

망막신경절세포에서 고장성 및 고오스몰 스트레스에 의한 긴장성 반응유도 결합단백질의 발현

Expression of TonEBP by Hypertonic and Hyperosmolar Stress in RGC-5 Cells

우종은¹ · 권민영² · 정수월² · 우제문¹

Jong Eun Woo, MD¹, Min Young Kwon², Su Wol Chung, PhD², Je Moon Woo, MD, PhD¹

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 안과학교실¹, 울산대학교 자연과학대학 생명과학부²

Department of Ophthalmology, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine¹, Ulsan, Korea
School of Biological Sciences, College of Natural Science, University of Ulsan², Ulsan, Korea

Purpose: In order to determine whether the Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) is expressed by hypertonic and hyperosmolar stress, TonEBP expression was investigated in the retinal ganglion cell (RGC) line, RGC-5 cells.

Methods: After RGC-5 cells were cultured by Staurosporine, TonEBP expression was measured with Western immunoblotting analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in 50 mM NaCl, 100 mM mannitol, 50 mM glucose, or 100 mM glucose at 3, 6, 12, and 24 hours after exposure to each environment.

Results: In this study, the protein expression of TonEBP was determined to be statistically significantly checked in 50 mM NaCl after 3, and 6 hours, in 100 mM mannitol after 6 hours, and in 100 mM glucose after 3, and 6 hours. TonEBP messenger Ribonucleic acid (mRNA) expression was determined to be statistically significantly checked in 50 mM NaCl after 3 hours, in 100 mM mannitol after 3, and 24 hours, and in 50 mM glucose after 3, and 24 hours.

Conclusions: These results suggested that TonEBP was expressed by hypertonic and hyperosmolar stress at the protein and mRNA levels. Further studies are needed to determine the role of TonEBP and the mechanism of expression and regulation of TonEBP.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(8):1195-1201

Key Words: Hyperosmolar stress, Hypertonic stress, Retinal ganglion cell death, TonEBP expression

신경퇴행(neurodegeneration)은 많은 중추신경계 질환에 있어 주요한 특징으로 여겨지고 있는데 녹내장과 색소망막염 등의 망막 질환에서도 망막신경절세포층(retinal gan-

glion cell layer)의 결손이 진행되는 것으로 알려졌다. 녹내장의 경우 안압의 상승이 녹내장의 위험요인들 중 가장 자세히 알려진 요인 중 하나로 안압을 낮추는 것이 시야 결손의 진행을 늦출 수 있다는 사실이 알려졌기 때문에 지난 수십 년간 녹내장의 치료는 주로 안압의 하강에 초점이 맞춰졌다.^{1,2} 최근에는 녹내장의 가장 주요한 병태생리학적 특징인 망막신경절세포층의 점진적인 손상을 방지하기 위한 신경보호 기전을 규명하는 데에 관심이 모아지고 있다.^{3,4}

망막신경절세포가 여러 가지 원인에 의해 스트레스를 받게 되면 여러 가지 단백질 활성 효소들과 신호전달체계에 변화가 일어나게 된다. 허혈상태에 빠지게 되면 calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, mitogen activated protein

■ Received: 2013. 9. 28. ■ Revised: 2014. 2. 12.

■ Accepted: 2014. 6. 24.

■ Address reprint requests to Je Moon Woo, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Ulsan University Hospital,
#877 Bangeojinsunhwando-ro, Dong-gu, Ulsan 682-714, 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 111th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society 2014.

© 2014 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.

kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), protein kinase B (Akt), 그리고 protein kinase C (PKC) 등이 활성화된다.⁵⁻¹¹ 또한 ATP의 결핍, 산화 스트레스, glutamate의 증가는 미토콘드리아와 관련된 경로를 통하여 신경세포의 사멸을 유발하게 된다.¹² 최근에는 당뇨 망막병증 또한 망막신경절세포층의 결손이 유발되는 신경퇴행성 질환으로 여겨지고 있어 그 기전에 관한 연구가 활발히 진행 중이다.

당뇨 망막병증의 신경퇴행에 대한 기전은 다음의 두 가지 가설에 의해 제기되었다. 먼저 혈액-망막 장벽(blood-retinal barrier)의 파괴로 인한 혈관 투과성의 증가로 인해 망막 내의 세포 외 체액(extracellular fluid)의 조절 실패로 인해 황반 부종 등을 유발하게 된다.¹³ 또한 당뇨는 망막에서 세포사멸을 증가시키게 되는데 고혈당증, 산화 스트레스, 그리고 당화반응 등의 환경에서 신경퇴행이 일어나는 것으로 알려졌다. 그러나 그 기전에 대해서는 몇 가지 가설이 제시되었을 뿐 아직까지 명확하게 밝혀진 바는 없다.^{14,15}

고장성과 같은 환경에서 세포는 위축되어 스트레스를 받게 되며 세포 내 염(salt)의 증가로 세포손상이 초래된다. 세포가 고장성 환경에 노출되면 일차적으로 세포 내에 존재하는 물이 세포 외부로 이동하여 세포의 위축(shrinkage)이 일어나게 되고 세포 내 삼투농도는 증가하게 되는데 K⁺, Cl⁻와 같은 이온과 물이 세포 내로 재흡수되어 세포의 크기는 원래대로 회복되지만 세포 내 삼투농도는 증가된 상태로 유지된다.¹⁶ 최근의 연구 결과에 의하면 고장성은 double-stranded DNA break (DSDB)를 유발하여 결과적으로 세포 자멸사를 유발하게 되는데 신장 수질에서 고장성에 의해 활성화된 TonEBP (Tonicity responsive enhancer binding protein)는 여러 유전자들의 전사(transcription)를 활성화시켜 inositol, betaine, taurine, sorbitol 등의 organic osmolytes의 세포 내 축적에 관련된 유전자 및 Hsp70의 발현을 증가시켜 고장성에 의한 스트레스로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 담당하고 있다.

따라서 본 연구에서는 당뇨 망막병증 환자와 같은 고혈당으로 인해 발생할 수 있는 고장성 및 고오스몰 농도 환경에 노출되었을 때 RGC-5 세포에서의 TonEBP의 발현 정도에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법

RGC-5 세포 배양과 분화 및 고장성 스트레스 유발

RGC-5 세포주를 선택적으로 분리, 분주(ATCC, Manassas, VA)하여 RIPA buffer (Tris/Cl (pH 7.6); 100 mmole/L, EDTA; 5 mmole/L, NaCl; 50 mmole/L, b-glycerophosphate;

50 mmole/L, NaF; 50 mmole/L, Na₃VO₄; 0.1 mmole/L, NP-40; 0.5%, sodiumdeoxycholate; 0.5%)에서 24시간 동안 배양하였고 Staurosporine (Sigma, S5921)을 500 nM 농도로 2시간 처리하여 분화시킨 후 고장성 및 고오스몰 농도 스트레스를 유발하기 위해 50 mM NaCl, 100 mM mannitol, 50 mM glucose, 100 mM glucose를 3, 6, 12, 24시간 처리하여 단백질을 추출하였다. 대조군은 RGC-5 세포주를 Staurosporine으로 분화하기 전 단계와 분화 후 고장성 및 고오스몰 농도를 가하지 않은 군으로 선정하였고 고장성 및 고오스몰 농도 스트레스를 가한 실험군과의 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 비교하였다.

Western Immunoblotting

이 실험은 2회에 걸쳐 시행되었으며 첫 번째 실험에서는 50 mM NaCl, 100 mM mannitol을 3, 6, 12, 24시간 처리하였고 TonEBP와 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 발현 정도를 확인하였으며 두 번째 실험에서는 50 mM glucose, 100 mM glucose를 3, 6, 12, 24시간 처리하여 단백질을 추출하였으며 TonEBP와 β -actin의 발현 정도를 확인하였다. GAPDH는 배양된 RGC-5 세포에 10% SDS-polyacrylamide gel을 만든 후 protease inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 처리한 다음 각 well에 cell lysates 50 ug을 loading하였다. 1차 항체로는 NFAT5 (TonEBP, 1:2,000, donated from Kwon HM, Ph. D, UNIST)와 GAPDH (1:1,000, Santa Cruz, CA)를 사용하였으며 2차 항체로는 rabbit (1:10,000)을 사용하여 항원항체반응을 유도하였으며 기질로는 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) 제품을 사용하였다. 각각의 항원항체반응 사이에는 반드시 2회씩의 세척 과정을 거쳤으며 배양 후 Konica SRX-101A detection agent를 사용하여 감광시켰다.

Real-time PCR

TonEBP의 발현 정도를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 real-time PCR을 시행하였는데 첫 번째 실험에서는 50 mM NaCl 및 100 mM mannitol을 3, 6, 12, 24시간 처리한 후 TonEBP의 발현 정도를 확인하였으며 두 번째 실험에서는 glucose 50 mM의 환경에서 3, 6, 12, 24시간 처리한 후 TonEBP의 발현 정도의 변화를 확인하였다. Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 추출하였으며 reverse transcription은 SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, CA)을 사용하여 수행하였다. Primer는 Table 1에 언급한 바와 같은 sequence를 사용하였으며 cDNA는 95°C에서 10

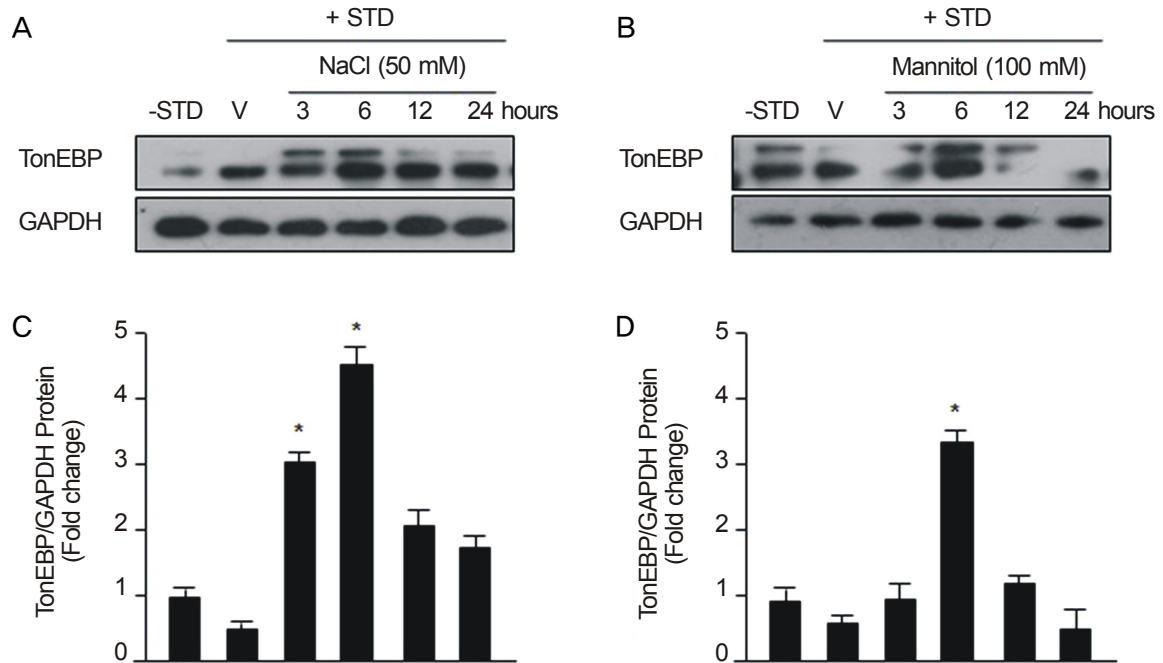


Figure 1. Hypertonic inducers increase Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) protein expression in RGC-5 cells (A, C: 50 mM NaCl; B, D: 100 mM mannitol; -STD: before preconditioning; V: just after the preconditioning; 3: 3 hours after preconditioning; 6: 6 hours after preconditioning; 12: 12 hours after preconditioning; 24: 24 hours after preconditioning; * $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test). RGC = retinal ganglion cell; STD = staurosporine; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene name	Sequence
NFAT5 (TonEBP)	F 5'-TTC ATC TCA TTG CTC AGC G-3' R 5'-GGG AGA AGA TCA TAG ACA GAT TC-3'
GAPDH	F 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3' R 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'

F = forward; R = reverse; PCR = polymerase chain reaction; NFAT5 = nuclear factor of activated T-cells 5; TonEBP = tonicity responsive enhancer binding protein; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

분간 배양한 후 이후 95°C에서 15초간 및 60°C에서 1분간 배양하여 총 40 cycles를 수행하였다. TonEBP와 GAPDH의 모든 real-time quantitative PCR은 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 수행하였다. PCR 결과는 측정된 Ct값을 기반으로 β -actin값으로 보정한 후 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산하였다. 모든 측정값은 비모수 검정인 Mann-Whitney *U*-test로 검정하여 발현 정도의 차이에 대한 통계적 유의성에 대하여 검정하였으며 통계 분석에 사용된 프로그램은 Microsoft Excel 2010과 SPSS 21.0 (IBM SPSS Co.)를 이용하였다.

결 과

Western Immunoblotting

RGC-5 세포주를 배양하여 고장성 스트레스에 노출하였을 때 TonEBP가 단백질 수준에서 발현되는 것을 Western blotting을 통해 확인할 수 있었다. 50 mM NaCl 및 100 mM mannitol을 3, 6, 12, 24시간 처리하였을 때 TonEBP가 발현되어 감광되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 감광 여부를 히스토그램으로 분석해 보았을 때 50 mM 및 100 mM NaCl을 6시간 처리 시 감광도가 가장 높았으며 시간이 경과할수록 감광도는 감소하는 추세를 보였다. 통계적으로는 50 mM NaCl 3시간, 6시간 처리했을 때와 100 mM mannitol 6시간 처리했을 때 발현 정도에 있어 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test).

다음으로 50 mM 및 100 mM glucose를 처리한 실험에서도 TonEBP는 처리 후부터 24시간 후까지 비교적 일정하게 발현되는 것을 확인할 수 있었으나 대조군과 비교하여 통계적 유의성을 보이지는 않았다. 100 mM glucose를 처리했을 때에는 TonEBP의 발현 정도가 처리 3시간 후가 가장 높았고 그 이후에는 시간이 지날수록 감소하는 추세를 보였다. 통계적으로는 100 mM glucose 처리 후 3시간 및 6시간 후에서 유의성을 보였다(Fig. 2).

Real-time PCR

TonEBP의 발현 정도를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 real-time PCR을 수행하였다. 먼저 50 mM NaCl과 100 mM

mannitol을 3, 6, 12, 24시간 처리 후 각 시점에서의 TonEBP 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하였다. 50 mM NaCl 처리 3시간 및 100 mM mannitol 처리 3시간 및 24시간 후에서 통계적 유의성을 보였다. 두 경우 모두 약물 처리 후 3시간 후에서 발현 정도가 가장 높았으며 이후 6시간 후에 감소했다가 시간이 지나면서 다시 조금씩 증가하는

경향을 보였다(Fig. 3).

다음으로 50 mM glucose를 3, 6, 12, 24시간 처리한 실험에서는 통계적으로 3시간, 24시간 경과 후의 발현 정도가 유의성 있게 나타났으며 glucose 처리 후 3시간째 증가했다가 이후 6시간째 감소 후 시간이 지나면서 다시 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4).

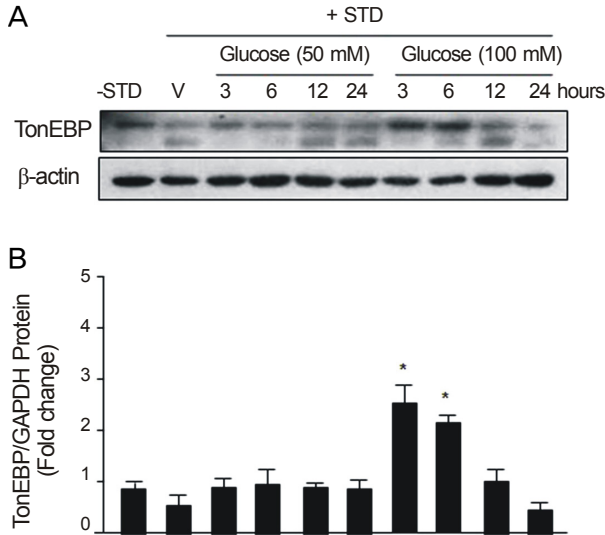


Figure 2. High glucose increases Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) protein expression in RGC-5 cells (50 mM glucose, 100 mM glucose; A: Western blotting; B: Histogram; -STD: before preconditioning; V: just after the preconditioning; 3: 3 hours after preconditioning; 6: 6 hours after preconditioning; 12: 12 hours after preconditioning; 24: 24 hours after preconditioning; * $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test). RGC = retinal ganglion cell; STD = staurosporine; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

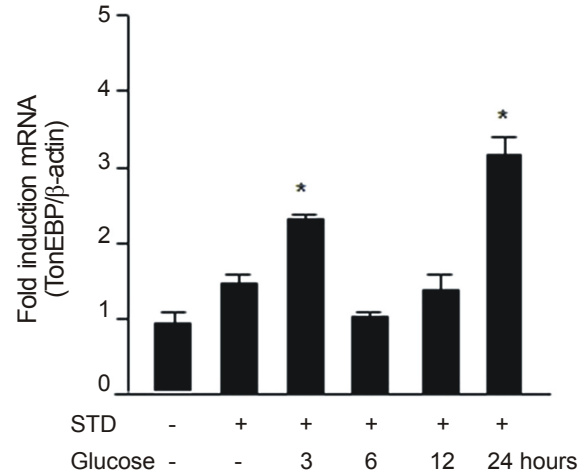


Figure 4. High glucose increases Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) messenger Ribonucleic acid (mRNA) expression in RGC-5 cells (-STD: before preconditioning; + STD and -glucose: just after the preconditioning; 3: 3 hours after preconditioning; 6: 6 hours after preconditioning; 12: 12 hours after preconditioning; 24: 24 hours after preconditioning; * $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test). RGC = retinal ganglion cell; STD = staurosporine.

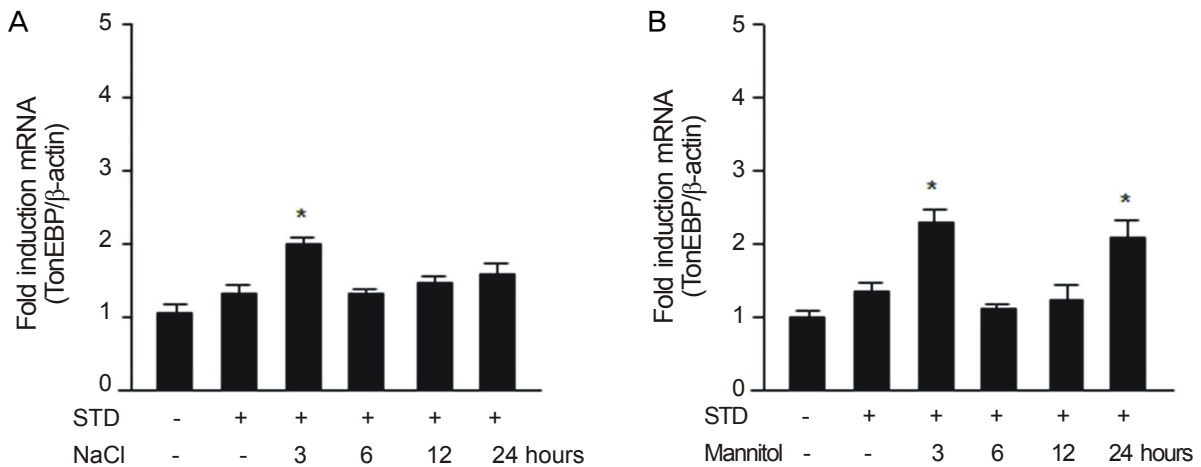


Figure 3. Hypertonic inducers increase Tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) messenger Ribonucleic acid (mRNA) expression in RGC-5 cells (A: 50 mM NaCl; B: 100 mM mannitol; -STD: before preconditioning; + STD and -NaCl/-mannitol: just after the preconditioning; 3: 3 hours after preconditioning; 6: 6 hours after preconditioning; 12: 12 hours after preconditioning; 24: 24 hours after preconditioning; * $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U*-test). RGC = retinal ganglion cell; STD = staurosporine.

고 찰

망막신경절세포(retinal ganglion cell)의 손상 또는 죽음은 결국 비가역적인 시야결손 또는 시력저하를 유발하므로 이를 예방하기 위해 망막신경절세포가 여러 스트레스 환경에 노출될 때 이를 보호하는 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그중 당뇨병과 같은 만성 대사성 질환에 있어서 고혈당으로 인한 고장성 환경에 의한 스트레스가 유발될 때 망막신경절세포를 보호하기 위한 세포보호기전에 대한 연구가 최근 조망받고 있으며 분자유전학적인 관점에서 그 기전을 밝혀내고자 많은 연구들이 이루어지고 있다. 본 연구 또한 그 기전 중 하나로 알려진 TonEBP의 발현에 대해 실험적으로 고장성 환경에서 mRNA 및 단백질 수준에서 TonEBP가 발현된다는 것을 확인할 수 있었다.

TonEBP는 Rel family에 속하는 전사조절인자로서 고장성 환경에 의해 활성화된 TonEBP는 vasopressin-regulated urea transporter (UT-A) 및 Hsp70 단백질의 발현을 증가시켜 스트레스로 인한 세포사멸을 막아주는 데 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려졌다.^{17,18} 아직까지 TonEBP의 활성화기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 보고된 바에 따르면 TonEBP의 transactivation domain이 고장성에 의해 활성화된다고 알려졌으며 인산화가 크게 증가하는데 주로 serine과 tyrosine이 인산화되는 것으로 보고되었다. 또한 TonEBP의 발현으로 인해 sodium/myo-inositol cotransporter (SMIT) 및 aldose reductase (AR)가 활성화되는 것으로 알려졌는데 뇌 손상 또는 당뇨병병증이 일어난 조직에서 증가되어 있는 것으로 알려졌으나 그 기전에 대해서는 명확히 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 당뇨 망막병증 환자에서 발생할 수 있는 고혈당에 의한 고장성 환경에서 망막신경절세포가 죽음에 이르는 과정을 방지하기 위해 TonEBP와 같은 전사조절인자를 활성화시킨다는 추측하에 실험적으로 고장성 환경 내에서 TonEBP의 발현 여부를 확인한 것이다. 아직까지는 TonEBP의 발현과 관련하여 고장성 스트레스 외에 다른 조절 기전에 대해서는 알려진 바가 없으나 신장(kidney)을 제외한 뇌(brain), 간(liver), 고환(testis), 흉선(thymus)과 같은 내분비 조직, 생식기관, 면역 조직에서 관찰된 바가 있어 고장성에 대한 세포의 보호 기능 외에도 다른 기능이 TonEBP에 존재할 것으로 예상되고 있다.¹⁹⁻²¹

먼저 본 실험에서 TonEBP의 단백질 수준에서의 발현여부를 보기 위해 Western blotting을 시행한 실험에서는 50 mM NaCl 처리 3, 6시간 후와 100 mM mannitol 처리 6시간 후, 그리고 100 mM glucose 처리 3, 6시간 후에서 통계적으로 유의한 발현 정도를 보였다. 이를 종합해보면

TonEBP의 단백질 발현 정도는 고장성 환경의 농도에 의존적으로 증가할 것이라고 예상된다. 모든 약물 처리 후 초기인 3, 6시간 후에 유의하게 발현된 부분과 50 mM glucose를 처리했을 때는 통계적으로 유의한 발현 정도를 보이지 않았고 100 mM glucose를 처리했을 때 유의한 발현 정도를 보인 점이 이를 뒷받침해주고 있다. 따라서 단백질의 발현 정도는 농도가 높을수록 즉 고장성인 환경일수록 잘 발현될 것으로 생각한다. 본 실험에서는 단백질 발현 정도를 확인할 수 있는 Western immunoblotting에서 50 mM 및 100 mM glucose를 처리했을 때 농도 의존적으로 단백질이 발현되는 것을 확인하였고 단백질 발현 전 단계인 mRNA 수준에서도 50 mM glucose에서 mRNA가 발현되는 것을 확인하였기 때문에 100 mM glucose에서는 real-time PCR을 시행하지 않았다. 다만 50 mM glucose의 경우에는 단백질 발현 정도에 있어 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않은 부분에 대해서는 TonEBP의 발현이 유도되는 glucose의 고장성 농도가 얼마인지에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각한다. 따라서 농도별로 좀 더 세분화하여 추가 실험을 해본다면 TonEBP의 발현이 어느 농도에서부터 발현되는지, 그리고 발현 정도가 농도 의존성인지에 대해 더 많은 결과들을 알 수 있을 것이다.

다음으로 생각해 볼 수 있는 것은 real-time PCR에서는 다른 경향성을 보이고 있다는 점이다. 물론 통계적으로 모두 유의한 것은 아니지만 50 mM NaCl, 100 mM mannitol, 50 mM glucose 세 경우 모두에서 초기 3시간 경과 후에 mRNA 발현도가 가장 높았고 이후 6시간 후에는 발현도가 가장 낮았으며 이후 시간이 지날수록 다시 증가하는 경향을 보인 점이다. 이는 Western blotting에서는 초기에만 발현되고 24시간에 이르러서는 발현이 모두 감소했지만 real-time PCR에서는 초기에 발현되고 중간에 감소했다가 24시간 후에 다시 mRNA의 발현도가 증가했다는 점이다. 따라서 TonEBP의 mRNA 전사가 단백질 발현까지 모두 이어지지 않았다고 추측해 볼 수 있으며 이와 관련한 활성 기전에 있어 다른 조절 메커니즘에 의해 TonEBP의 발현이 중간에 조절되고 있다는 가능성을 제기해 볼 수 있다. 다만 아직까지 TonEBP의 활성화기전 및 그 역할에 대해서 정확히 알려진 바가 없기에 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 현재까지 보고된 바에 따르면 TonEBP는 고장성(hypertonic) 스트레스 환경에서 발현되어 세포 사멸을 막아주는 역할을 하고 있는 것으로 알려졌으나 다른 역할로는 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)와 같은 전사인자들을 활성화시키는데 영향을 끼치는 것으로도 알려졌다. NF- κ B는 vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α

(TNF- α), Endothelin-1 등을 활성화시켜 망막 내 신생혈관 형성 및 황반 부종을 촉진시키는 것이 확인되었다. 따라서 당뇨 망막병증과 같은 경우 발생할 수 있는 염증 반응의 유발 및 조절 메커니즘에서 TonEBP가 관여하는 역할에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.²²⁻²⁸

본 연구에서는 RGC-5 세포가 고장성 스트레스 환경에 노출되었을 때 TonEBP를 발현시킨다는 것을 mRNA 및 단백질 수준에서 확인하였다. 다만 본 실험은 고장성 스트레스 환경에서 TonEBP가 발현되었다는 사실만 확인하였을 뿐, 그 조절 기전에 대해서는 본 실험만을 통해서 밝힐 수 없었으며 앞서 언급한대로 TonEBP가 발현되기 시작하는 glucose의 고장성 농도는 얼마인지, 그리고 고장성 농도별로 TonEBP가 발현되는 정도에 대한 추가 실험을 통해 TonEBP의 발현 정도와 고장성 농도 간의 상관관계에 대해 알아보아야 할 것이다. 그리고 mRNA 수준에서의 발현 정도와 단백질 수준에서의 발현 정도가 시간대에 따라 차이가 나는 점에 대해서도 추가적인 실험 및 고찰을 통해 TonEBP가 발현되는 데 있어서 고장성 스트레스 외에 다른 요인 및 다른 전사조절인자들이 관여하는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 또한 본 실험은 세포 수준에서 수행하였기 때문에 실제 동물 모델에서도 같은 결과를 보일 수 있을지에 대한 추가 실험도 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) The Advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:429-40.
- 2) Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma study group. *Am J Ophthalmol* 1998;126:487-97.
- 3) Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.
- 4) Flammer J, Haefliger IO, Orgül S, Resink T. Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucoma damage? *J Glaucoma* 1999;8:212-9.
- 5) Matsumoto S, Shamloo M, Matsumoto E, et al. Protein kinase C-gamma and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha are persistently translocated to cell membranes of the rat brain during and after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:54-61.
- 6) Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 1994;75: 586-90.
- 7) Piccoletti R, Bendinelli P, Arienti D, Bernelli-Zazzera A. State and activity of protein kinase C in postischemic reperfused liver. *Exp Mol Pathol* 1992;56:219-28.
- 8) Padanilam BJ. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney Int* 2001;59: 1789-97.
- 9) Tanaka C, Nichizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:551-67.
- 10) Chen L, Hahn H, Wu G, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11114-9.
- 11) Whitlock NA, Agarwal N, Ma JX, Crosson CE. Hsp27 upregulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1092-8.
- 12) McNaughts KS, Carrupt PA, Altomare C, et al. Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the etiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 1998;56:921-33.
- 13) Cunha-Vaz J, Faria de Abreu JR, Campos AJ. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* 1975;59: 649-56.
- 14) King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25:255-70.
- 15) Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 2001;276:32814-21.
- 16) Hoffmann EK, Dunham PB. Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 1995; 161:173-262.
- 17) Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* 2000;275:38275-80.
- 18) Woo SK, Lee SD, Na KY, et al. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 2002;22:5753-60.
- 19) Cha JH, Woo SK, Han KH, et al. Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding protein in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2221-30.
- 20) Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, et al. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 2001; 15:47-58.
- 21) Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, et al. Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hypoosmotic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F688-93.
- 22) Favale NO, Casali CI, Lepera LG, et al. Hypertonic induction of COX2 expression requires TonEBP/NFAT5 in renal epithelial cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2009;381:301-5.
- 23) Roth I, Leroy V, Kwon HM, et al. Osmoprotective transcription factor NFAT5/TonEBP modulates nuclear factor-kappaB activity. *Mol Biol Cell* 2010;21:3459-74.
- 24) Woo SK, Lee SD, Na KY, et al. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in Response to Hypertonicity. *Mol Biol Cell* 2002;22:5753-60.
- 25) Lee SD, Choi SY, Lim SW, et al. TonEBP stimulates multiple cellular pathways for adaptation to hypertonic stress: organic osmolyte-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F707-15.
- 26) Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a

- calcineurin-dependent manner. J Immunol 2000;165:4884-94.
- 27) Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, et al. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. Nat Cell Biol 2002;4:540-4.
- 28) Trama J, Go WY, Ho SN. The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. J Immunol 2002;169:5477-88.

= 국문초록 =

망막신경절세포에서 고장성 및 고오스몰 스트레스에 의한 긴장성 반응유도 결합단백질의 발현

목적: 고장성(hypertonicity) 및 고오스몰 농도(hyperosmolarity) 환경에서 망막신경절세포(RGC-5)의 전사인자인 TonEBP (Tonicity responsive enhancer binding protein)의 발현을 확인함으로써 망막신경절세포의 사멸을 방지하는 데 있어 TonEBP의 발현이 관여함을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: RGC-5 세포 배양 후 고장성 스트레스를 유발하기 위해 50 mM NaCl, 100 mM mannitol, 50 mM 및 100 mM glucose를 3, 6, 12, 24시간 처리한 후 Western immunoblotting 및 Real-time PCR을 시행하였다.

결과: 50 mM NaCl 처리 3, 6시간 및 100 mM mannitol 처리 6시간 후, 그리고 100 mM glucose 처리 3, 6시간 후에서 Western blotting을 통해 TonEBP가 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 real-time PCR을 통한 TonEBP의 발현은 50 mM NaCl 처리 3시간 및 100 mM mannitol 처리 3, 24시간 후, 그리고 50 mM glucose 처리 3, 24시간 후에서 통계적 유의성을 보였다.

결론: Staurosporine으로 분화시킨 RGC-5 세포를 고장성 스트레스 환경에 노출시켰을 때 TonEBP가 발현되는 것을 단백질 및 mRNA 수준에서 확인할 수 있었다.

〈대한안과학회지 2014;55(8):1195-1201〉
