켜 voltage-dependent anion channel을 감소시키며, 활성산소의 생성을 증가시키고 미토콘드리아의 과분극을 유발하여 세포사를 일으키게 된다. 또한 미토콘드리아 외막에 permeability transition pore를 만들어 cytochrome-c가 유리되게 하여 세포사를 유발하는 것으로 알려져 있다.³³

최근 Bcl-2를 과발현하는 neonatal transgenic mice의 경우 시신경을 자른 후 신경절세포의 손상이 유의하게 감소되었고 신경절세포의 기능도 유지된다는 실험결과가 보고된 바 있다.^{35,36} 본 연구에서 TUNEL 염색세포가 주로 보이는 신경절세포층 및 내핵층에서 Bax 및 Bcl-2가 발현되는 것으로 보아 같은 층의 세포들이 Bax나 Bcl-2의 발현 유무에 따라 세포사로 이어지거나 살아 남는 것으로 여겨진다(Fig. 2, 3). 또한 NMDA 주입 후 2시간째에서 Bax 및 Bcl-2 염색에서는 염색되는 세포가 보이나 TUNEL 염색에서는 아직 아포프토시스를 나타내는 세포가 보이지 않는데 이는 Bax나 Bcl-2 유전자의 전사(translocation)와 세포사 사이에는 지연시간(lag time)이 존재한다는 것을 의미 한다.³⁷

본 연구에서 Bax 및 Bcl-2가 NMDA 주입 후 2시간째 밀러세포에 진하게 염색되었는데, 이것은 흥분성 신경독성에 의한 아포프토시스의 유발 및 방어기전에 밀러세포가 관여할 가능성을 의미한다. 밀러세포는 글리코겐을 생산 및 저장하며 주변 신경세포에 포도당을 공급함으로써 영양공급의 중요한 역할을 수행하고 gamma aminobutylic acid (GABA)와 같은 신경전달물질의 분해에 관여하며 세포밖으로 분비된 글루타민산염의 농도를 조절하는 것으로 알려져 있다.³⁸⁻⁴¹ 이와 같이 밀러세포는 신경절 세포의 기능유지에 매우 밀접한 관계를 가지고 있는데 만일 허혈에 의해 밀러세포

가 손상될 경우 망막내에 글루타민산염의 농도가 증가될 것이며 이는 신경절세포를 포함한 망막내 신경세포의 허혈손상을 더욱 가중시키는 결과를 가져올 것이다. 그러므로 본 실험에서 뿔러세포내에 Bcl-2의 과발현은 뿔러세포 자체에 대한 방어기전이자 나아가서는 신경절세포를 포함한 망막내 신경세포의 허혈손상에 대한 방어기전이라고 추측할 수 있다. Chen et al.⁴²은 쥐의 시신경을 자른 후 뿔러세포에 Bcl-2의 면역조직화학염색이 유의하게 증가하였다는 본 연구와 유사한 결과를 보고하였고 Park and Kim⁴³도 토끼 시신경의 허혈-재관류 손상 모델에서 비슷한 결과를 보고한 바 있다.

Caspase들은 *Caenorhabditis elegans* CED-3 gene family의 mammalian homologues로서 아포프토시스에 관계한다고 알려져 있으며, 알려진 모든 caspase들은 zymogen으로 존재하며, 다른 caspase 또는 protease에 의해 잘려진 후 활성화된 형태로 전환된다.⁴⁴ 자극과 세포의 종류에 따라서, 특정한 caspase들이 각각의 경로를 통해 활성화되며 또한 몇몇 caspase들의 활성화 경로는 caspase-3를 활성화시키며, 결과적으로 caspase-3의 주요한 기질인 PARP(poly ADP-ribose polymerase)의 분해를 일으킨다.⁴⁴⁻⁴⁷ PARP는 DNA 복구에 관여하는 중요한 효소로서, 이 효소의 분해는 염색체의 파괴를 야기시키고 결국 세포사로 이어지게 된다.⁴⁸

본 연구에서 면역조직화학염색상 caspase-3가 신경절세포와 속핵층 세포에서 주로 염색이 되며, 이것은 아포프토시스 과정에 caspase-3가 관여된다는 것을 나타낸다(Fig. 4). 또한 NMDA 주입 후 2시간에서 TUNEL 염색에는 아포프토시스가 나타나지 않으나 caspase-3 염색에서는 뿔러세포와 주로 신경절세포층에서 이미 염색되는 세포가 나타나는 것으로 보아 아포프토시스의 발현 이전에 caspase-3의 발현이 먼저 시작되는 것으로 보인다.

결론적으로 토끼 망막에서 NMDA에 의한 흥분성 신경독성으로 인한 세포사는 아포프토시스와 관련이 있으며, 비록 PBS 주입 후 Bax, Bcl-2, caspase-3에 대한 대조군 실험은 하지 않았지만 아포프토시스 발현의 조절에 Bcl-2와 Bax 단백질이 관여하며, caspase-3의 활성화도 아포프토시스와 관련이 있다. 또한 뿔러세포가 이러한 아포프토시스의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Buchi ER. Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 1992;55:605-13.

- 2) Matini P, Moroni F, Lombardi G, et al. Ultrastructural and Biochemical studies on the neuroprotective effects of excitatory amino acid antagonists in the ischemic rat retina. *Exp Neurol* 1997;146:419-34.
- 3) Wyllie AH. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987;153:313-6.
- 4) Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, et al. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 1998;26:230-5.
- 5) Thoreson WB, Witkovsky P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:765-810.
- 6) Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988;1:623-34.
- 7) Kageyama T, Ishikawa A, Tamai M. Glutamate elevation in rabbit vitreous during transient ischemia-reperfusion. *Jpn J Ophthalmol* 2000;44:110-4.
- 8) Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, et al. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996;114:299-305.
- 9) Lam TT, Abler AS, Kwong JM, Tso MO. N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2319-7.
- 10) Kwong JM, Lam TT. N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced apoptosis in adult rabbit retinas. *Exp Eye Res* 2000;71:437-44.
- 11) Moroni F, Lombardi G, Pellegrini-Faussone S, Moroni F. Photochemically induced lesion of the rat retina: a quantitative model for the evaluation of ischemia induced retinal damage. *Vision Res* 1993;33:1887-91.
- 12) Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. NMDA-antagonists increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci Lett* 1996;214:175-8.
- 13) Newell DW, Barth A, Papermaster V, Malouf AT. Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Neurosci* 1995;15:7702-11.
- 14) Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Glutamate-induced over expression of NMDA receptor messenger RNAs and protein triggered by activation of AMPA/kainate receptors in rat hippocampus following forebrain ischemia. *Brain Res* 1994;659:67-74.
- 15) Louzada-Junior P, Dias JJ, Santos WF, et al. Glutamate release in experimental ischemia of the retina an approach using microdialysis. *J Neurochem* 1992;59:358-63.
- 16) Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J. Effects of ischemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* 1994;62:1025-33.
- 17) Wahl F, Obrenovitch TP, Hardy AM, et al. Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *J Neurochem* 1994;63:1003-11.
- 18) Tsukagawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N. Ca^{2+} -dependent non-NMDA receptor-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol*

- 1994;71:1190-6.
- 19) Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP. Ca^{2+} influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur J Pharmacol* 1996;302:153-62.
- 20) Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, et al. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 1995; 15:6377-88.
- 21) Prigle AK, Iannotti F, Wilde GJ, et al. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in vitro ischemia. *Brain Res* 1997;755:36-46.
- 22) Lee SJ, Jung CS, Bai SH. The effects of N-methyl-D-aspartic acid and antagonism by Kyurenic acid on neurons in the catfish retina. *J Korean Ophthalmol Soc* 1998;39:2303-12.
- 23) Rosl F. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucl Acids Res* 1992;20:5243.
- 24) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- 25) Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998;8:324-30.
- 26) Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-91.
- 27) O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-95.
- 28) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al. BCL-X, a BCL-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
- 29) Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene Bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 1994;5:411-7.
- 30) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75: 241-51.
- 31) Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-7.
- 32) Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. Regulation of cell division cycle progression by Bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 1996;183:2219-26.
- 33) Harris MH, Thompson CB. The role of Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000;7:1182-91.
- 34) Oltvai Z, Millman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- 35) Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, et al. Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci* 1996;16:4186-94.
- 36) Porciatti V, Pizzorusso T, Cenni MC, Maffei L. The visual response of retinal ganglion cells is not altered by optic nerve transection in transgenic mice overexpressing Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14955-9.
- 37) Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, et al. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:14476-81.
- 38) Ogden TE. Glia of the retina. In : Ryan SJ, ed. *Retina*, 2nd ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1994; v. 1. chap. 5.
- 39) Ehinger B. Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp Eye Res* 1977;25:221-34.
- 40) Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 1990;348:443-6.
- 41) Pow DV, Robinson SR. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience* 1994;60:355-66.
- 42) Chen ST, Gentleman SM, Garey LJ, Jen LS. Distribution of beta-amyloid precursor and B-cell lymphoma protooncogene proteins in the rat retina after optic nerve transection or vascular lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:1073-82.
- 43) Park KH, Kim DM. Apoptosis of retinal ganglion cell after ischemia-reperfusion injury of optic nerve in rabbits. *J Korean Ophthalmol Soc* 1998;39:2687-700.
- 44) Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998;5:97-103.
- 45) Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997;53:478-90.
- 46) Faraco PR, Ledgerwood EC, Vandenabeele P, et al. Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:385-92.
- 47) Tezel G, Wax MB. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2660-7.
- 48) Gilliams-Francis KL, Quaye AA, Naegele JR. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp Neurol* 2003;184:359-72.

=ABSTRACT=

N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)-induced Apoptosis in Rabbit Retina

**Yong Wook Park, M.D.¹, Sun Hwa Chae, M.D.¹, Ji-Woong Lee, M.D.¹, Oh Ju Kwon, Ph.D.²,
Jae Pil Shin, M.D.¹, Chang Jin Jeon, Ph.D.³, Si Yeol Kim, M.D.¹**

Department of Ophthalmology, Kyungpook National University, College of Medicine¹, Daegu, Korea

Department of Ophthalmic Optics, Busan College of Information Technology², Pusan, Korea

Department of Biology, Kyungpook National University, College of Natural Science³, Daegu, Korea

Purpose: To evaluate the involvement of apoptosis in N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in the rabbit retina.

Methods: After intravitreal injection of 680 and 2,000 nmoles of NMDA in rabbit eyes, the eyes were enucleated at 2, 16, and 60 hours and 1 and 2 weeks. The apoptotic cell death was determined with TdT-mediated biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) stain, and immunohistochemical stains of Bcl-2, Bax, and caspase-3 were performed.

Results: TUNEL showed increased labeling scattered in the ganglion cell layer and inner nuclear layer from 16 to 60 hours. The number of TUNEL-positive nuclei decreased at 60 hours, and none was observed at 2 hours, 1 week, and 2 weeks. More TUNEL-positive nuclei were seen with injection of 2,000 nmoles compared to 680 nmoles. Bcl-2, Bax, and caspase-3 were seen histologically as early as 2 hours in the ganglion cell layer and inner nuclear layer; there was no stained nuclei with the TUNEL stain. At 2 hours after intravitreal NMDA injection, Bcl-2, Bax, and caspase-3 were also stained in Müller cells.

Conclusions: This study showed that apoptosis is involved in NMDA-induced excitotoxicity in the rabbit retina. Bcl-2, Bax, and caspase-3 may play important roles in modulating the apoptosis in NMDA-induced excitotoxicity, and Müller cells are involved in the apoptotic pathway.

J Korean Ophthalmol Soc 49(7):1146-1153, 2008

Key Words: Apoptosis, Bax, Bcl-2, Caspase-3, NMDA

Address reprint requests to **Jae Pil Shin, M.D.**

Department of Ophthalmology, Kyungpook National University Hospital

#50 Samduk 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea

Tel: 82-53-420-5817, Fax: 82-53-426-6552, E-mail: jpshin@hitel.net