

쥐 신경절세포주에서 α -2
아드레날린수용체 효현약물의
신경보호효과

연세대학교 대학원

의 학 과

안 재 홍

쥐 신경절세포주에서 α -2
아드레날린수용체 효현약물의
신경보호효과

연세대학교 대학원

의 학 과

안 재 홍

쥐 신경절세포주에서 α -2
아드레날린수용체 효현약물의
신경보호효과

지도 홍영재 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

안 재 홍

안재홍의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

감사의 글

먼저 이 모든 것을 가능하게 하신 하나님께 감사를 드립니다. 하나님께서 적절한 때에 꼭 필요한 분들을 만나게 하시고 모든 과정 가운데 함께 해 주셨기 때문입니다. 그리고 본 논문을 쓸 수 있도록 도와 주신 모든 분들께 감사를 드립니다. 특히 저를 녹내장 전문의가 될 수 있도록 이끌어 주시고 박사학위까지 지도해 주신, 존경하는 은사이신 홍영재 지도교수님께 깊은 감사와 존경을 드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 세심한 조언과 격려를 해 주신 안영수 교수님과 이종은 교수님께도 감사를 드립니다. 또한 연구과정에서 저를 격려해 주시고 많은 관심을 가져 주셨던 유호민 교수님께도 감사를 드립니다.

실제로 이 논문은 실험실을 제공해 주시고 실험을 도와주신 묵인희 교수님의 지도와 격려 그리고 도움 없이는 불가능하였다고 생각되어 진심으로 감사를 드립니다. 실험에 사용할 세포주를 제공해 주시고 많은 조언과 격려를 해 주신 성공제 교수님께도 감사를 드립니다. 특히 실험을 도와주고 실험 방법을 지도해 주셨던 홍현석 박사께 감사를 드립니다. 또한 실험을 도와주었던 김주연 학생과 영문초록 교정을 보아 준 처제에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다.

끝으로, 곁에 있는 것만으로도 저를 행복하게 해 주는 사랑하는 아내와 두 아이들 혜원이와 찬영이 그리고 언제나 저를 위해 기도해 주시는 사랑하는 양가 부모님들과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	iii
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. Transformed rat retinal ganglion cell line의 배양	8
2. Thapsigargin 처리	8
3. 아드레날린 수용체 약물 처리	9
4. LDH 분석	9
5. Western blot 분석	9
6. TUNEL 염색	11
7. 통계 분석	11
III. 결과	12
1. RGC-5 세포에서 아드레날린 수용체 약물이 ER stress에 의한 세포사에 미치는 영향	12
2. 아드레날린 수용체 약물 처리 후 TUNEL 염색을 통한 RGC-5 세포의 세포자멸사 분석	13
3. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 brimonidine의 caspase-12 억제효과	14
4. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 brimonidine이 PARP의 발현에 미치는 영향	15
5. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 caspase-12와 caspase-3의 연관성	16
IV. 고찰	18
V. 결론	25
참고문헌	27
영문요약	36

그림 차례

그림 1. RGC-5 세포에서 thapsigargin 처리와 brimonidine 농도별 전처치에 따른 LDH 분석 결과 12

그림 2. RGC-5 세포에서 thapsigargin($1 \mu\text{M}$) 투여군과 brimonidine($100 \mu\text{M}$) 혹은 betaxolol($100 \mu\text{M}$) 전 처치 후 thapsigargin을 투여한 군의 TUNEL 염색 결과 13

그림 3. RGC-5 세포에서 ER stress에 의한 caspase-12의 활성화에 대한 brimonidine의 억제 효과 14

그림 4. RGC-5 세포에서 ER stress에 의한 PARP의 분절화에 대한 brimonidine의 억제 효과 15

그림 5. RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의한 caspase 12, caspase 3, PARP의 활성화에 caspase 3 특이적 억제제가 미치는 영향 17

쥐 신경절세포주에서 α -2 아드레날린수용체 효현약물의 신경보호효과

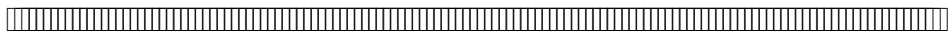
(연구배경) Endoplasmic reticulum(ER) stress에 의한 세포자멸사(apoptosis)는 알츠하이머병을 포함한 여러 퇴행성신경질환의 병인으로 주목받고 있다. 녹내장에서 발생하는 망막신경절세포의 세포자멸사도 퇴행성신경질환과 공통된 병리현상이 발견됨에 따라 망막신경절세포의 세포자멸사에도 ER stress가 관여할 가능성이 있다. 본 연구에서는 현재 사용되고 있는 녹내장 약물 중 망막신경절세포에서 신경보호효과가 있는 것으로 알려진 α -2 아드레날린수용체 효현약물인 brimonidine이 ER stress에 의해 유도된 망막신경절세포주의 세포자멸사를 억제할 수 있는지 알아보고 그 기전을 알아보고자 하였다.

(대상 및 방법) Thapsigargin 1 μ M을 transformed rat retinal ganglion cell line(RGC-5 세포)에 처리하여 ER stress를 유도하였다. Thapsigargin 처리 1시간 전에 brimonidine(25 μ M - 1000 μ M)과 betaxolol(25 μ M - 1000 μ M)을 전 처치한 후 24시간 뒤에 LDH 분석과 TUNEL 염색을 시행하여 이 약물들이 thapsigargin에 의한 RGC-5 세포의 세포자멸사를 억제할 수 있는지 알아보았으며, brimonidine(100 μ M) 사용 유무에 따른 caspase 12와 caspase 3, 그리고 PARP에 대한 western blot을 시행하였다. 또한, caspase 3 특이적 억제제인 z-DEVD-fmk 1 μ M 처리 유무에 따라 thapsigargin을 처리한 RGC-5 세포에서 caspase 12와 caspase 3, 그리고 PARP의 발현양상을 western blot을 시행하여 확인하였다.

(결과) LDH 분석 결과 thapsigargin은 RGC-5 세포에서 세포사를 유발하였으며 세포사는 brimonidine에 의해 억제되었으나 betaxolol에 의해서는 억제되지 않았다. TUNEL 염색 결과 thapsigargin을 단독

처리한 경우와 betaxolol을 전 처치 한 경우에는 다수의 TUNEL(+) 세포가 관찰되었으나 brimonidine을 전 처치한 경우에는 TUNEL(+) 세포의 숫자가 감소되는 것을 확인하였다. Western blot 을 시행한 결과 RGC-5 세포 내에 분절화 되지 않은 caspase 12와 caspase 3, 그리고 PARP가 관찰되었으며 thapsigargin에 의해 caspase 12와 caspase 3, 그리고 PARP의 분절화가 일어나는 것이 관찰되었다. Brimonidine은 thapsigargin에 의한 caspase 12와 PARP의 분절화를 억제하는 것이 확인되었으며, caspase 3 억제제인 z-DEVD-fmk는 thapsigargin에 의해 유도된 PARP의 분절화를 억제 하였으나 caspase 12의 분절화는 억제하지 못하였다.

(결론) RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의해 세포의 세포자멸사가 유발됨을 알 수 있으며 brimonidine에 의해 세포자멸사가 억제됨을 확인하였다. Thapsigargin에 의한 RGC-5 세포의 세포자멸사는 caspase 3와 caspase 12의 활성화가 관계되며 caspase 3의 활성화와 관계없이 caspase 12가 활성화됨을 알 수 있었다. Brimonidine은 caspase 12와 caspase 3의 활성화를 억제하여 thapsigargin에 의한 RGC-5 세포의 세포자멸사 억제에 기여하는 것으로 생각된다.



핵심되는 말: ER stress, 망막신경절세포, 세포자멸사, brimonidine, caspase 3, caspase 12

쥐 신경절세포주에서 α -2 아드레날린수용체 효현약물의 신경보호효과

<지도교수 홍 영 재>

연세대학교 대학원 의학과

안 재 홍

I. 서론

녹내장은 전 세계를 통하여 주요한 실명 원인 중의 하나이며, 세계 보건기구(World Health Organization)의 통계자료에 따르면 Thylofors 등은 세계 실명원인의 13.5%가 녹내장에 의한 것이며 이는 실명을 일으키는 안질환 중 3위에 해당된다고 하였다.¹ 녹내장의 병인으로 안압²과 혈류변화,³ 자가면역질환의 가능성⁴ 등이 거론되고 있으나 공통적으로 나타나는 결과는 망막의 신경절세포(ganglion cell)의 세포자멸사가 유발되며 그 축삭(axon)의 손상으로 인한 시신경병증(optic neuropathy)이 온다는 것이다.⁵ 녹내장의 발병 및 진행에 가장 주요한 위험인자는 안압이지만 안압을 적절한 수준으로 조절하여도 계속적으로 녹내장성 시신경병증이 진행되는 경우가 적지 않기 때문에⁶ 안압의 조절 이외에도 시신경유두 주변의 혈류를 증가시키거나 시신경 자체를 보호하려는 연구가 이루어져 왔으며,⁷ 시신경을 유해한 인자들로 부터 보호하여 녹내장의 진행을 막아보려는 신경보호(neuroprotection)에 관한 연구는 녹내장 분야의 주요한 연구방향이 되고 있다.⁸

녹내장에서 망막신경절세포사를 유발하는 기전으로 알려진 것은

향신경인자(neurotrophic factor)의 차단,⁹ oxidative stress,¹⁰ 세포내 전해질과 이온의 불균형, 세포외(유리체강내) glutamate 농도의 증가와 이에 따른 흥분성 아미노산 수용체의 활성화(excitotoxicity), 그리고 세포내 칼슘 이온 농도의 증가 등이며,¹¹ glutamate 수용체 억제제,¹² 칼슘통로 차단제,¹³ caspase 단백질분해효소 억제제¹⁴ 등이 동물실험모델과 세포배양모델에서 망막신경절세포의 세포자멸사를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고 되었다. 현재 사용되고 있는 녹내장 약물 중에서는 아드레날린 베타 1 수용체에 대한 선택적 차단제인 betaxolol, 아드레날린 알파 2 수용체 작용제인 brimonidine 등이 동물 실험과 세포배양 모델에서 신경보호효과가 있는 것으로 보고 되었다.¹⁵⁻¹⁶ 임상연구에 있어서는 안압하강효과가 더 좋은 timolol과의 비교시험에서 betaxolol 투여군의 시야개선효과가 더 나았다는 보고가 있으나,¹⁷ 차이가 없다는 보고도 있어¹⁸ 아직 임상적으로는 그 효과에 대한 검증이 더 필요하다. 또한, brimonidine 단독 투여시 시야개선 효과가 있었다는 보고가 있었으나 안압하강에 의한 영향을 배제하기 위해 brimonidine과 timolol의 비교연구가 진행 중이다.¹⁶ 이들 아드레날린 수용체 약물의 신경보호효과에 대한 기전은 아직 완전히 밝혀진 것은 아니나, betaxolol(10 μ M - 100 μ M)과 brimonidine(10 μ M - 100 μ M)의 경우 isolated retina model에서 glutamate 독성에 의한 칼슘 이온의 세포내 유입을 차단하는 작용을 한다는 보고가 있었으며 betaxolol은 아드레날린 수용체를 통하지 않고, brimonidine의 경우는 아드레날린 알파 2 수용체를 매개로 세포내 칼슘 유입을 차단하는 작용을 나타낸다고 하였다.¹⁹ 그러나 다른 연구에서는 betaxolol은 칼슘 통로에 대한 친화성이 있고 isolated rat retinal model에서 NMDA에 의해 유발된 칼슘의 유입을 차단하지만 brimonidine의 경우는 칼슘 통로에 대한 친화성이 없고 NMDA에 의해 유발된 칼슘의 유입을 차단하지 못하는 것으로 보고 되어²⁰, brimonidine의 흥분독소(excitotoxin)에 대한 망막신경절세포의 칼슘 유입 차단에 대한 작용

은 아직 논란의 여지가 있다. Brimonidine의 신경보호효과에 대한 연구는 주로 mitochondria dependent caspase pathway에 대하여 이루어졌는데 지금까지 밝혀진 기전으로는, extracellular signal-regulated kinase (ERK)를 활성화시키고, bFGF, BCL-2, BCL-X_L 등 세포생존에 필요한 인자들의 합성을 증가시키며, protein kinase/Akt pathway를 통해 BCL-2, BCL-X_L 등의 합성을 증가시켜 BAX과 BAD 등에 의한 사립체의 막투과성 증가를 억제하는 작용이 있는 것으로 보고되었다.²¹

녹내장을 유발하는 인자가 무엇이든지 최종적인 시신경의 손상은 망막신경절세포의 세포자멸사에 의해 유발되므로 신경계통의 퇴행성 질환의 연구 결과가 녹내장의 병인과 치료 연구에 다수 적용되어 왔다. 알츠하이머병도 trophic factor의 결핍, oxidative radical damage, 저산소증, excitotoxicity 등이 원인이 될 수 있다는 연구가 있어²² 녹내장과 그 병인에 있어 두 질환이 서로 유사성이 있음이 주목되어 왔다. 또한, 알츠하이머병 환자의 25%에서 녹내장성 시신경손상을 보이는 반면 연령을 고려한 대조군의 경우에는 5%에서만 녹내장성 시신경손상 소견을 보여준, 두 질환 사이의 연관성을 보여주는 연구도 있었다.^{23 24} 최근에는 쥐에서 고안압을 유도하여 망막신경절세포사를 유도한 실험에서 알츠하이머병의 병리학적인 특징인 A β peptide의 면역반응이 증가된다는 보고가 있었으며,²⁵ 쥐에서 시신경을 압박한 모델에서도 유사한 결과가 보고 되었다.²⁶ 녹내장과 알츠하이머병에 있어서 세포자멸사가 일어나는 기전은 BAX에 의한 사립체 막투과성의 증가가 원인으로 알려져 있어 BCL-2의 증가를 유발하는 brimonidine이 두 질환에 있어서 신경보호효과를 보여줄 수 있을 것으로 생각되고 있다.²²

세포질세망(endoplasmic reticulum)은 세포내에서 단백질의 합성과 접힘(folding)에 관계되는 중요한 기능을 담당하고 있으며 세포내 칼슘의 주요 저장소로 알려져 있다. 단백질의 접힘이나 방출을 억제하

는 물질, 단백질의 포도당화(glycosylation)를 억제하는 물질, 세포질 세망으로부터의 칼슘의 유입이나 방출에 작용하는 thapsigargin같은 물질을 투여하면 세포질세망에 많은 부하(stress)가 걸려서 세포사를 유발하게 되는데 이러한 개념을 ER stress라고 하며 ER stress는 세포의 세포자멸사가 유발되는 또 다른 기전으로 이해되고 있다.²⁷ 세포막에 존재하는 세포사에 관여하는 많은 수용체와 세포사 유발에 있어서 사립체(mitochondria)의 역할에 대한 연구는 많이 이루어져 왔으나 ER stress에 의한 세포사의 경로에 대해서는 아직 연구가 진행 중이다. ER stress에 의한 세포사의 경로로 caspase 7이 매개되어 caspase 12가 활성화되면서 세포사가 일어난다는 보고가 있었다.²⁸ 또한 세포내 칼슘 양이 증가하면 calpain이 활성화되고 세포질세망 표면 쪽으로의 이동이 유발되어 이것이 caspase 12를 활성화시킨다는 보고도 있다.²⁷ 14가지의 알려진 caspase 중에서 caspase 12는 caspase 1, 4, 5, 11과 매우 유사한 구조를 가지며 주로 세포질세망에 존재한다.²⁹ Caspase 12(약 60 kDa)는 주로 세포질세망의 세포질 측에 존재하며 칼슘 항상성의 변화와 세포질세망내에 unfolded protein의 축적에 의해 유발된 ER stress에 의해 활성화된다.³⁰ Caspase 12는 amyloid (A)에 의해 유도된 세포자멸사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져,³⁰ 알츠하이머병 같은 퇴행성신경질환의 병인에 관계될 가능성이 제시되었고 이는 녹내장의 병인을 연구하는데 있어서도 중요한 단서가 될 것으로 생각된다.

ER stress에 의한 세포사를 억제하는 방법으로는 ER stress에 의해 활성화되는 특정한 caspase를 억제하는 것이 보고 되었으며 ER stress를 유발하는 방법과 세포에 따라 차이가 있는 것으로 보고 되었다.³¹ 망막신경절세포에 대한 ER stress에 대한 연구는 아직 없었으며, 세포질세망을 매개로 하는 신경세포의 세포사에 미치는 아드레날린 수용체 약물에 대한 연구도 없었다. 따라서 본 연구에서는 brimonidine이 ER stress에 의해 유발된 망막신경절세포의 세포사에

미치는 영향을 알아봄으로써 아드레날린 수용체 약물의 신경보호효과에 대한 기전을 보다 분명히 함과 동시에 망막신경절세포에서 발생할 수 있는 다양한 세포사의 경로를 아드레날린 수용체 약물이 어느 정도 효과적으로 막을 수 있는지를 알아보고자 하였다.

아드레날린 수용체 약물의 신경보호 작용이 어떤 경로를 통해 이루어지는지는 신경세포의 배양을 통해 연구되었으며 쥐의 망막신경절세포를 직접 사용하거나 신경세포로 분화시킨 PC12 세포나 소뇌의 신경세포 등을 사용한 연구가 있었다.²² 녹내장 연구에 있어서는 쥐의 망막신경절세포를 직접 배양하는 것이 가장 좋을 것으로 생각되나 기술적으로 어렵고 세포의 수가 시간이 지남에 따라 급격히 감소하는 문제가 있다. 본 연구에서는 쥐의 망막신경절세포에서 얻어진 transformed rat retinal ganglion cell line(RGC-5 세포)을 사용하여 이미 trophic factor의 제거나 glutamate에 의한 excitotoxicity에 의해 세포자멸사가 유발되는 것으로 알려진³² 이 세포주에서 ER stress를 유발하여 세포의 세포자멸사가 유발되는지를 살펴보고 이러한 ER stress에 의해 유도된 세포자멸사를 brimonidine이 효과적으로 억제할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 또한, 이 RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의해 유발된 ER-stress에 의한 세포자멸사를 억제하는 brimonidine의 기전을 알아보기 위해 caspase 12와 caspase 3 assay를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. Transformed rat retinal ganglion cell line의 배양

본 실험에 사용될 망막신경절세포주는 Dr Abe F. Clark (Alcon Research Ltd, Fort Worth, TX, USA)로부터 제공받은 것으로 생후 1일된 쥐의 망막세포를 분리한 뒤 ψ 2 E1A virus를 이용하여 transformation 시킨 것이다.²⁶ Transformed retinal ganglion cell line(RGC-5 세포)을 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Salt lake city, Utah, USA)과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone, Salt lake city, Utah, USA)에 배양하였다. 세포는 betaxolol hydrochloride(Sigma, St. Louis, MO, USA) 또는 brimonidine (UK14304, 5-bromo-N-(2-imidazolyl)-6-quinoxalinamine)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 또는 PBS를 1시간 전처리하고, thapsigargin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)을 serum-free medium에서 37° C, 24시간 동안 처리하였다.

2. Thapsigargin 처리

Thapsigargin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)을 DMSO에 용해시킨다. Thapsigargin은 RGC-5 세포에서 세포사를 유발하는 적정농도를 찾기 위해 10 nM에서 10 μ M까지 10배씩 농도를 증가시키며 준비하였다. 계대배양된 세포주에 thapsigargin을 농도별로 첨가하여 세포사를 유발하는 적정농도를 LDH 분석을 통해 확인하였고, thapsigargin은 이 후 1 μ M을 사용하였다. 적정농도를 찾은 후 세포사의 기전을 확인하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였다.

3. 아드레날린 수용체 약물 처리

Brimonidine(Sigma, St. Louis, MO, USA)또는 betaxolol(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 DMSO에 용해시키고 serum-free DMEM에 희석시킨다. Thapsigargin 처리 1시간 전에 brimonidine 또는 betaxolol을 전 처리하였고, 실험군을 betaxolol 또는 brimonidine과 thapsigargin을 처리한 경우, thapsigargin만 처리한 경우, betaxolol 또는 brimonidine 만 첨가한 경우, 아무 약제도 첨가하지 않은 경우로 나누어 LDH 분석, TUNEL 염색을 시행하였고 세포사를 억제하는 약물에 대해서는 caspase 분석을 시행하였다.

4. LDH 분석

세포를 24 well plates에서 60-70% 정도 차도록 배양한 후 200 ul serum free media (DMEM with 1% penicillin/streptomycin)로 교체해 주고 각 시약을 처리하였다. 24시간 후 Cytotoxicity Detection Kit (Roshe, Basel, Switzerland)를 이용해 세포사 정도를 측정하였다. 각 well로부터 100 ul의 media를 옮겨와서 100 ul의 assay buffer와 섞은 후 상온에서 30분간 반응시킨다. 96 well assay plate로 옮긴 후 ELISA reader를 이용해 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Western blot 분석

Rat polyclonal antibodies anti-caspase 12 (Dr. Yuan-Harvard medical school, Boston, MI, USA-으로부터 공여받음)와 rabbit polyclonal Ab-1과 Ab-2(Calbiochem, La Jolla, CA, USA), anti-PARP(Roche, Basel, Switzerland), anti-caspase 3(Stressgen, San Diego, CA, USA)는 각각 caspase 12의 full length와

N-terminal, C-terminal, PARP(poly(ADP-ribose) polymerase), caspase 3를 인지하며 western blot 분석에 사용하였다. 세포를 6 well plates 또는 100mm culture dish에 60-70% 정도 차도록 키운 후 serum free media로 교체해주고 각 시약을 처리하였다. 또한 caspase 12와 caspase 3의 관계를 확인하기 위해 caspase 3 specific inhibitor 인 z-DEVD-fmk(Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 1 μ M을 thapsigargin 투여 1시간 전에 전 처리하여 caspase 3 inhibitor의 존재 유무에 따른 caspase 12, caspase 3, PARP의 발현 양상을 비교하고자 하였다. 24시간 후에 Immunoblotting을 위해서 배양한 세포를 모은 후 protease inhibitors (in mg/ml, 100 phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 leupeptin, and 2 aprotinin; all from Sigma)가 포함된 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxycholic acid, 0.1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8.0)를 넣고 얼음에서 5분간 방치하였다. Cell lysate를 25,000 x g 로 10분간 원심분리 하고 상층액을 모았다. Lysates는 BCA assay kit (Sigma)를 이용하여 농도를 정량한 후 동일량을 12% SDS polyacrylamide gels (SDS PAGE)에 loading 하여 단백질을 분획하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. Membrane은 1차 항체를 처리하여 4° C에서 8시간 이상 반응을 시킨 후 HRP가 결합된 2차 항체 (Amersham Pharmacia, Arlington Heights, IL, USA)를 상온에서 2시간 처리하였다. 반응이 일어난 단백질은 enhanced chemiluminescence protocol (ECL; Amersham Pharmacia, Arlington Heights, IL, USA)에 따라 Bio-Imaging analyzer (LAS-3000; Fuji, Tokyo, Japan)를 이용하여 검출하고 분석하였다.

6. TUNEL 염색

Dead End Colorimetric TUNEL System(Promega, Medison, WI, USA)을 이용하여 세포자멸사가 일어난 세포핵을 염색하고 세포를 6 well plates에서 coverslips위에 60-70% 정도 차도록 키운 후 고정액 (4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 20분 동안 방치하고 PBS로 옮긴다. Coverslips를 다시 0.2% triton X-100 solution in PBS에 5분간 방치하고 PBS에 5분씩 3회 세척한다. Equilibration buffer로 옮겨 5분간 상온에 방치하고, rTdT reaction mix를 첨가한다. Coverslips를 humidified chamber로 옮기고 37° C에서 60분간 반응시킨다. 2X SSC로 15분씩 3번 세척을 하고 0.3% H₂O₂를 5분간 처리한 후 다시 PBS로 세척한다. Streptavidin HRP solution(1:500)으로 30분간 반응시켜 DAB solution으로 염색하고 Hematoxylane으로 counter stain을 한다. 염색된 세포는 광학현미경 (Olympus)을 이용하여 40배와 400배의 배율로 분석하였다.

7. 통계 분석

모든 자료는 Student's t-tests를 이용하여 mean \pm SEM 으로 표시한다. 각 군간의 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 분석하였다. P value 0.05 미만을 통계적으로 유의한 차이로 인정하였다.

III. 결과

1. RGC-5 세포에서 아드레날린 수용체 약물이 ER stress에 의한 세포사에 미치는 영향

RGC-5 세포를 thapsigargin $1\mu\text{M}$ 로 처리하였을 때 대조군에 비하여 LDH 분석 상 1.7배의 세포사가 일어나는 것이 관찰되었다 ($p<0.01$). Brimonidine을 $25\mu\text{M}$ 부터 1mM 까지 농도를 증가시키며 전처치한 후 thapsigargin $1\mu\text{M}$ 을 처리하였을 때 모든 농도에서 LDH 세포사 분석 상 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다($p=1.00$). Betaxolol의 경우는 모든 농도($25\mu\text{M}$ 부터 1mM)에서 thapsigargin에 의한 세포사를 유의하게 억제하지 못하였다(data not shown)(그림 1).

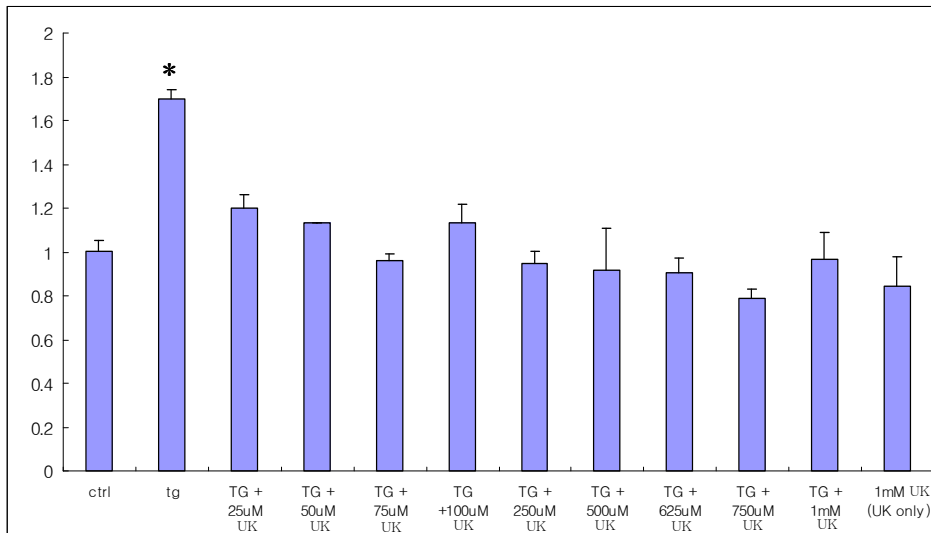


그림 1.

RGC-5 세포에서 thapsigargin 처리와 brimonidine 농도별 전처치에 따른 LDH 분석 결과 (ctrl: 대조군, TG: thapsigargin, UK: brimonidine) 배양된 RGC-5 세포에 brimonidine($25\mu\text{M}$ - 1mM)을 처리한 후 1시간 후에 thapsigargin($1\mu\text{M}$)을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 세포사 정도는 LDH

분석을 통해 측정되었다. 각 측정치는 3회 측정치(흡광도)의 평균 \pm 표준 편차로 표시되었으며 통계분석은 1-way ANOVA 후 Bonferroni post hoc 비교분석을 사용하였다. 대조군과 $p < 0.01$ 의 유의한 차이가 난 경우를 *로 표시하였고, 대조군과 유의한 차이가 없는 경우($p > 0.05$)는 표시하지 않았다.

2. 아드레날린 수용체 약물 처리 후 TUNEL 염색을 통한 RGC-5 세포의 세포자멸사 분석

RGC-5 세포에 있어서 thapsigargin에 의한 세포사가 세포자멸사에 의한 것인지를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였고 대조군에 비해 thapsigargin 처리 군에서 TUNEL(+) 세포의 숫자가 증가되었다. Brimonidine 전처리 군의 경우 thapsigargin 처리 군에 비해 TUNEL(+) 세포의 숫자가 감소되었지만 thapsigargin에 의한 세포자멸사를 완전히 억제하지는 못하였다. Betaxolol 처리 군의 경우는 thapsigargin 처리 군과 유사한 TUNEL(+) 세포의 수를 보여주었다 (그림 2).

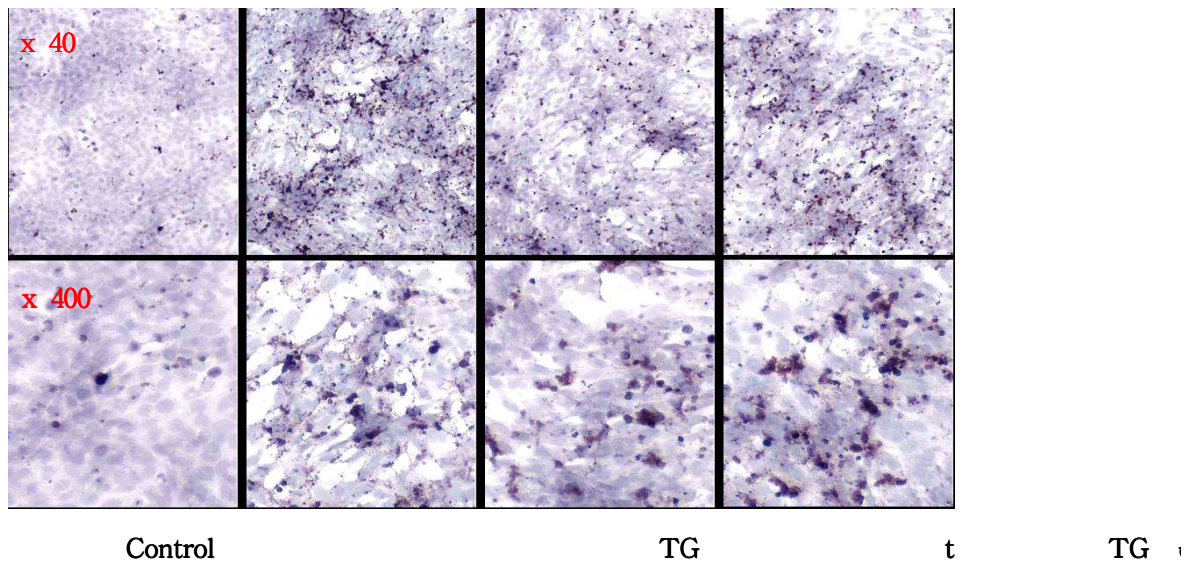


그림 2.

RGC-5 세포에서 thapsigargin($1 \mu\text{M}$)투여군과 brimonidine($100 \mu\text{M}$) 혹은 betaxolol($100 \mu\text{M}$) 전 처리 후 thapsigargin을 투여한 군의 TUNEL 염색 결과. (TG: thapsigargin, UK: brimonidine, Bet: betaxolol)

배양된 RGC-5 세포에 brimonidine($25 \mu\text{M} - 1\text{mM}$) 혹은 betaxolol($25 \mu\text{M} - 1\text{mM}$)을 처리한 후 1시간 후에 thapsigargin($1 \mu\text{M}$)을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. TUNEL 염색을 시행하고 40배(그림 상단)와 400배(그림 하단)의 배율로 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 짙은 갈색으로 염색되는 TUNEL(+) 세포를 볼 수 있다.

3. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 brimonidine의 caspase-12 억제 효과

Caspase 12 특이적 항체를 사용하여 caspase 12에 대한 western blot 분석을 시행한 결과 정상적으로 RGC-5 세포 내에 60 kDa의 full length의 caspase 12가 존재하는 것을 볼 수 있었다. 대조군에 비해서 thapsigargin 처리 군에서는 full-length의 caspase-12가 감소되어있고, brimonidine이 함께 처리된 군에서는 대조군 보다는 감소되어 있으나 thapsigargin 처리 군에 비해 full-length의 caspase-12가 회복되는 소견을 보여주었다(그림 3).

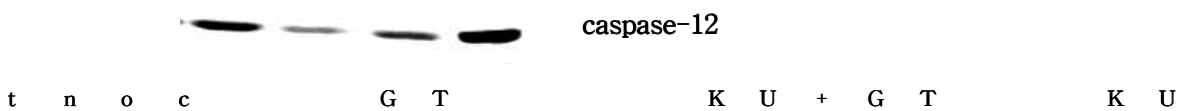


그림 3.

RGC-5 세포에서 ER stress에 의한 caspase-12의 활성화에 대한 brimonidine의 억제 효과 (TG: thapsigargin, UK: brimonidine)

배양된 RGC-5 세포에 brimonidine(100 μ M) 처리한 후 1시간 뒤에 thapsigargin(1 μ M)을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 detergent solution에서 반응시킨 후 25,000 x g로 10분간 원심분리 한 후 상층액(soluble protein 분획)을 모아 rat polyclonal antibodies anti-caspase 12를 사용하여 caspase-12에 대한 western blot 분석을 시행하였다. 대조군과 thapsigargin 단독 처리군, thapsigargin과 brimonidine 투여군, brimonidine 단독 처리군에서의 60 kDa의 full length의 caspase 12 band를 보여준다.

4. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 brimonidine이 PARP의 발현에 미치는 영향

Thapsigargin에 의한 caspase-3 활성화를 간접적으로 알아보기 위해 caspase-3의 substrate로 알려진 PARP에 대한 western blot을 시행한 결과 대조군에 비해서 thapsigargin 처리 군에서는 full length(116 kDa)의 PARP가 감소되어 있고, brimonidine이 함께 처리된 군에서는 대조군 보다는 감소되어 있으나 thapsigargin 처리 군에 비해 PARP가 회복되는 소견을 보여주었다(그림 4).

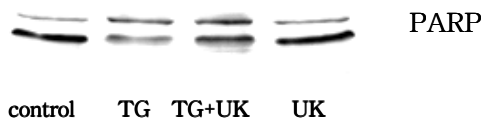


그림 4.

RGC-5 세포에서 ER stress에 의한 PARP의 분절화에 대한 brimonidine의 억제 효과 (TG: thapsigargin, UK: brimonidine)

배양된 RGC-5 세포에 brimonidine(100 μ M) 처리한 후 1시간 뒤에 thapsigargin(1 μ M)을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 detergent solution에서 반응시킨 후 25,000 x g로 10분간 원심분리 한 후 상

층액(soluble protein 분획)을 모아 anti-PARP 항체를 사용하여 PARP에 대한 western blot 분석을 시행하였다. 대조군과 thapsigargin 단독 처리군, thapsigargin과 brimonidine 투여군, brimonidine 단독 처리군에서의 116 kDa의 full length의 PARP band를 보여준다.

5. ER stress로 인한 RGC-5 세포의 세포자멸사 과정에서 Caspase-12와 caspase-3의 연관성

Caspase 12의 활성화에 caspase 3의 활성화가 미치는 영향을 알아보기 위해 RGC-5 cell에 thapsigargin과 함께 caspase-3의 특이적 억제제인 z-DEVD-fmk($1 \mu\text{M}$)를 투여하여 caspase-12와 caspase-3 그리고 PARP에 대한 western blot을 시행하였다. Caspase-3의 특이적 억제제를 처리한 경우 caspase-3의 분절화는 thapsigargin 만 처리한 경우와 같이 발생하였으나 PARP의 분절화는 thapsigargin 단독처리군에 비해 감소하는 것이 확인되었다. Caspase 12는 caspase-3의 특이적 억제제 처리 유무에 관계없이 thapsigargin에 의해 full length가 감소하는 소견을 보여주었다(그림 5).

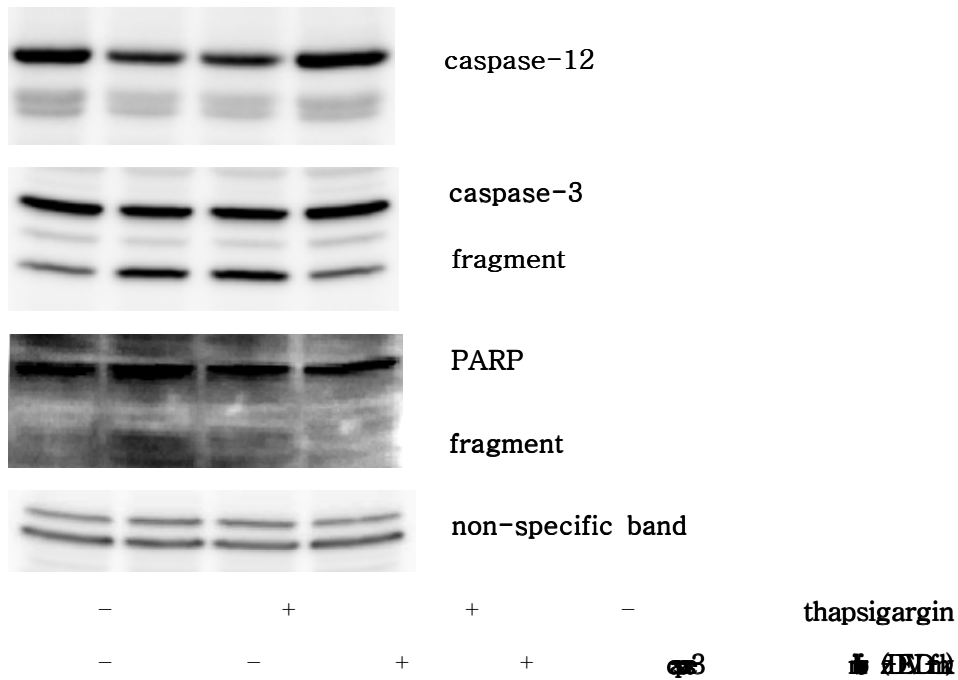


그림 5.

RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의한 caspase 12, caspase 3, PARP의 활성화에 caspase 3 특이적 억제제가 미치는 영향.

배양된 RGC-5 세포에 z-DEVD-fmk(1 μ M)를 처리한 후 1시간 뒤에 thapsigargin(1 μ M)을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 detergent solution에서 반응시킨 후 25,000 x g로 10분간 원심분리 한 후 상층액(soluble protein 분획)을 모아 anti-caspase 12, anti-PARP 그리고 anti-caspase 3 항체를 사용하여 western blot 분석을 시행하였다. 대조군, thapsigargin 단독 처리군, thapsigargin과 z-DEVD-fmk 투여군, 그리고 z-DEVD-fmk 단독 처리군으로 나누어 분석하였다. 하단의 non-specific band는 sample의 loading이 동일한 양으로 이루어 졌음을 보여준다.

IV. 고찰

세포질세망 내강(lumen)은 단백질 합성과 post-translational protein folding이 일어나는 곳이다. 합성된 단백질이 3차원적 혹은 4차원적 구조를 갖추기 위해서는 몇 가지 효소의 작용이 필수적인데, peptidyl prolyl isomerase, glycosylation enzyme, glucose regulatory protein(*grp78*, *grp94* 등) 등이 대표적인 효소들이다.³³ 단백질의 접힘이 제대로 이루어지지 않으면 세포질세망 내에 unfolded protein이 축적되어 ER stress가 유발된다. 가족력이 있는 알츠하이머병 환자의 뇌 조직에서 *grp78* level이 감소된 소견이 발견되었고,³⁴ amyloid beta protein의 toxic isoform인 A β peptide의 합성이 세포질세망에 의해 조절됨이 알려져 있어³⁵ ER stress가 알츠하이머병과 관계있을 것으로 생각되고 있다. 아직 망막신경절세포의 세포사에 ER stress가 관여하는지에 대한 증거는 없으나, 녹내장의 병인에 neurofilament protein의 이상과 A β peptide에 의한 신경세포사가 관계될 가능성이 제시되는 등,²⁶ 퇴행성신경질환으로 생각되는 녹내장에서 망막신경절세포사도 알츠하이머병과 같은 병인을 공유할 가능성이 제시되고 있다.

ER stress를 유발하는 약물들은 thapsigargin, tunicamycin, brefeldin A 등이 있으며, 그 기전은 각각 ER-associated Ca²⁺-ATPase를 억제하여 세포질세망의 칼슘 항상성을 파괴하거나, 세포질세망의 N-glycosylation을 억제하거나, ER-Golgi transport를 억제하는 것이다.^{30, 36} ER stress에 의한 망막신경절세포의 세포사에 관한 연구는 아직 없었으나, 망막신경절세포 역시 신경세포이므로 망막신경절세포에서의 ER stress에 대한 반응도 다른 신경세포를 대상으로 한 연구결과와 유사할 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서도 thapsigargin을 사용하여 망막신경절세포주에 ER stress를 유발하였을 때 thapsigargin은 RGC-5 세포에서 세포자멸사에 의한 세포사를

유발하는 것을 알 수 있었다 (그림1, 그림2).

ER stress에 의한 세포의 세포자멸사는 세포질세망 특이적인 caspase-12의 활성화를 통해 이루어진다고 알려져 있다.³⁰ 재조합된 (recombinant) caspase-12를 이용한 in vitro 연구에서는 caspase-12에 의해 caspase-9이 활성화 되고 caspase-9에 의해 caspase-3가 활성화 되는 것이 보고 되었다.³⁷ 최초로 caspase 12를 활성화시키는 자극에 관해서는 세포질 내 칼슘의 증가에 따른 calpain의 세포질세망 막 쪽으로의 이동에 의해 caspase 12가 세포질세망 표면에서 세포질 내로 이동하며 caspase-12의 분할이 일어나 활성화된다는 보고가 있어³³ caspase 12의 활성화는 세포내 칼슘의 변화에 영향을 받는 것으로 생각되고 있다. 또한, calpain과는 다른 기전으로 caspase 12가 활성화된다는 보고도 있었다. 인간의 embryonic kidney 293T cell line을 대상으로 하여 thapsigargin과 brefeldin-A을 이용하여 ER stress를 유발한 연구에서는 caspase-7이 세포질세망 표면으로 이동하며 이것이 caspase 12를 활성화시켜 세포질내로의 이동을 촉진한다고 하였다. 또한 caspase-12와 caspase-9은 서로를 활성화시키는 상호작용이 있다고 하였다.²⁸ 그러나 신경세포를 대상으로 한 연구에서는 caspase 12와 caspase 9의 관계가 독립적일 수도 있다는 보고가 있었다. 인간의 neuroblastoma SH-SY5Y 세포를 대상으로 한 연구에서 신경세포에서도 쥐 caspase-12와 유사한 60 kDa caspase 12 유사 단백질이 관찰되었다. Thapsigargin은 이 세포에서 caspase-12 유사 단백질의 분절화를 유발하였으며 caspase-9 과 caspase-3의 분절화, PARP의 분절화, DNA 분절화를 증가시켰다. PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) 를 이용하여 Bcl-2의 발현을 유도하였을 때 Bcl-2는 thapsigargin에 의한 caspase-9 과 caspase-3의 분절화는 억제하였지만 caspase-12 유사 단백질의 분절화는 억제하지 못하였다. Caspase 억제제인 z-VAD.fmk는 caspase-12 유사 단백질의 분절화는 억제하였으나, caspase-9 과 caspase-3의 분절화는 억제하지

못하였다. 인간 SH-SY5Y 세포에서 PMA에 의해 유도된 Bcl-2의 발현은 칼슘과 관계된 ER stress에 의한(thapsigargin) 세포사는 억제하였지만, 다른 자극(tunicamycin, brefeldin A)에 의해 유도된 ER-stress에 의한 세포사는 억제하지 못하였다. 세포질세망과 관련되어 세포질내 칼슘 함량이 높아지면 이 자극이 사립체의 permeability transition pore를 개방시키고 이것이 세포질내로의 cytochrome c의 방출을 유도한다고 하였다. 결론적으로 Bcl-2 overexpression은 주로 mitochondria-dependent caspase-9을 억제하며, 비특이적 caspase inhibitor인 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OCH₃)-CH₂F (z-VAD.fmk)는 주로 세포질세망 의존적인 caspase-12를 억제한다고 하였다. Caspase-12가 억제되어도 caspase-9이 활성화되는 것을 보면 이 세포에서 thapsigargin에 의한 세포자멸사에 있어서 caspase 12의 활성화와 관계없이 cytochrome c caspase-9 pathway가 활성화되는 것으로 생각되며 Bcl-2에 의해 사립체 막이 안정화되어도 caspase-12의 활성화는 독립적으로 이루어진다고 볼 수 있다고 하였다.³¹ RGC-5 세포에서도 thapsigargin에 의한 ER stress에 의해 발생하는 세포자멸사에 caspase 12와 caspase 3의 활성화가 관계되는 것을 알 수 있었다(그림 3, 그림 4, 그림 5). 이 세포에 caspase 3 특이적 억제제인 z-DEVD-fmk(1 μ M)를 처리한 경우 thapsigargin(1 μ M)에 의해 full length의 caspase 12가 감소되는 것을 막지는 못하였다. Caspase 3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk(1 μ M)는 caspase-3가 분절화되는 것을 억제하지 못하였는데 이는 사용된 caspase 3 특이적억제제가 caspase의 분절화를 막는 것이 아니라 caspase 3의 기질과의 결합부에 작용하여 활성화되는 것을 억제하기 때문으로 생각된다. PARP의 경우는 caspase-3 특이적 억제제를 처리한 경우 thapsigargin 단독 처리군에 비해 PARP의 fragment 발현이 억제됨을 보여주어 결과적으로 z-DEVD-fmk(1 μ M)는 caspase-3의 활성화를 억제한 것으로 볼 수 있다. Caspase 3의 활성화는 알려진 대로 caspase 9의 활성화에

의한 down stream으로 생각해 볼 수 있다. RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의한 caspase의 활성화는 caspase 3 억제제를 처리한 경우에도 caspase 12의 활성화를 막을 수 없었으며 이는 caspase 3와 caspase 12가 독립적으로 활성화되거나 caspase 12가 caspase 3의 up stream임을 보여주는 결과로 생각된다. 인간의 SH-SY5Y 세포를 대상으로 한 Kitamura 등의 연구결과³¹를 고려한다면 RGC-5 cell에서의 caspase 3와 caspase 12의 활성화는 서로 독립적으로 일어날 가능성이 높다고 생각된다.

알파-2 아드레날린 수용체 효현약물인 brimonidine은 망막혈관의 허혈을 유도한 모델과 시신경압박모델, 그리고 안압을 상승시킨 모델 등의 녹내장 동물실험모델에서 망막신경절세포의 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려졌다.³⁸⁻⁴³ 또한, 면역조직화학연구에서 인간과 소 그리고 돼지의 망막에서 α -2 아드레날린 수용체가 발견되었고,⁴⁴ 점안 투여한 brimonidine의 유리체강내 농도가 신경보호효과를 나타낼 수 있는 유용한 농도를 보인다는 연구결과로 인해¹⁶ brimonidine은 망막 신경절세포에서의 신경보호효과를 갖는 약물로 주목받고 있다. Brimonidine을 포함한 아드레날린 수용체 약물의 신경보호효과를 glutamate¹⁹나 NMDA²⁰를 이용하여 excitotoxicity를 유발하여 세포배양모델에서 관찰한 연구에서는 brimonidine과 betaxolol이¹⁹ 혹은 betaxolol 만이²⁰ 세포내로의 칼슘 유입을 억제하는 칼슘 통로 차단제의 역할을 하여 excitotoxin에 의한 세포사를 억제한다고 보고된 바 있다. 본 연구에서는 세포질내로의 칼슘 유입을 억제하는 것으로 알려진 betaxolol을 brimonidine과 함께 이용하였다. 본 실험에서와 같이 RGC-5 cell에서 thapsigargin을 처리하여 세포질세망의 칼슘 항상성을 저해시킨 경우에는 betaxolol은 thapsigargin에 의한 세포자멸사를 억제하지 못하였다(그림 2). 이는 betaxolol이 세포막에서의 칼슘 유입에 의한 세포독성은 막을 수 있으나 세포질세망의 세포내 칼슘 조절기능 장애에 의한 세포사는 억제하지 못함을 보여준다. 신경세포

에서 brimonidine도 betaxolol과 같이 칼슘 통로 차단 작용을 통해 신경보호 효과를 나타낼 가능성이 있으나¹⁹ betaxolol과는 달리 brimonidine은 신경보호효과를 나타내는 다른 기전들도 보고되어²¹ ER stress에 의한 망막신경절세포사를 억제하는 brimonidine의 작용 기전은 칼슘 통로 차단 작용 이외의 다른 기전에 의해 나타날 수 있을 것으로 생각된다.

녹내장을 유도한 쥐 실험모델과 정상안압녹내장 환자의 망막신경절 세포에서 caspase 3의 활성화가 관찰되었고,^{25, 45} 쥐의 망막조직배양모델에서 caspase 1, 3, 8, 9의 inhibitor가 세포의 세포자멸사를 억제하는 것이 관찰되었다.¹⁴ 녹내장 모델에서 이들 caspase가 활성화 되는 경로로 알려진 것은 p53-glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase(GAPDH)-BAX pathway^{45, 46}와 FAS 혹은 TNF α receptor-FADD-caspase 8-BAX pathway^{47, 48}인데, p53⁴⁹과 Fas⁴⁹ 혹은 TNF⁵⁰ signaling은 녹내장뿐만 아니라 알츠하이머병에서도 가능한 병인으로 생각되고 있다. BAX의 활성화는 사립체의 cytochrome c을 세포질내로 방출시키며 이는 Apaf-1(apoptotic protease activating factor 1) 및 dATP와 반응하여 caspase 9을 활성화시키고⁵¹ 이는 다시 caspase 3를 활성화시켜 신경절세포의 세포자멸사를 유발하는 것으로 생각되고 있다. BCL-2 와 BCL-X_L 는 사립체의 막투과성을 안정화시켜 BAX에 의해 유도되는 사립체에서의 세포자멸사 유발 인자들의 방출을 억제함으로써 세포자멸사를 억제하는 것으로 보고 되었다.⁵² Bcl-2는 알츠하이머병⁵³ 나 Parkinson's disease⁵⁴ 환자의 뇌에서 발현이 증가되는 것이 밝혀졌는데 이는 아마도 신경세포들이 oxidative stress와 이로 인한 세포사로부터 스스로를 보호하려는 보상작용으로 볼 수 있을 것이다. 세포막의 α -2 아드레날린 수용체가 활성화되면 phosphatidylinositol-3-kinase(PI3-kinase)를 경유하여 protein kinase B(Akt)의 인산화를 유발하고,⁵⁵ 인산화된 Akt는 BCL-2 와 BCL-X_L, 의 합성을 증가시켜 BAX, BAK, BID 등과 같

은 세포자멸사 유발인자들의 작용을 방해하여 사립체로부터 유해인자의 방출을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁵² 또한, 세포막의 α -2 아드레날린 수용체가 활성화되면 NF-kappaB⁵⁶, extracellular signal-regulated kinase(ERK),²¹ bFGF⁵⁷ 등 세포생존에 도움을 주는 인자들의 합성도 증가시키는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 brominidine은 RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의해 유도된 ER stress에 의해 유도된 세포자멸사를 억제하는 것으로 나타났다(그림 1, 그림 2). 이 세포에서 thapsigargin에 의한 caspase 12의 분절화는 brimonidine(100 μ M)에 의해 억제된다(그림 3). PARP에 대한 western blot을 시행한 결과에서는 thapsigargin(1 μ M)은 PARP level을 감소시키며 이는 PARP가 thapsigargin에 의한 caspase 3의 활성화 경로를 통해 소모되었음을 보여준다. Thapsigargin에 의한 RGC-5 세포내의 PARP 감소는 brimonidine(100 μ M)에 의해 부분적으로 억제된다(그림 4). 따라서, brimonidine이 RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의해 유발된 세포사멸을 억제하는 기전에는 caspase-12와 caspase 3의 활성화를 억제가 관계될 것이라 생각된다(그림 3, 그림 4). Caspase 3의 활성화 억제는 알려진 대로 BCL-2와 BCL-X_L의 합성 증가에 의한 사립체 막투과성 안정화를 통해 cytochrome c-caspase 9 pathway 활성화를 억제하여 나타난 결과로 생각된다.⁵⁶ Caspase 12의 활성화는 앞서 기술한대로 caspase 3의 활성화에 의해 영향을 받지 않으므로(그림 5), brimonidine에 의한 caspase 12의 활성화 억제는 사립체와 연계되어 일어나는 cytochrome c-caspase 9 pathway의 억제와는 다른 독립적인 기전으로 일어나는 것이라 생각된다.³¹ 신경세포에 있어 caspase-12에 대한 선택적인 길항제는 아직 발견되지 않았으나, 비선택적인 caspase inhibitor인 z-VAD.fmk가 caspase-12를 억제할 수 있음이 보고되었고,³⁰ 본 연구의 결과로 brimonidine도 caspase 12의 활성화를 억제할 수 있음을 알게 되었다(그림 3). caspase 12의 활성화 경로에 대하여

는 아직 연구가 더 이루어져야 할 분야로 신경세포에서 capsase 12의 활성화 기전에 대한 연구가 더 이루어 진다면 brimonidine이 이 중 어떠한 경로를 억제하는지에 대한 연구도 진행될 수 있을 것이라 생각된다.

V. 결론

생후 1일된 쥐의 망막세포를 분리한 뒤 ψ 2 E1A virus를 이용하여 transformation 시킨 transformed rat retinal ganglion cell line (RGC-5 세포)에 thapsigargin을 처리하여 ER stress를 유발하고, α -2 아드레날린수용체 효현약물인 brimonidine (UK14,304)이 RGC-5 세포에서 thapsigargin에 의해 유도된 ER stress에 대한 세포의 반응에 미치는 영향을 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RGC-5 세포에 thapsigargin을 처리하여 세포질세망의 칼슘 조절 기능을 억제한 결과 RGC-5 세포의 세포사가 유발되었다. 유발된 세포사는, TUNEL(+) 세포가 다수 관찰되고 caspase 12의 활성화와 caspase 3의 substrate인 PARP의 분절화가 관찰되는 것으로 보아 세포자멸사에 의한 것으로 생각되었다.

2. Brimonidine은 thapsigargin에 의해 유발된 RGC-5 세포의 세포자멸사를 억제하는 작용이 있다. Brimonidine은 기존에 알려진 대로 mitochondrial dependent cytochrome c - caspase 9 - caspase 3 pathway의 활성화를 억제하고, 동시에 caspase 12의 활성화를 억제하였다.

3. Thapsigargin에 의한 RGC-5 세포의 세포자멸사에 관여하는 caspase 12와 caspase 3의 상호 작용을 알아보기 위해 caspase 3 특이적 억제제를 투여한 결과 caspase 3 특이적 억제제가 PARP의 분절화는 억제하였지만 caspase 12의 분절화는 억제하지 못하였다. 이는 caspase 12의 활성화가 caspase 3의 활성화의 up stream이거나 서로 독립적으로 활성화 될 수 있음을 보여준다. 따라서 brimonidine의 caspase 12 활성화 억제는 사립체와 관계된 caspase 3 활성화의 억제

를 통해 이루어지는 것이 아니라는 사실을 확인하였다.

4. 본 연구 결과 RGC-5 세포에서 brimonidine이 caspase 12의 활성화를 억제하는 것으로 나타났으나, 추후 brimonidine의 caspase 12 활성화 억제 작용의 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Org* 1995;73:115.
2. Armaly MF, Krueger DE, Maunder L, Becker B, Hetherington J Jr, Kolker AE, et al. Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defect. *Arch Ophthalmol* 1980;98:2163-2171.
3. Harris A, Sergott RG, Spaeth GL, Katz JL, Shoemaker JA, Martin BJ. Color Doppler analysis for ocular blood velocity in normal tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1994;118:642-649.
4. Wax MB, Tezel G, Saito I, Gupta RS, Harley JB, Li Z, et al. Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1998;125:145-157.
5. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanism of optic nerve damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1994;39:23-42.
6. Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:1090-1095.

7. Caprioli J. Neurotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmologica Scand* 1997;75:364-367.
8. Schwartz M, Belkin M, Yole E, Solomon A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: Neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma* 1996;5:427-432.
9. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 1999;43(suppl 1):S151-S161.
10. Kelly MEM, Barnes S. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the retina. *Neuroscientist* 1997;3:357-360.
11. Osborne NN, Chidlow G, Nash MS, Wood JP. The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10:82-92.
12. Vorwerk CK, Lipton SA, Hyman BT. Chronic low doses of glutamate is toxic to retinal ganglion cells: toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1618-1624.
13. Sucher NJ, Lei SZ, Lipton SA. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor-mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 1991;551:297-302.
14. Oshitari T, Adachi-Usami E. The effect of caspase inhibitors and neurotrophic factors on damaged retinal ganglion cells.

Neuroreport 2003;14:289-292.

15. Osborne NN, Cazevieuille C, Carvalho AL, Larsen AK, DeSantis L. In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res* 1997;751:113-123.
16. Wheeler L, WoldeMussie E, Lai R. Role of alpha-2 agonists in neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2003;48(suppl 1):S47-S51.
17. Araie M, Azuma I, Kitazawa Y. Influence of topical betaxolol and timolol on visual field in Japanese open-angle glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47:199-207.
18. Vainio-Jylh E, Vuori ML. The favorable effect of topical betaxolol and timolol on glaucomatous visual fields: a 2-year follow-up study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237:100-104.
19. Baptiste DC, Hartwick ATE, Jollimore CAB, Baldrige WH, Chauhan BC, Tremblay F, et al. Comparison of the neuroprotective effects of adrenoceptor drugs in retinal cell culture and intact retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43: 2666-2676.
20. Melena J, Stanton D, Osborne NN. Comparative effects of antiglaucoma drugs on voltage-dependent calcium channels. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239:522-30.

21. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.
22. Tatton W, Chen, Chalmers-Redman R, Wheeler L, Nixon R, Tatton N. Hypothesis for a common basis for neuroprotection in glaucoma and Alzheimer's disease: anti-apoptosis by alpha-2-adrenergic receptor activation. *Surv Ophthalmol* 2003;48(Suppl 1):S25-S37.
23. Bayer AU, Keller ON, Ferrari F, Maag KP. Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am J Ophthalmol* 2002;133:135-137.
24. Bayer AU, Ferrari F, Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 2002;47:165-168.
25. McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 Apr;43:1077-1087.
26. Vickers JC. The cellular mechanism underlying neuronal degeneration in glaucoma: parallels with Alzheimer's disease. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997;25:105-109.
27. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional

- signaling organelle. *Cell Calcium* 2002;32:235-249.
28. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *J Biol Chem* 2001;276: 33869-33874.
 29. Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, et al. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett* 1997;403:61-69.
 30. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403(6765):98-103.
 31. Kitamura Y, Miyamura A, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Nakamura K, et al. Possible involvement of both endoplasmic reticulum-and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci* 2003 Jul;92:228-236.
 32. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ, et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:1-12.
 33. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell*

- Calcium. 2002;32:269-278.
34. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, et al. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1999;1:479-485.
 35. Bamberger ME, Landreth GE. Inflammation, apoptosis, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 2002 Jun;8:276-283.
 36. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2466-2470.
 37. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002;277:34287-34294.
 38. Ahmed FA, Hegazy K, Chaudhary P, Sharma SC. Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Res* 2001;913:133-139.
 39. Chao HM, Osborne NN. Topically applied clonidine protects the rat retina from ischaemia/reperfusion by stimulating alpha(2)-adrenoceptors and not by an action on imidazoline

- receptors. *Brain Res* 2001;904:126-136.
40. Donello JE, Padillo EU, Webster ML, Wheeler LA, Gil DW. alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:216-223.
41. Lafuente MP, Villegas-Perez MP, Sobrado-Calvo P, Garcia-Aviles A, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2074-2084.
42. Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:65-73.
43. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2849-2855.
44. Bylund DB, Chacko DM. Characterization of alpha 2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2299-2306.
45. Tatton NA, Tezel G, Insolia SA, Nandor SA, Edward PD, Wax MB. In situ detection of apoptosis in normal pressure glaucoma.

- a preliminary examination. *Surv Ophthalmol* 2001;45(Suppl 3):S268-S272.
46. Golubnitschaja-Labudova O, Liu R, Decker C, Zhu P, Haefliger IO, Flammer J. Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res* 2000;21:867-876.
47. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000;20:8693-8700.
48. Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1787-1794.
49. de la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1997;152:73-83.
50. Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22:873-883.
51. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.

52. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000;7:1166-1173.
53. Tortosa A, Lopez E, Ferrer I. Bcl-2 and Bax protein expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;95:407-412.
54. Tatton WG, Chalmers-Redman RM. Mitochondria in neurodegenerative apoptosis: an opportunity for therapy? *Ann Neurol* 1998;44(Suppl 1):S134-S141.
55. Bommakanti RK, Vinayak S, Simonds WF. Dual regulation of Akt/protein kinase B by heterotrimeric G protein subunits. *J Biol Chem* 2000;275:38870-38876.
56. Wheeler LA, Tatton NA, Elstner M, Chalmers-Redman RME, Tatton WG. Alpha-2 adrenergic receptor activation by brimonidine reduces neuronal apoptosis through Akt(porcine kinase B) dependent new synthesis of BCL-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:S411.
57. Lai RK, Chun T, Hasson D, Lee S, Mehrbod F, Wheeler L. Alpha-2 adrenoreceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis Neurosci* 2002;19:175-185.

Abstract

Neuroprotective effect of α -2 adrenoreceptor agonist in rat
retinal ganglion cell line

Jaehong Ahn

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Jae Hong)

(Purpose) Endoplasmic reticulum(ER) stress induced apoptosis contributes to the pathogenesis of various neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease. ER stress induced neurodegeneration may participate in the apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma, because glaucoma meets the criteria for a neurodegenerative disease. Brimonidine, an α -2 adrenergic receptor agonist, has the potential to protect neurons in glaucoma and other neurodegenerative diseases. The objective of this study is to ascertain whether brimonidine protects retinal ganglion cells from ER stress in vitro, and if so, to determine the mechanisms of the neuroprotective effects of the brimonidine in cultured transformed rat retinal ganglion cell lines (RGC-5 cells).

(Materials and methods) ER stress was induced by 1 μ M of thapsigargin in cultured RGC-5 cells. A series of brimonidine(25 μ M - 1000 μ M), betaxolol(25 μ M - 1000 μ M) or vehicle solutions were administered to the RGC-5 cells 1 hour before the administration of thapsigargin (1 μ M) for 24 hours. The rate and the type of RGC-5 cell death were evaluated using LDH assay and

TUNEL staining. The western blot analysis to caspase 3, caspase 12, and PARP was performed in thapsigargin treated RGC-5 cells in the presence or absence of brimonidine(100 μ M) or z-DEVD-fmk(1 μ M), a specific caspase 3 inhibitor.

(Results) The thapsigargin-induced death of RGC-5 cells was significantly inhibited by brimonidine but not by betaxolol. Thapsigargin increased the number of TUNEL(+) cells, which was inhibited by brimonidine but not by betaxolol. The western blot analysis confirmed that thapsigargin promoted cleavage of caspase 3, caspase 12 and PARP. The analysis also confirmed that brimonidine could inhibit the thapsigargin-induced activation of caspase 12 and caspase 3 in RGC-5 cells. The thapsigargin-induced cleavage of caspase 12 in RGC-5 cells occurred even if the activation of caspase 3 was blocked by z-DEVD-fmk, a specific caspase 3 inhibitor.

(Conclusion) ER stress induced by thapsigargin caused the apoptosis of RGC-5 cells, and the thapsigargin-induced apoptosis of RGC-5 cells was blocked by brimonidine. The activation of caspase 12 and caspase 3 may contribute to the thapsigargin-induced apoptosis in RGC-5 cells. The activation of caspase 12 was thought to be uninfluenced by the activation of caspase 3. Brimonidine can inhibit the activation of caspase 12 and caspase 3 in the thapsigargin-treated RGC-5 cells, which may participate in the mechanisms involved in the neuroprotective effects of brimonidine in ER stress-induced apoptosis in retinal ganglion cells.

Key Words : ER stress, apoptosis, retinal ganglion cells, caspase 3,
caspase 12