

쥐의 고안압 모델에서 신경성장인자가
망막신경절세포의 감소에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
염 호 엽

쥐의 고안압 모델에서 신경성장인자가
망막신경절세포의 감소에 미치는 영향

지도 교수 성 공 제

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

염 호 엽

염호엽의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 지도해 주시고 많은 관심을 가져주신 성공재 교수님께 감사 드리며, 많은 가르침을 주신 이준행 교수님, 이봉기 교수님께도 감사 드립니다.

오랜 기간 동안 함께 실험을 진행하느라 고생한 영동세브란스 의국원들 모두 감사하고, 연구가 진행되는 동안 격려해 주신 실로암 안과병원 김선태 목사님과 선배 선생님들께 감사 드립니다.

늘 지켜보시며 관심을 가져주시는 부모님께 감사 드리며, 언제나 곁에서 힘이 되어주는 사랑하는 아내 경진과 딸 지원에게도 고맙다는 말을 전합니다.

저자 씬

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
III. 결과	10
IV. 고찰	16
V. 결론	21
참고문헌	22
영문요약	30

그림 차례

Figure 1. Specially designed experimental bed for electroretinography of rats	8
Figure 2. IOP change after episcleral vein cautery	11
Figure 3. Evaluation of retinal ganglion cell density with DTMR labeling	12
Figure 4. Retinal ganglion cell density	13
Figure 5. GFAP staining of both eyes	14
Figure 6. Electroretinogram of one rat in 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF-treated group	15

국문요약

쥐의 고안압 모델에서 신경성장인자가 망막신경절세포의 감소에 미치는 영향

신경성장인자는 신경영양인자의 하나로 녹내장에서 망막신경절세포의 소실을 억제하는데 중요한 역할을 할 가능성이 있다. 본 연구에서는 쥐의 만성 고안압 모델을 이용하여 유리체내로 주입한 신경성장인자가 망막신경절세포의 소실을 줄일 수 있는지 알아 보고자 하였다.

16 마리 Sprague-Dawley 쥐의 우안 상공막혈관 중 세곳을 소작하여 만성 고안압 모델을 만들었다. 실험 후 6 주간 매주 양안의 안압을 측정하였다. 실험 4 주째 각군 4 마리씩 네군으로 나누어 신경성장인자 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 와 vehicle 을 유리체내로 투여하였고, 투여 직전과 실험 6 주째, 망막전위도검사를 통해 망막의 기능의 변화를 관찰하였다. 실험 6 주 후 각군 3 마리의 양안을 적출하여 dextranmethyrrhodamine (DTMR) 염색을 통해 망막신경절세포의 수를 측정하였으며, 나머지 한마리의 양안은 glial fibrillary acid protein (GFAP) 염색을 통해 망막의 구조적 변화를 관찰하였다.

대조군인 반대편 안에 비해 만성 고안압 모델 쥐의 우안은 실험 6 주째 27~73%의 안압 상승을 보였고 망막신경절세포의 수는 vehicle

투여군과 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 신경성장인자 투여군에서 각각 23%, 22%, 13%, 20%의 감소를 보였다. 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서만 통계적으로 의미있는 생존 효과 보였다 ($p < 0.05$). GFAP 는 vehicle 투여군에서 가장 강하게 염색되었으며, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서 가장 약하게 염색되었다. 망막전위도 진폭비 (b 파/a 파)는 모든 실험 안 중에서 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군 중 한 안에서만 호전되는 양상을 보였다.

결론적으로 쥐의 만성 고안압 모델에서 유리체내에 투여한 신경성장인자는 망막신경절세포에 대해 부분적 신경보호 효과를 가질 수 있으리라 기대된다.

핵심 되는 말: 녹내장, 망막신경절세포, 신경보호, 신경성장인자

쥐의 고안압 모델에서 신경성장인자가
망막신경절세포의 감소에 미치는 영향

<지도 교수 성공 제 >

연세대학교 대학원 의학과

염 호 엽

I. 서론

녹내장은 전세계적으로 실명의 주요한 원인¹으로 시신경 유두 손상과 특징적인 시야결손을 나타내는 진행성 시신경 병증이다.² 이러한 특징적인 시야결손을 동반한 시신경의 녹내장성 손상은 만성적이고 진행성인 망막신경절세포의 세포자멸사에 의해 유발되는 것으로 널리 알려져 있다.^{3,4} 안압의 상승이 녹내장의 가장 중요한 위험인자이긴 하지만 망막신경세포가 손상을 받는 정확한 기전은 아직 불분명한 상태이다. 최근의 연구들에 의하면 이러한 신경세포의 손상은 일차적으로 물리적 외상이나 허혈 등에 의해 시작되지만

이차적으로는 손상을 받은 신경세포들이 유리한 독성 물질들이 주변의 아직 손상 받지 않은 세포들에 단계적으로 손상을 주어 만성적이고 점진적으로 진행되는 것으로 설명되고 있으며⁵ 여기에는 신경영양 물질의 지지의 소실이나^{6,7} glutamate 와 같은 흥분성 독성 물질이 관여하는 것^{8,9} 으로 알려져 있다. 최근 녹내장 치료에서의 신경보호 개념은 이러한 이론적 바탕에서 시작되었다.

신경영양인자(Neurotrophin)는 다단백의 성장인자로서 신경세포의 발달과 분화를 촉진하고 신경세포 생존에 관여한다. 신경성장인자(Nerve growth factor; NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4)가 이 군에 속하며 이들은 기본적으로 신경세포에 대해 신경영양 작용을 하지만 서로 다른 신경영양인자의 발현과 분비를 촉진시키는 작용도 한다.^{10,11} 그 외에도 혈관내피세포, 섬유모세포, 망막색소상피세포 등의 다양한 세포반응을 조절하기도 한다.¹²⁻¹⁴ 이들 신경영양인자의 신호는 Trk 수용체와 p75 수용체의 두 종류 수용체에 의해 전달된다. Trk 수용체는 리간드의 부착에 의해 자가인산화 되는 tyrosine kinase 수용체로 신경성장인자는 Trk A 에, BDNF 와 NT-4 는 Trk B 에 NT-3 는 Trk C 에 부착한다.¹⁵ p75 수용체는 네 종류 모두의 신경영양인자에 부착할 수 있다.¹⁶

신경성장인자는 1950년대 처음 발견된 이래 진행성 신경퇴행성 질환의 치료에 여러 가능성을 보여 왔던 물질로 허혈이나 외상, 독성 손상 이후 신경말단의 성장과 신경섬유의 재생에 관여한다.^{17,18} 특히 알츠하이머 병에서 인지능력의 향상과 뇌혈류 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 시각계통과 관련된 영역에서도 NGF는 중요한 위치에 있는데, 신경성장인자의 수용체가 쥐의 망막색소상피와 뿔러세포, 시세포, 그리고 망막신경절세포에서 존재하며, 특히 망막신경절세포는 신경성장인자의 수용체를 가지고 있을 뿐 아니라 이를 자신의 축삭을 따라서 선행적 또는 역행적으로 이동시키는 능력이 있다고 알려져 있다.²⁰ 또한 동물을 이용한 시신경절단 모델이나 허혈 모델에서 안구 내 신경성장인자의 주입이 망막신경절세포의 소실을 감소시킨다고 한다.^{21,22}

BDNF의 안구 내 주입이 쥐의 고안압 모델에서 망막신경절세포의 소실을 줄인 것으로 보고 되어²³ 신경영양인자가 녹내장 치료에 있어서의 새로운 가능성으로 제시되고 있는 가운데 본 연구에서는 쥐의 고안압 모델에서 유리체내 신경성장인자의 투여가 망막신경절세포의 소실에 미치는 영향을 관찰하여 신경성장인자의 신경보호작용을 통한 녹내장 치료에 대한 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 쥐의 만성 고안압 모델

체중 200g 의 수컷 Sprague-Dawley 쥐 16 마리의 우안을 대상으로 실험하였다. 먼저 케타민(ketamine, 100mg/kg)과 자일라진 (xylazine, 10mg/kg)을 대퇴부에 근육 주사하여 마취한 후 우안의 결막을 박리하여 상공막정맥을 찾아 그 중 3 군대를 소작하였다. 수술 전후 안압을 Tonolab[®] (Tiolat, Helsinki, Finland)으로 측정하고 이후 1 주일마다 6 주간 안압을 측정하였다. 좌안은 정상대조군으로 하였다.

2. 유리체내 신경성장인자 투여

Recombinant human β -NGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A)를 0.1M PBS(phosphate buffered saline) (pH 7.4)에 희석시켜 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 각각 만들었다. 상공막 정맥을 소작하여 안압을 상승시킨 16 마리의 쥐를 실험 4 주째에 4 마리씩 네군으로 나누고, 이중 세군의 쥐의 우안에 위에서 준비한 각 농도의 신경성장인자용액을 1 μl 씩 투여하였다. 투여방법은 상비측 방향의 각막윤부 0.5mm 후방에 30 게이지 주사바늘을 장착한 Hamilton microsyringe (Hamilton company, Reno, NV, U.S.A)를 이용하며 주사바늘이 시신경을 향하도록 하여 수정체나, 홍채,

망막의 손상이 없도록 하였다. 각막을 통해 유리체내 삽입된 주사바늘이 관찰되면 더 이상의 진행을 중단하고 신경성장인자를 투여하였다. 마지막 군 4 마리는 vehicle 로 1 μ l의 PBS 를 유리체내 투여하여 신경성장인자 투여 용량에 따라 총 네군으로 구분하였다.

3. 망막신경절세포의 생존율 평가

신경성장인자를 투여한지 2 주째(실험 6 주째), 각 군 별로 3 마리씩에 케타민과 자일라진을 근육주사하여 마취하였다. 상이측 결막을 열고 결막하조직을 박리하여 안구 후부 직근들 사이의 시신경을 노출시켰다. Microvitreoretinal blade 를 사용하여 시신경초를 절개한 후 시신경을 부분 절단하여 절단면에 dextran tetramethylrhodamine crystal (Molecular Probe, Eugene, OR, U.S.A)을 투여하였다. 24 시간 후 안구를 적출하여 4% paraformaldehyde 에 1 시간 넣어둔 다음 안구를 절개하여 망막을 분리하였다. 분리된 망막은 시신경유두를 중심으로 4 개의 방사상절개를 하여 클로버모양으로 슬라이드 위에 펼쳤다. 시신경 유두를 중심으로 각 사분면당 1mm, 2mm, 3mm 떨어진 위치에 총 12 군데에서 염색된 망막신경절세포 수를 형광현미경(400 \times) 하에서 관찰하였다.

4. 망막전위도의 변화 측정

실험 4 주째 신경성장인자를 투여하기 24 시간 전과 실험 6 주째 안구를 적출하여 망막신경절세포의 생존율을 평가하기 24 시간 전에 각군 별로 3 마리씩 1 시간 동안 암순응 시킨 후 0.5% tropicamide 와 0.5% phenylephrine 으로 산동시켰다. 케타민과 자일라진을 근육 주사하여 마취하고 따로 고안된 실험대 위에 쥐를 반듯이 올려 놓았다. (Figure 1)

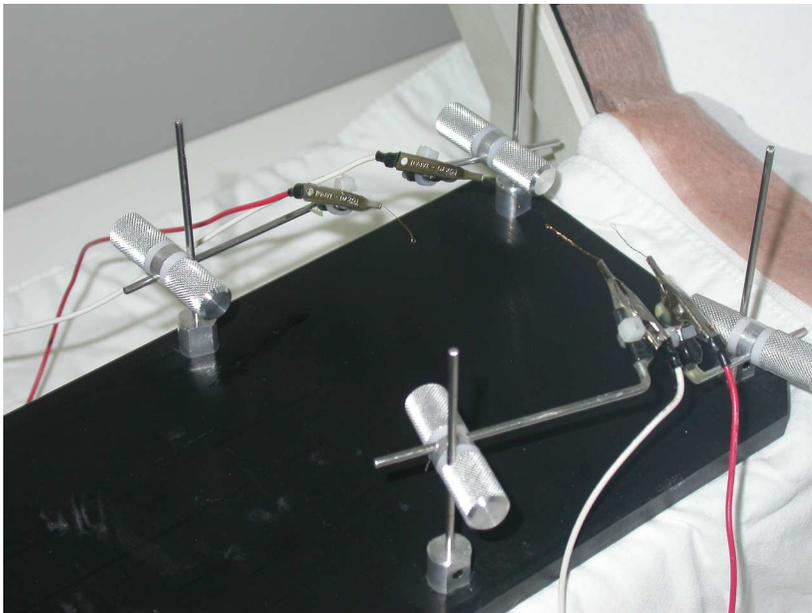


Figure 1. Specially designed experimental bed for electroretinography of rats.

Gold wire 를 각막 중심에 부착하여 활성 전극 (active electrode) 으로 하고 또다른 gold wire 를 결막낭에 삽입하여 기준 전극 (reference electrode)으로 하며 접지 전극(ground electrode)은 쥐의 꼬리에 부착하였다. 망막전위도 검사(GS-2000 system, Nicolet Biomedicals, Madison, WI, U.S.A)를 시행하여 암순응 섬광반응 (scotopic flash response)으로부터 a 파와 b 파를 구하였다. a 파는 기저점에서 가장 낮게 떨어진 저점까지로 하며 b 파는 a 파로부터 최고반응점까지로 하였다. 실험안인 우안과 대조안인 좌안의 a 파에 대한 b 파 비율 (b 파/a 파)을 비교하고 신경성장인자 투여 전과 투여 후 2 주째의 파의 변화를 관찰하였다.

5. GFAP 염색

각 군별로 남은 1 마리씩의 양안을 적출하여 GFAP 염색을 위해 4% paraformaldehyde 에 넣었다. 고정된 망막을 세척액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 씻은 다음 조직내 항체의 침투를 증진시키기 위해 30% sucrose 액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 6 시간 담근 후 액체질소에 급속 냉동시키고 실온에서 서서히 녹게 하였다. 이후 조직절편을 우무(agar)에 묻음(embedding) 한 후 vibratome (PELCO 101, Ted Pella, Redding, CA, U.S.A)을 이용하여 50 μ m 두께의 절편을 만들었다. 면역염색은 조직내 비특이

면역반응을 제거하기 위하여 정상당나귀혈청(normal donkey serum, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A)을 1 시간 동안 적용시킨 후 실시하였다. 이때 1 차 항체는 anti-mouse glial fibrillary acidic protein (Chemicon, Temecula, CA, U.S.A)를, 2 차 항체는 rhodamine conjugated goat anti-mouse Ig G (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A)를 사용하였다. 처리가 끝난 후 confocal microscope 으로 관찰하였다.

통계 분석은 SPSS 13.0 을 사용하였고 통계적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. Mann-Whitney U test 와 Kruskal-Wallis test 를 이용하여 집단간 비교하였다.

III. 결과

쥐의 실험 전 안압은 실험안이 7.8 ± 0.42 mmHg, 대조군인 반대쪽 안이 7.8 ± 0.45 mmHg 이었다. 실험안의 상공막 정맥을 소작 한 직후 안압은 39.5 ± 4.0 mmHg로 수직 상승 되었으며, 1주일 쯤 13.8 ± 2.6 mmHg로 뚜렷한 안압 상승을 보였다. 이는 6주 동안 지속되었다. 실험 6주째, 실험안의 안압은 평균 13.5 ± 1.5 mmHg로 대조군인 반대쪽 안에 비해 27~73% 상승하였다.(Figure 2)

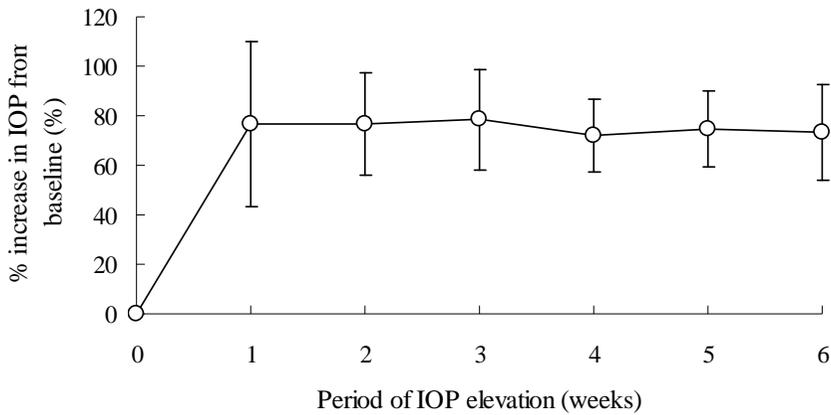


Figure 2. IOP change after episcleral vein cauterly. Amount of % increase in IOP from baseline at every weeks of IOP elevation.

신경성장인자를 투여한지 2주째 (실험6주째) 실험안에서 얻은 망막 신경절세포의 수는 vehicle 군과 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서 각각 1682 ± 324 , 1486 ± 405 , 1450 ± 375 , 1324 ± 107 cells/ mm^2 으로 반대편 대조안에 비해 23%, 22%, 13%, 20% 감소된 결과를 보였다. 이들 중 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서는 의미있는 차이를 보였다.($p < 0.05$)(Figure 3)(Figure 4)

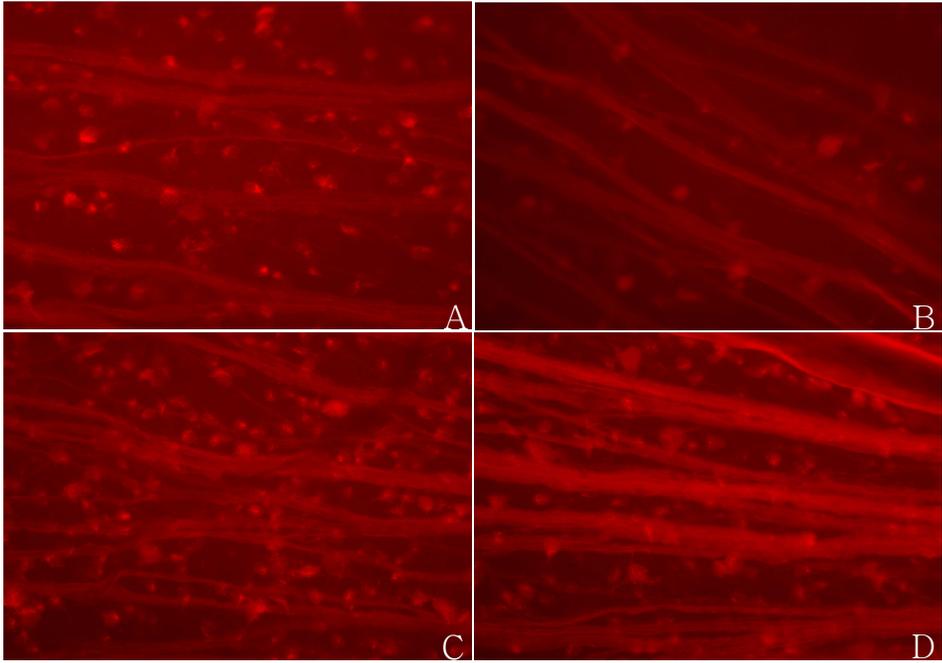


Figure 3. Evaluation of retinal ganglion cell density with DTMR labeling. **A:** control eye of vehicle group, **B:** experimental eye of vehicle group, **C:** control eye of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group, **D:** experimental eye of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group.

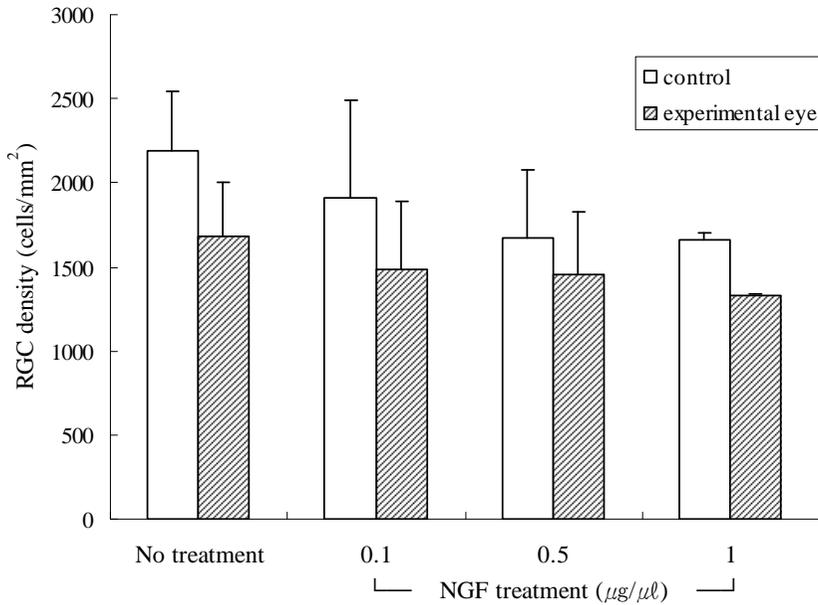


Figure 4. Retinal ganglion cell density in each group. Retinal ganglion cell counts were decreased 23%, 22%, 13%, 20% in vehicle group and 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF groups respectively. 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group showed statistically significant survival effect ($p < 0.05$).

GFAP 염색에서는 vehicle 투여군에서 망막 전층이 염색될 정도의 강한 반응을 보였으며, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서는 가장 약하게 염색되었다.(Figure 5)

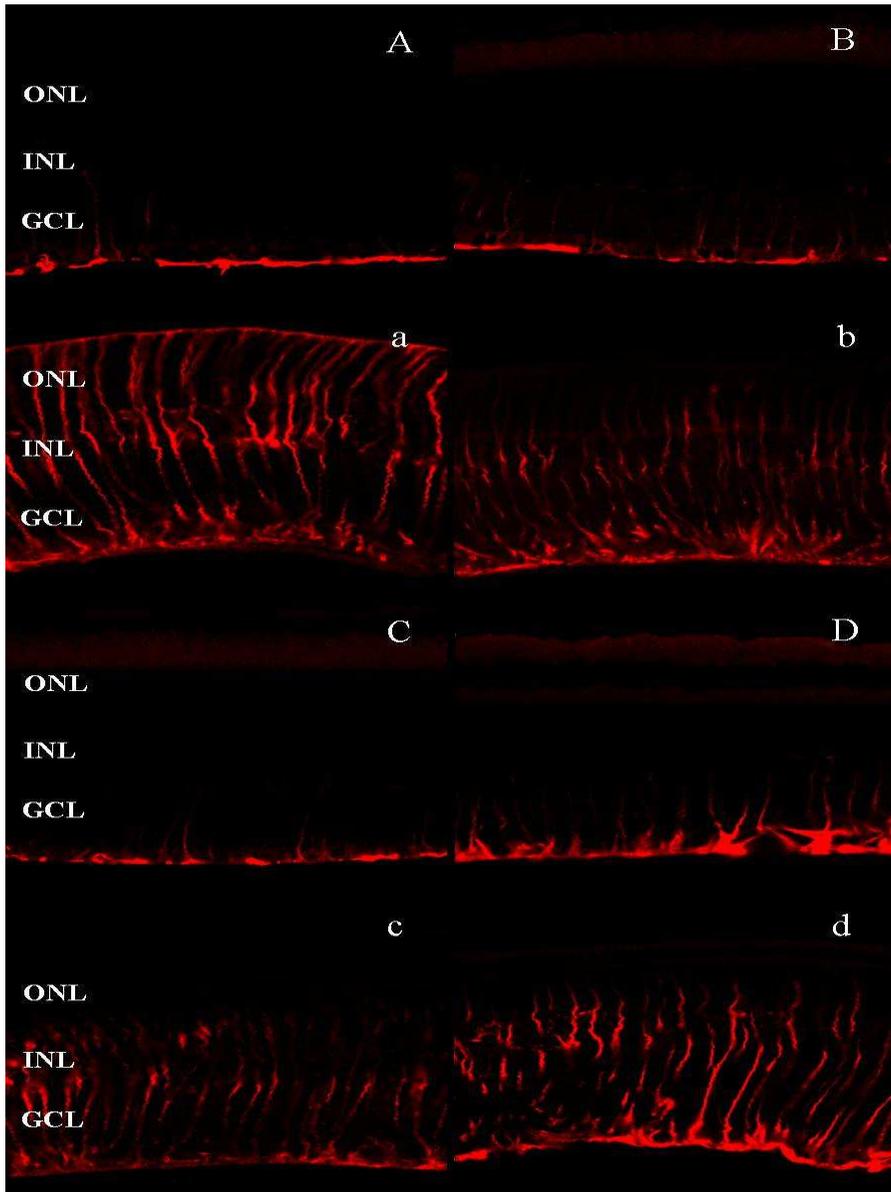


Figure 5. GFAP staining of both eyes in each group. **A, B, C, D** indicate control eyes of vehicle group and 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF groups respectively and **a, b, c, d** indicate experimental eyes of

each group. GFAP was most strongly stained in vehicle group (**a**) and least in 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NFG group (**c**). **GCL**, ganglion cell layer; **INL**, internal nuclear layer; **ONL**, outer nuclear layer.

망막전위도 검사 상 b-wave/a-wave 값은 오직 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군의 실험안 하나에서만 19.6% 향상되었고 나머지 안에서는 동일하거나 오히려 감소되는 소견을 보였다.(Figure 6)

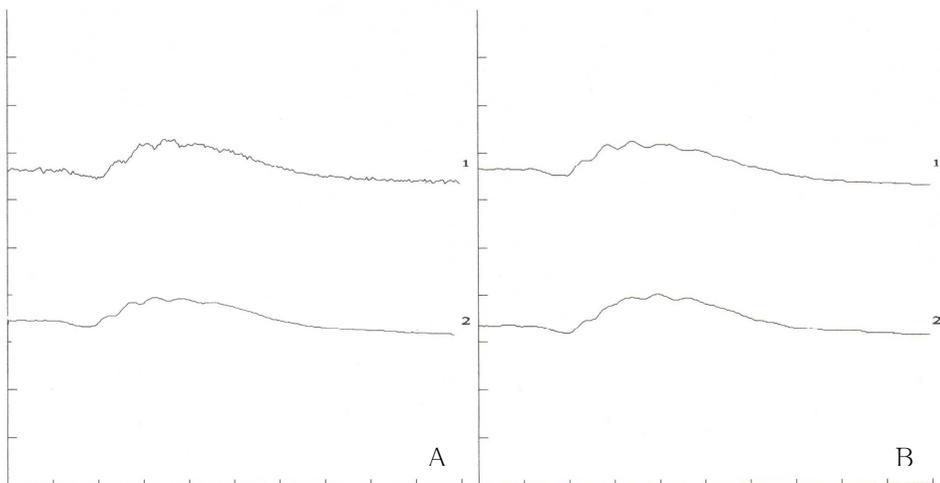


Figure 6. Electroretinogram of one rat in 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF-treated group at 4(A) and 6 week (B) of IOP elevation. Number 1 and 2 indicate control and experimental eye respectively. b-wave/a-wave of experimental eye at 6 weeks, showed 19.6% improvement

from 4 weeks. (Sensitivity and sweep time per division; 99.57 μV and 20.0 msec)

IV. 고찰

신경성장인자는 위둔덕(sueprior colliculus)에서 축삭이동을 통해 망막으로 공급되기도 하고 또 무축삭 세포(amacrine cell) 등 몇몇 주변세포로부터 주변분비(paracrine)의 방법으로 분비되는가 하면 망막신경절세포 자신이 자가분비(autocrine) 하는 방법으로 존재하기도 하는 것으로 알려져 있다.^{7, 24-26} 이렇게 분비된 신경성장인자는 망막신경절세포의 세포자멸사를 억제하는 반면 신경세포의 적응성을 증가시키고 또한 그 축삭의 재생을 돕는다고 한다.²⁷⁻²⁹ 비록 만성적인 고안압 환경에서 망막내에서의 신경성장인자 분비 과정에 관한 변화가 뚜렷이 알려져 있지는 않지만, 정상적인 과정에서 원활히 이루어 지던 위둔덕으로부터의 신경성장인자의 공급이 만성 고안압 환경에서 축삭이동의 장애가 오면서 막힐 수 있게 된다. 이 과정이 망막신경절세포의 자멸사를 촉진 시킬 가능성이 있다. 이런 이유로 외부적인 신경성장인자의 투여가 이런 자멸사 과정의 일부를 지연 또는 막아줄 수 있을 것이라고 기대한다. 최근 여러가지 방법으로 투여한 신경성장인자가 부분적인 신경보호

효과를 나타냄이 보고된 바 있고 또한 안구내 투입된 항신경성장인자가 토끼의 고안압 모델에서 망막신경절세포의 소실을 증가시킨다는 사실이 보고되어 있어, 만성 고안압 모델에서 신경성장인자의 역할은 어느 정도 인정받고 있다.³⁰⁻³¹ 하지만 이러한 고안압 모델에서 유리체내 투입한 신경성장인자의 역할이 보고된 바가 아직 없는 바, 본 연구에서는 쥐의 만성 고안압 모델에서 유리체 내로 신경성장인자를 투여했을 때 신경보호 효과를 얻을 수 있음을 증명하고자 하였다.

본 연구에서는 rebound tonometer인 Tonolab[®]을 사용하여 쥐의 안압을 측정하였다. Reoubnd tonometer는 2001년 Kontiola 등에 의해 처음 소개되었으며 솔레노이드 코일의 자기장에 의해 밀려난 핀이 각막에 부딪힌 후 되돌아 올 때, 그 감속된 정도로 인해 발생한 전위변화를 인지하여 안압으로 측정하게 된다.³² 이 rebound tonometer는 여러 실험에 의해 실제 안압과 일치된 측정값을 보임이 증명되었고, 기존에 쥐의 안압 측정에 널리 사용되던 Tonopen[®]과 비교하여 볼 때 안압 측정에 더 편리하고 더 적은 변이성(variability)을 보인다고 알려져 있다.³²⁻³⁴ 또한 반복측정에 의한 쥐의 각막 손상을 줄일 수 있는 것도 장점이라고 할 수 있겠다.

상공막정맥의 소작에 의한 안압상승은 대체로 정상안압의 1.5~2배 정도의 안압상승을 얻는 것으로 알려져 있고 본 연구에서도 이와

비슷한 결과를 보였다.^{23,35-37} 반면 안압상승이 지속되는 기간은 저자마다 달라, Ahmed 등³⁵은 안압상승 2~4주 후면 30%에서 정상안압으로 돌아온다고 보고하였고, Grozdanic 등³⁶은 8주에 걸쳐 서서히 안압이 정상으로 돌아온다고 하였다. 한편, Sawada 와 Neufeld는³⁷ 6개월간 안압상승이 유지되는 것으로 보고하였다. 이러한 안압상승의 감소는 시간이 지남에 따라 발생하는 결맥관(collateral vessel)의 발달에 기인하는 것으로 생각된다. 본 연구에서도 3주를 기점으로 약간 안압상승의 정도가 감소하는 양상을 보이긴 했지만 전체적으로 볼 때 6주간 비교적 일정한 안압상승을 유지하였다. (그림 1)

Ko 등²³은 상공막정맥의 소작 후 망막신경절세포는 주당 4%씩 감소하는 것으로 보고하였다. 6주간의 실험기간을 고려할 때 이번 연구도 이와 다르지 않은 감소율을 보였으나 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서는 대조군의 안에 비해 13% 감소하여 다른 군과는 뚜렷한 차이를 보였다. 이는 유리체 내부에 투여된 특정 농도의 신경성장인자가 망막신경절세포의 감소를 막았을 가능성을 보여준다고 할 수 있을 것이다.

망막신경절세포의 소실을 조직학적 증명을 위해 GFAP 염색 방법을 사용하였다. 일반적으로 정상 망막에서 GFAP는 신경섬유층의 별아교세포(astrocyte)에서 발현되는 반면 뮐러세포(Müller cell)에서는 뚜렷하게 발현 되지 않는다. 하지만, 망막이 스트레스를

만는 비정상적인 상황에서는 뿔러세포에서의 GFAP 발현이 유도되어 이것이 신경망막의 손상을 반영하게 된다.³⁸⁻⁴⁰ 실험 6주째에 대조군인 정상안에서는 예상대로 신경섬유층에서만 GFAP 염색이 되었다. 또, vehicle 투여군에서는 망막의 전층에서 강한 염색 반응을 보인 반면 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서는 내핵층 정도까지의 약한 염색반응을 보여 이 군의 가장 큰 생존효과를 지지하였다.

이와 같이 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군이 가장 높은 망막신경절세포의 생존율과 가장 낮은 GFAP 염색반응을 보였음에도 불구하고, 망막전위도 검사에서는 단지 한마리 쥐에서만 약간의 b과/a과 값의 호전을 보였을 뿐 뚜렷한 기능적 개선효과를 얻지는 못하였다. 더불어 나머지 쥐의 망막전위도 결과는 4주째와 6주째 사이의 뚜렷한 변화를 찾기 힘들었다. 이는 20% 대의 망막신경절세포의 손상이 주로 망막외층 기능을 반영하는 망막전위도 검사의 결과에 미쳐 반영되지 않았을 가능성과 더불어 반복된 안압측정에 의한 각막의 혼탁, 임상적으로 관찰되지 못한 신경성장인자 투여 후 유리체 내의 염증 등이 정확한 망막전위도 검사를 방해하는 요인이 되었을 가능성이 있다.

이번 연구에서는 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서만 신경보호의 효과를 보인 반면 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군이나 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자 투여군에서는 뚜렷한 보호 작용을 확인 할 수가 없었다.

신경영양인자는 망막신경절세포의 세포자멸사를 막아주는 것으로 알려져 있지만, BDNF의 경우 과도한 투여가 자신의 수용체인 TrkB를 하향조절(down regulation)함으로써 오히려 신경보호 효과를 제한할 수 있고, 또 NADPH-diaphorase의 반응성 높이거나 자유라디칼(free radical)의 유리를 유발해 망막신경절세포의 생존을 억제할 수 있다고 보고된 바 각각의 신경영양물질이 망막신경절세포를 보호하기 위한 적정 농도가 존재하리라 생각된다.⁴¹⁻⁴⁴

Ko 등²³은 BDNF의 안구내 투여 효과를 확인 하기 위해 2주 간격으로 세번의 유리체내 주입을 시행하여서 한번 투여군에서는 신경보호의 효과를 얻지 못하고 두번, 세번 투여군에서는 보호효과를 얻을 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서도 반복적인 투여를 시행하여 지속적 신경성장인자의 농도를 유지한다면 더 뚜렷한 신경보호 효과를 확인할 수 있었을 것으로 기대된다.

이번 연구는 비록 실험개체 수가 부족하고 망막전위도검사의 결과가 충분하지 못함에도 불구하고 망막신경절세포 수와 GFAP 염색을 통해 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 신경성장인자의 유리체내 투여가 부분적인 신경보호 효과를 얻을 수 있을 가능성을 보여주었다. 다만 앞으로 망막신경절세포의 기능을 보다 더 잘 반영한다고 알려진 격자무늬 망막전위도 검사를 통해 망막신경절세포의 기능적 회복을 증명하고, 신경성장인자의 투여를 통해 증가한 망막내 신경성장인자 존재를

확인하며, 신경보호 효과를 극대화 할 수 있는 농도가 어느 정도인지 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 기준으로 세분화 시켜 보아야 할 필요가 있을 것으로 보인다.

V. 결론

상공막정맥의 소작을 통해 유발한 쥐의 고안압 모델에서 유리체 내로 투여한 신경성장인자는 망막신경절세포의 소실에 있어 부분적인 신경보호 작용을 할 가능성이 있으며 이로 인해 녹내장 치료의 중요한 한 방향이 될 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Leske MC. The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am J Epidemiol* 1983;118:166-191.
2. Quigley HA, Addicks EM, Green WR. Optic nerve damage in human glaucoma. III. Quantitative correlation of nerve fiber loss and visual field defect in glaucoma, ischemic neuropathy, papilledema, and toxic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1982;100:135-146.
3. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsch J, Sharma S. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 1995;61:33-44.
4. Nickells RW. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J Glaucoma* 1996;5:345-6.
5. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K^+ and H^+ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977;8:51-57.
6. Frade JM, Bovolenta P, Rodriguez-Tebar A. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech* 1999;45:243-251.

7. Von Bartheld CS, Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol* 1998;13:437-459.
8. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957;58:193-201.
9. Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997;4:270-273.
10. Michael GJ, Averill S, Nikunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, et al. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci* 1997;17:8476-8490.
11. Kruttgen A, Moller JC, Heymach JV Jr, Shooter EM. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9614-9619.
12. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 2000;127:4531-4540.

13. Glass DJ, Nye SH, Hantzopoulos P, Macchi MJ, Squinto SP, Goldfarb M, et al. TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell* 1991;66:405-413.
14. Liu ZZ, Zhu LQ, Eide FF. Critical role of TrkB and brain-derived neurotrophic factor in the differentiation and survival of retinal pigment epithelium. *J Neurosci* 1997;17:377-380.
15. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994;25:1386-1403.
16. Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 1994;25:1373-1385.
17. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-1162.
18. Hefti F. Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J Neurobiol* 1994;25:1418-1435.
19. Seiger A, Nordberg A, von Holst H, Backman L, Ebendal T, Alafuzoff I, et al. Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav Brain Res* 1993;57:255-261.

20. Carmignoto G, Comelli MC, Candeo P, Cavicchioli L, Yan Q, Merighi A, Maffei L. Expression of NGF receptor and NGF receptor mRNA in the developing and adult rat retina. *Exp Neurol* 1991;111:302-311.
21. Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli C. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci* 1989;9:1263-1272.
22. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G. Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3232-3245.
23. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett* 2001;305:139-142.
24. Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, Hsu I, Morrison JC. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:431-432.
25. Vecino E, Garcia-Grespo D, Garcia M, Martinez-Millan L, Sharma SC, Carrascal E. Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB.

Vision Res 2002;42:151-157.

26. Yip HK, So KF. Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors. Prog Retin Eye Res 2000;19:559-575.

27. Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: structure and function. Cell Mol Life Sci 2001;58:748-759.

28. Lu B. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. Prog Brain Res 2004;146:137-150.

29. Chaum E. Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanism perspective. J Cell Biochem 2003;88:57-75.

30. Lambiase A, Tirassa P, Micera A, Aloe L, Bonini S. Pharmacokinetics of conjunctivally applied nerve growth factor in the retina and optic nerve of adult rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:3800-3806.

31. Lambiase A, Centofanti M, Micera A, Manni GL, Mattei E, De Gregorio A, et al. Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997;235:780-785.

32. Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, Danias J. The

- induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Exp Eye Res* 2001;73:781-785.
33. Goldblum D, Kontiola AI, Mittag T, Chen B, Danias J. Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:942-946.
34. Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T. Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1138-1141.
35. 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.
36. Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM. Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Exp Eye Res* 2003;77:27-33.
37. Sawada A, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of

chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 1999;69:525-531.

38. Kim IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, et al. Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Exp Brain Res* 1998;121:419-424.

39. Penn JS, Thum LA, Rhem MN, Dell SJ. Effects of oxygen rearing on the electroretinogram and GFA-protein in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1623-1630.

40. Tanihara H, Hangai M, Sawaguchi S, Abe H, Kageyama M, Nakazawa F, et al. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:752-756.

41. Cui Q, Harvey AR. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci* 1995;15:8143-8155.

42. Frank L, Ventimiglia R, Anderson K, Lindsay RM, Rudge JS. BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 1996;8:1220-1230.

43. Klocker N, Cellerino A, Bahr M. Free radical scavenging and

inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of Brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J Neurosci* 1998;18:1038-1046.

44. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC. The combined effect of brain derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2967-2971.

Abstract

Effect of nerve growth factor on retinal ganglion cell loss
in ocular hypertension model of rats

Ho Yeop Yeom

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Gong Je Seong)

Nerve growth factor (NGF) is included in neurotrophin family and it may have an important role in retinal ganglion cell loss in glaucoma patients. This study was to investigate whether intravitreally injected nerve growth factor can reduce the loss of retinal ganglion cells in ocular hypertension model of rats.

Sixteen Sprague-Dawley rats with cauterization of 3 episcleral vessels on their right eye for chronic glaucoma model, were divided into one vehicle group and three NGF groups, each receiving intravitreal injection of 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF. During 6 weeks, Intraocular pressure of both eyes was measured at baseline and every week, and NGF and vehicle were injected at 4 weeks. Before injection and at 6 weeks, retinal function was monitored by electroretinography (ERG). After 6 weeks, retinal ganglion cells were counted by labeling with dextran tetramethylrhodamine (DTMR) in three rats and glial fibrillary

acid protein (GFAP) staining was performed in a rat in each group.

Comparing with untreated fellow eyes, intraocular pressure was elevated 27~73% at 6 weeks and retinal ganglion cell counts were decreased 23%, 22%, 13%, 20% in vehicle group and 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF groups respectively. 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group showed statistically significant survival effect ($p < 0.05$). GFAP was most strongly stained in vehicle group and least in 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group. ERG amplitude (b-wave/a-wave) improvement was reported only one eye of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ NGF group among all experimental eyes.

In conclusions, intravitreally injected NGF may present neuroprotection on retinal ganglion cells in chronic hypertensive rat eyes.

Key words: glaucoma, nerve growth factor, neuroprotection, retinal ganglion cell