

섬유주세포에서 덱사메타존이 산화질소의 생성에 미치는 영향

이수윤 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 덱사메타존(DEX)이 섬유주세포의 일산화질소(nitric oxide, NO) 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포에 0, 10, 100, 1000 nM DEX를 3일간 노출시킨 후 NO의 생성량을 조사하였다. NO의 생성에 작용하는 합성경로를 알아보기 위하여 100 μ M sepiapterin과 ascorbic acid, 10 μ M methotrexate에도 노출시켰다. 세포 생존율은 MTT, NO 생성은 Griess assay로 측정하였다.

결과: DEX는 섬유주세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다. DEX는 100 nM의 농도부터 유의하게 NO의 생성을 감소시켰다. ascorbic acid는 DEX에 의한 NO 생성억제작용을 상쇄시켰으나 Sepiapterin과 methotrexate는 DEX의 NO의 생성 억제에 영향을 주지 않았다.

결론: DEX는 섬유주세포의 NO 생성을 억제하였으며 tetrahydrobiopterin의 신합성경로에 영향을 끼친 것으로 생각된다. DEX는 섬유주세포에서 NO의 생성을 억제함으로써 섬유주의 방수유출을 감소시켜 안압상승을 유발할 수 있을 것이다.

(대한안과학회지 2009;50(8):1254-1258)

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 개방각녹내장을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 이러한 섬유주를 통한 방수유출을 조절함에 있어서 일산화질소(nitric oxide, NO)가 중요한 역할을 하며 녹내장이 있는 경우에는 NO합성효소의 활성이 감소되어 있는 것으로 알려져 있다.³⁻⁶

합성 글루코코르티코이드인 덱사메타존(dexamethasone, DEX)은 안압상승을 유발하여 이차성개방각녹내장을 유발하는 것으로 알려져 있으며⁷ 당뇨가 있을 경우 발병할 위험이 높은 것으로 알려져 있는데⁸ 포도당의 농도가 증가하면 NO의 생성이 저하되는 것으로 알려져 있다.⁹ 자유유리기인 NO는 인체 내에서 다양한 역할을 하며¹⁰⁻¹² NO의 생성에 있어서 tetrahydrobiopterin (BH₄)이 중요한 co-factor로 작용하는데 그 합성 경로는 신합성경로(de novo pathway)와 재합성경로(salvage pathway)가 있다.¹³ 섬유주세포에서도 NO합성효소가 발현될 뿐만 아니라¹⁴⁻¹⁶ 글루코코르티코이드 수용체가 나타나므로¹⁷ DEX가 NO의 생성을 저하시킬 가능성이 있으나 인체의 섬유주세포에서 DEX가 NO의 생성에 미치는 영향은 아직 알려져 있지 않으며 그 합성경로

또한 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 인체의 섬유주세포를 일차배양하여 DEX가 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보고, 그와 관련된 효소적 합성경로를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 전방각 주위 조직을 제거한 후 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, USA)로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, USA)와 15% 우태아혈청(Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, USA)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청을 포함한 배지로 1 : 3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

약물처리

24 well 배양접시에 2×10^4 cells/ml의 농도로 각 well에 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 0, 1, 10, 100, 1000 nM의

■ 접 수 일: 2008년 12월 8일 ■ 심사통과일: 2009년 5월 19일

■ 책임저자: 김 재 우

대구시 남구 대명4동 3056-6
대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

텍사메타존(DEX, Sigma, USA)에 3일간 동안 노출시켰다. 또한 NO의 생성에 작용하는 효소적 합성경로를 알아보기 위하여 각각 100 μ M의 sepiapterin (Sigma, USA)과 ascorbic acid (Sigma, USA), 그리고 10 μ M의 methotrexate (Sigma, USA)를 DEX에 동시에 노출시켰다.

MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포증식과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 colorimetric test의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, USA) assay를¹⁸ 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를¹⁹ 이용하였다. MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, USA)를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 μ l씩 옮겨 spectrophotometer (SIRIOS, Italy)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다. Griess assay는 3일 동안 약물처리한 세포의 배지에 동량의 Griess 반응액(Sigma, USA)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 NO생성의 반응물인 아질산염의 양을 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3세대에서 5세대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주 세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주 조직의

이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장양상으로 확인하였다.^{20,21}

DEX가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

DEX를 3일간 섬유주세포에 노출시켰을 때 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 세포의 생존은 유의한 변화를 보이지 않았다($p>0.05$, Fig. 1). 이러한 결과는 다른 약물을 동시에 처리한 경우에도 유사하여 본 실험에 사용된 약제들은 섬유주세포의 생존에 유의한 변화를 초래하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

DEX가 NO 생성에 미치는 영향

DEX는 섬유주세포에 있어서 100 nM부터 농도에 비례하여 유의하게 NO의 생성을 감소시켰다($p<0.05$, Fig. 2). 또한 sepiapterin을 DEX에 동시에 노출시킨 경우에는 DEX에 의한 NO 생성억제작용에 영향을 미치지 않았으며($p<0.05$, Fig. 3), ascorbic acid에 동시에 노출시킨 경우에는 NO의

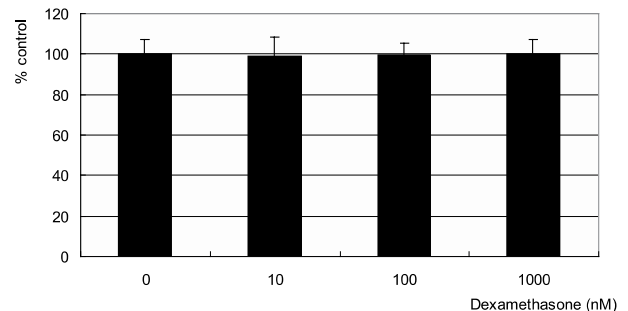


Figure 1. Effect of dexamethasone on the survival of cultured trabecular meshwork cells. Three-day exposure of dexamethasone did not significantly affect the survival of trabecular meshwork cells compared to non-exposed control ($p>0.05$).

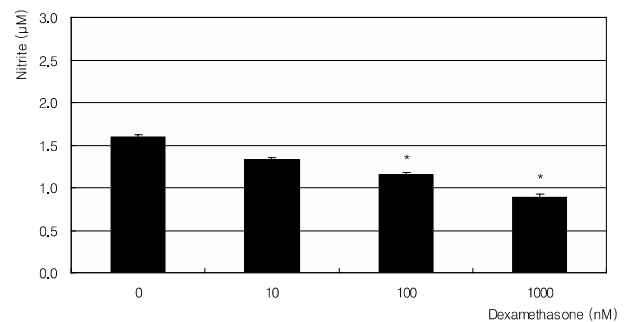


Figure 2. Effect of dexamethasone on the production of nitric oxide in cultured trabecular meshwork cell exposed for 3 days. Dexamethasone decreased nitric oxide production (* $p<0.05$).

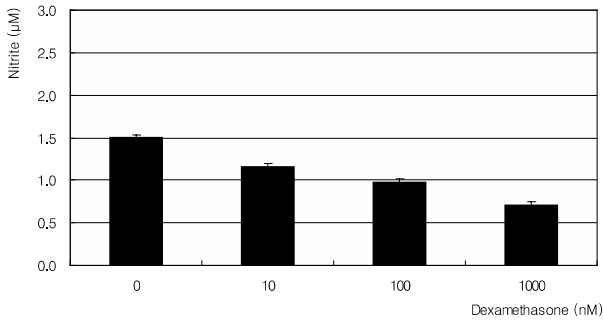


Figure 3. Effect of 100 μ M sepiapterin on the production of nitric oxide after co-exposed to dexamethasone for 3 days. Sepiapterin further decreased nitric oxide production compared to non-exposed control (* p <0.05).

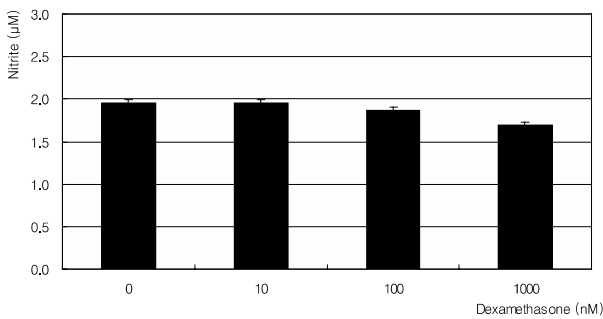


Figure 4. Effect of 100 μ M ascorbic acid on the production of nitric oxide (NO) after co-exposed to dexamethasone for 3 days. Ascorbic acid increased NO production and abolished dexamethasone-induced inhibition of NO production (p >0.05).

생성이 증가되어 DEX에 의한 NO 생성억제작용이 상쇄되었다(p >0.05, Fig. 4). 한편 methotrexate도 DEX에 의한 NO 생성억제작용에 영향을 미치지 않았다(p <0.05, Fig. 5).

고 찰

본 연구의 결과는 DEX가 배양된 사람의 섬유주세포에서 NO의 생성을 감소시키며 그 기전은 BH_4 의 신합성경로에 관여한다는 것을 보여주고 있다.

글루코코르티코이드는 섬유주에 다양한 효과를 나타내며²² DEX를 장기간 노출시킬 경우 섬유주세포의 변성을 유발할 수 있으나 세포의 증식에는 본 연구의 결과와 같이 별 다른 영향을 미치지 않으나 구조적 기능적 변화를 유발한다고 한다.²³ 그러나 DEX는 섬유주세포의 형태학적 변화를 유발할 뿐만 아니라 섬유주세포의 endothelin의 발현을 증가시켜 NO의 생성저하를 초래하기도 하는 것으로 알려져 있다.²⁴ 또한 스테로이드는 myocillin 유전자의 발현에 관여하는 것으로 알려져 있으나²⁵ myocillin의 발현은 연령과 무관하게

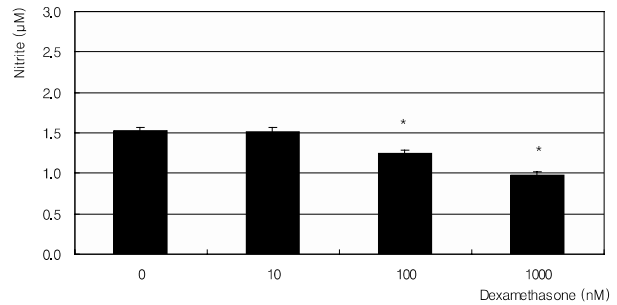


Figure 5. Effect of 10 μ M methotrexate on the production of nitric oxide after co-exposed to dexamethasone for 3 days. Methotrexate did not affect the dexamethasone-induced inhibition of nitric oxide production compared to non-exposed control (* p <0.05).

나타난다는 보고도 있어²⁶ 녹내장에 있어 myocillin의 역할에 대해서는 좀 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

자유유리기인 NO는 고농도에서는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발하기도 하지만 저농도에서는 인체에서 중요한 생리적인 조절인자로 작용한다.¹⁰⁻¹² 기존의 한 연구에서는 하루 동안 DEX에 노출시킨 후 24시간이 지난 후 NO의 생성량은 변화가 없었다는 보고도 있으나²⁴ 본 연구의 결과에서 3일간 노출 후 측정된 NO는 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

NO의 합성에는 BH_4 이 중요한 역할을 하는데 그 효소적 합성경로는 새로 BH_4 를 만들어내는 신합성경로와 기존의 BH_4 를 다시 이용하는 재합성경로로 구분된다.¹³ 본 연구의 결과에서 DEX에 동시에 노출시킨 경우 신합성경로에 저해제로 작용하는 sepiapterin은 DEX에 의한 NO의 생성에 영향을 끼치지 않았고 재합성경로에서 촉진제로 작용하는 ascorbic acid는 NO의 생성을 증가시켜 DEX에 의한 NO 생성저하작용을 상쇄시킨 것으로 나타났으며 재합성경로에서 저해제로 작용하는 methotrexate는 DEX에 의한 NO 생성저하작용에 영향을 끼치지 않고 NO의 생성을 억제시켰다. 따라서 인체의 섬유주세포에서 DEX는 신합성경로를 통해 BH_4 의 새로운 생성을 억제하여 결과적으로 NO의 생성을 억제할 수 있을 것으로 생각되며 그 결과 임상적으로 섬유주를 통한 방수유출을 감소시켜 안압상승을 유발할 가능성이 있다고 볼 수 있다.

섬유주에서 NO의 생성감소는 섬유주를 위축시켜 방수유출을 저하시킬 뿐만 아니라 NO의 생리적 활성을 저하시켜 다양한 병적 결과를 초래할 수 있다. 즉 NO의 생리적 활성저하에 따라 해로운 superoxide나 peroxynitrite 같은 해로운 활성산소종의 생성이 오히려 증가하게 되는데²⁷ 이러한 활성산소종은 산화스트레스를 유발할 뿐만 아니라 세포의 노화를 초래하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁻³⁴ 따라서 섬유주의

NO 생성감소에 의해 산화스트레스가 지속될 경우 섬유주 세포의 변성을 유발하며 섬유주세포의 노화를 초래할 수도 있을 것이다. 연령이 증가할수록 섬유주세포의 숫자가 감소하고³⁵ 원발성 개방각 녹내장의 조직소견이 노화된 세포와 유사한 점을³⁶⁻³⁹ 고려해보면, NO는 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 뿐만 아니라 섬유주세포의 노화를 방지하는 작용도 나타낼 가능성이 있기 때문에 섬유주에서 생리적인 NO의 생성을 유지하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러므로 본 연구의 결과와 같이 NO의 생성이 감소되면 단기적으로는 섬유주를 통한 방수유출이 저하되어 안압을 상승시킬 수 있을 뿐만 아니라, 장기간 NO 생성이 저하되면 산화스트레스가 유발되고 섬유주세포가 노화되어 그 기능이 떨어짐으로써 섬유주를 통한 방수유출이 감소되어 결과적으로 녹내장을 유발할 수도 있을 것이다.⁴⁰ 그러나 이러한 가능성에 대해서는 향후 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 DEX는 배양된 사람의 섬유주세포에 대해 세포의 생존에는 영향을 주지 않았으나 NO의 생성을 저하시켰으며 그 기전은 BH₄의 신합성경로를 억제에 의한 가능성이 있는 것으로 보인다. 이러한 NO의 생성저하는 스테로이드에 의해 안압이 상승하는 기전이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- Rohen JW, Lütjen-drecoll E, Flügel C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and ocular facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
- Wana RF, Podos SM. Effect of the topical application of nitroglycerin on intraocular pressure in normal and glaucomatous monkeys. *Exp Eye Res* 1995;60:337-9.
- Nathanson JA, McKee M. Alteration of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1774-84.
- Matsuo T. Basic nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
- Francois J. Corticosteroid glaucoma. *Ann Ophthalmol* 1977;9:1075-80.
- Becker B. Diabetes and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1971;1:1-16.
- Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, et al. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol* 2001;280:480-6.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-95.
- Brüne B, Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72.
- Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992;267:25722-9.
- Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1765-73.
- Geyer O, Podos SM, Mittag T. Nitric oxide synthase activity in tissues of the bovine eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;35:786-93.
- Meyer P, Champion C, Schlotzer-Schrehardt U, et al. Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res* 1999;18:375-80.
- Weinreb RN, Bloom E, Baxter JD, et al. Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:403-7.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Green LC, Wagner DA, Glogoski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biologic fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 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.
- Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- Wordinger RJ, Clark AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: Towards a better understanding of glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 1999;5:629-67.
- 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.
- 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.
- Clark AF, Steely HT, Dickerson JE, 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.
- Cheng LE, Ueda J, Wentz-hunter K, Yue BY. Age independent expression of myocillin in the human trabecular meshwork. *Int J Mol Med* 2002;10:33-40.
- Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413-20.
- Padgaonkar V, Giblin FJ, Leverenz V, et al. Studies of H₂O₂-induced effects on cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Glaucoma* 1994;3:123-31.
- Vasa M, Kristin Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell Senescence. *Circ Res* 2000;87:540-2.
- Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from ocular tissue:

- the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
- 31) Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:2417-26.
- 32) von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908:99-110.
- 33) Wei, YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.
- 34) Furumoto K, Inoue E, Nagao N, et al. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 1998;63:935-48.
- 35) Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1987;1:204-10.
- 36) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 37) Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RC. Age-related changes in protein profiles of the normal human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 1987;45:623-31.
- 38) Schchschabel DO, Binninger E. Aging of trabecular meshwork cells of the human eye in vitro. *Z Gerontol* 1990;23:133-5.
- 39) Horstmann HJ, Rohen JW, Sames K. Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Ageing Dev* 1983;21:121-36.
- 40) Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.

=ABSTRACT=

Effect of Dexamethasone on the Production of Nitric Oxide in Trabecular Meshwork Cells

Soo Yoon Lee, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

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

Purpose: To investigate the effects of dexamethasone (DEX) on the production of nitric oxide (NO) and its enzymatic synthetic pathway in cultured human trabecular meshwork (HTM) cells.

Methods: Primarily cultured HTM cells were exposed to 0, 10, 100, 1000 nM of DEX for 3 days. In addition, 100 μ M sepiapterin, 100 μ M ascorbic acid, and 10 μ M methotrexate were co-exposed to DEX. The cellular survival and nitrite production rates were assessed by MTT assay and Griess assay, respectively.

Results: DEX did not significantly affect the survival of cultured HTM cells. DEX decreased the NO production in a dose-dependent manner. With co-exposure of DEX, ascorbic acid nullified the DEX-induced decrease of NO production. Sepiapterin and methotrexate did not affect DEX-induced decrease of NO production.

Conclusions: DEX decreased NO production in HTM cells and the de novo pathway of tetrahydrobiopterin may be involved. This decrease may raise intraocular pressure by decreasing trabecular outflow.

J Korean Ophthalmol Soc 2009;50(8):1254-1258

Key Words: Dexamethasone, Nitric oxide, Tetrahydrobiopterin, Trabecular meshwork cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu College of Medicine

#3056-6 Daemyeung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr