

산화스트레스에 의한 망막신경절
세포의 세포사에서 허혈전처치의
보호효과 및 열충격단백질과의
연관

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 혁

산화스트레스에 의한 망막신경절
세포의 세포사에서 허혈전처치의
보호효과 및 열충격단백질과의
연관

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 혁

산화스트레스에 의한 망막신경절
세포의 세포사에서 허혈전처치의
보호효과 및 열충격단백질과의
연관

지도교수 성 공 제

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 혁

이승혁의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2008년 6월

감사의 글

논문 완성을 위해 여러모로 지도해주시고 가르침을 주신 성공재 교수님께 깊이 감사를 드립니다. 논문의 연구 완성을 위한 조언을 아끼지 않으신 이종은 교수님과 허지희 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 연구방향에 대한 조언과 영감을 주신 문정일 교수님과 김찬윤 교수님께 존경과 감사를 드립니다.

전공의시절 해부학교실에서 카데바 해부로 고생하며 완성했던 석사논문의 추억이 엇그제 같은데 다시 훌륭한 교수님들께 지도받으며 박사학위 논문을 마칠 수 있었던 것은 주위 분들의 도움 없이는 가능할 수 없었다고 생각합니다.

늘 저를 지켜봐주시고 걱정해 주시는 부모님과 장인, 장모님께도 이 자리를 빌려 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 늦은 시간 귀가 하는 남편을 언제나 따뜻이 뒷바라지해준 아내와 사랑스런 정준이, 정민이에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
1. RGC-5 세포 배양 및 분화	4
2. 허혈전처치 시간에 따른 세포생존률 변화	5
3. 세포생존평가	6
4. Real time RT-PCR	7
가. cDNA 합성	7
나. Real time PCR	7
5. Western blot	9
III. 결과	10
1. RGC-5 세포의 적절한 분화를 위한 staurosporine 의 농도 및 노출시간	10
2. 허혈전처치 시간에 따른 세포생존률 변화	11
3. 허혈전처치 후 열충격단백질 mRNA 변화	12
4. 허혈전처치 후 열충격단백질 발현	13
5. 허혈전처치 후 Bcl family mRNA 변화	14
6. 허혈전처치 후 Bcl family 단백질 발현	14
IV. 고찰	16
V. 결론	18
참고문헌	18
영문요약	23

그림 차례

그림 1. 배양된 RGC-5 세포	5
그림 2. 실험순서의 모식도	6
그림 3. RGC-5 세포의 분화를 위한 staurosporine 의 적정농도와 노출시간	10
그림 4. LDH assay로 측정한 허혈전처치의 세포 보호효과	11
그림 5. Real time RT-PCR을 이용한 허혈전처치 후 열충격단백질의 mRNA 변화	12
그림 6. 허혈전처치 후 열충격단백질의 변화	13
그림 7. Real time RT-PCR을 이용한 허혈전처치 후 Bcl family의 mRNA 변화	14
그림 8. 허혈전처치 후 Bcl family 단백질의 변화 ..	15
그림 9. 허혈전처치 후 Bcl family mRNA 변화 비율	16

표 차례

표 1. Real time RT-PCR에 사용된 primer sequence	8
표 2. Western blot에 사용된 항체	9

국문요약

산화스트레스에 의한 망막신경절세포의 세포사에서 허혈전처치의 보호효과 및 열충격단백질과의 연관

녹내장은 전 세계적인 실명의 주요원인으로 시신경을 구성하는 축삭손상과 망막신경절세포의 자멸사가 특징이다. 원인으로서는 안압상승, 시신경허혈, 산화스트레스 등의 여러 가지가 작용할 것으로 생각되나 그 정확한 발생기전은 밝혀져 있지 않다. 허혈전처치는 세포생존에 밀접한 연관이 있으며 일시적 허혈 후 세포가 갖는 일종의 적응반응이며 녹내장에서의 시신경손상을 억제하는 세포보호작용이 있는지와 망막신경절세포의 실험관 모델에서 열충격단백질과의 연관성을 알아보기 위해 H₂O₂를 산화스트레스로 가한 후 LDH assay 와 Western blot, real time RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 허혈전처치의 세포보호효과는 약 8시간의 허혈전처치가 가장 컸으며 열충격단백질의 발현도 허혈전처치 직후부터 관찰되어 2시간 후까지 증가하다가 감소하였고 그 중에 Hsp27이 가장 높은 상승곡선을 보였다. 세포생존에 관계되는 Bcl-2와 Bcl-XL의 mRNA 발현도 허혈전처치 직후부터 크게 증가한 후 서서히 감소하였고 세포사에 관여하는 Bad, Bax는 거의 변화가 없었다. Western blot 상의 단백질발현은 Bcl-2가 허혈전처치 직후부터 증가하여 약 24시간까지 유지되었고 Bcl-XL는 별다른 변화가 없었으며 Bad는 감소하였다. 이의 결과를 종합해보면 망막신경절세포는 산화스트레스를 받았을 때 허혈전처치에 의해 세포보호효과를 가질 수 있으며 이는 열충격단백질 특히 Hsp27의 발현과 연관됨을 알 수 있었다. 이러한 세포보호작용은 생체 내가 아닌 망막신경절세포 단독으로도 관찰되어 향후 어떤 기전으로 허혈전처치와 Hsp27이 연관되는지에 대한 추후연구의 밑바탕이 될 수 있을 것으로 보인다.

핵심되는 말 : 녹내장, 망막신경절세포, 열충격단백질, 허혈전처치

산화스트레스에 의한 망막신경절세포의 세포사에서
허혈전처치의 보호효과 및 열충격단백질과의 연관

<지도교수 성공제>

연세대학교 대학원 의학과

이승혁

I. 서론

녹내장은 실명의 3대원인 중 하나로 현재 전 세계적으로 약 9천만 명 이상의 환자가 있는 것으로 알려지고 있다. 전 인구의 0.5-3%에서 녹내장이 발생하며 나이가 들면서 그 발생이 증가하는 것으로 알려지고 있어 노령인구가 증가하는 현 추세가 지속되면, 2020년에는 실명 원인의 2위가 될 정도로 녹내장이 증가할 것으로 예상되고 있다¹.

시신경을 이루고 있는 망막신경절세포와 이의 축삭 손상이 녹내장에서 발생하는 특징적인 변화로 알려져 있으나 그 원인은 아직 확실하지 않다. 과거에는 안압상승 만이 녹내장을 일으키는 원인으로 알려져 왔으나 근래에는 안압은 정상범위에 있으나 시신경이 손상을 받고 특징적인 시야장애를 일으키는 정상안압녹내장이 많이 나타나고 있고 안압이 정상보다 높아도 시신경 손상이 일어나지 않는 고안압 환자 등이 있어서 안압만으로는 녹내장의 발생을 설명할 수 없는 경우들이 나타나서 여러 가지 다른 기전의 신경손상이론이 제시되고 있다. 안압상승에 의한 기계적 시신경손상 이외에도 허혈성 시신경손상, 성장인자결핍, 축삭이동억제(axonal transport blockage), 산화스트레스, 산화질소(nitric oxide) 생성에 의한 산소자유기 형성, 글루타민산(glutamate)에 의한 세포외독성, tumor necrosis factor 같은 inflammatory cytokine 등이 녹내장에서 시신경손상에 관여할 것으로

로 추정되고 있다²⁻⁸. 또한 녹내장의 초기 시신경손상 원인이 무엇이든 간에 망막신경절세포의 세포자멸사(apoptosis)는 처음 손상이 일어난 곳에 국한되지 않고 그 주위의 망막신경절세포들로 퍼져 나가게 된다는 것을 알게 되었는데 이를 이차적 변성(secondary degeneration)이라 한다. 글루타민산 증가, 세포내 칼슘농도 증가, neurotrophic factor의 결핍과 산화질소와 산소자유기의 증가 등이 이러한 현상과 관련되는 것으로 알려져 있으나 그 정확한 기전은 아직도 확실히 밝혀져 있지 않다.

녹내장에서 안압 이외의 원인이 있고 또한 이차적 변성이 일어난다는 것을 알게 되었지만 아직까지도 녹내장의 주된 치료방법은 안압을 낮추는 것이었다. 따라서 안압을 낮추는 것 이외에 직접 망막신경절세포를 보호, 치료하는 여러 가지 방법이 연구되어지고 있으며 그러한 방법들 중의 하나가 세포내에서 일어나는 자연적인 손상에 대한 방어기전을 연구하여 이를 세포치료, 보호에 응용하고자 하는 시도들이다⁹⁻¹¹.

세포가 죽지 않을 정도의 일시적 허혈을 야기하면 세포가 뒤이어 오는 큰 손상시 이에 견디어내는 힘이 증가하여 세포생존이 증가하는 현상이 일어나는데 이를 허혈전처치(ischemic preconditioning)라고 한다. 이것은 여러 종류의 세포와 조직에서 일어나며, 특히 망막에서 신경절세포보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 하지만 이것의 정확한 기전은 아직 확실히 알려져 있지 않다¹²⁻²¹. 이러한 허혈전처치의 기전으로 여러 가지 설이 제시되고 있는데 그 중에 하나가 열충격단백질(heat shock protein)에 의해 허혈전처치 현상이 일어난다는 가설이다. 열충격단백질은 세균에서 사람에 이르기까지 열스트레스나 다른 종류의 대사적스트레스의 상황에서 유도되며 심한 스트레스 상황에서 세포생존을 연장시키는 것으로 알려져 있다. 특히 포유동물의 중추신경계에서 열충격단백질은 허혈에 대한 내성을 증가시키는 것으로 보고되어 있고 쥐의 망막에서 빛에 의한 손상을 막는데에도 관여한다는 여러 보고가 있어 왔다. 열충격단백질은 대략적인 분자량에 따라 Hsp60,70, 90 family 및 small Hsps 등으로 분류되며 이중 Hsp70이 포유동물세포에서 많이 연구되었고 세포내에서 단백질

의 접힘(folding)과 조립(assembly)을 매개하며 단백질의 변성을 방지하거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 알려져 있다. 작은 열충격단백질(small Hsps)은 선충류의 *Caenorhabditis elegans*의 경우 16kd 에서 원생동물인 *Schistosoma mansoni*의 40kd 까지 다양한 분자량 분포를 보이는 열충격단백질인데, 인간의 경우 27kd으로 Hsp27 이 해당한다. Hsp27 역시 Hsp70과 함께 여러 가지 세포보호작용에 관여하는데 쥐망막을 허혈전처치한 경우 Hsp27, 70, 90 중에 Hsp27 만이 발현되었고, 포유류 신경세포에서 α -synuclein에 의한 세포사를 막는데 Hsp70 보다 더 강력한 효과를 가짐이 밝혀졌다. 안질환치료로서 많이 사용되는 적외선 온열기의 안질환 환자사용 후 결막세포와 눈물성분검사에서 Hsp27과 70의 발현 또한 보고된 바 있다²²⁻²⁹.

본 연구에서는 녹내장에서 특징적으로 손상받는 세포인 망막신경절세포에서 허혈전처치 시행시 산화스트레스에 의하여 세포손상에 대한 보호효과가 발생하는지를 확인하고 이러한 보호효과 발생시 열충격단백질의 발현이 어떻게 변화하는지를 관찰하여 허혈전처치와 열충격단백질의 연관성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. RGC-5 세포 배양 및 분화

쥐의 망막신경절세포를 선택적으로 분리한 후 여기에 ψ -virus를 감염시켜 망막신경절세포의 특성은 유지하며 무한 증식하는 RGC-5 세포를 실험에 사용하였다³⁰. 세포는 6 well culture plate의 각 well에 8×10^4 개씩을 분주하고 24시간동안 10% Fetal Bovine Serum(FBS; GIBCO®, Carlsbad, CA)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; GIBCO®, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 그 후 단백질산화효소억제제의 하나인 staurosporine(Sigma, St. Louis, MO)을 투여하여 RGC-5 세포를 분화시켰다. 적절한 staurosporine의 농도와 처리시간을 정하기 위해 농도는 0, 0.5, 1, 2 μ M의 4가지 농도를 1, 2, 6, 24시간 처리하고 RGC-5 세포의 모양을 관찰하였다.

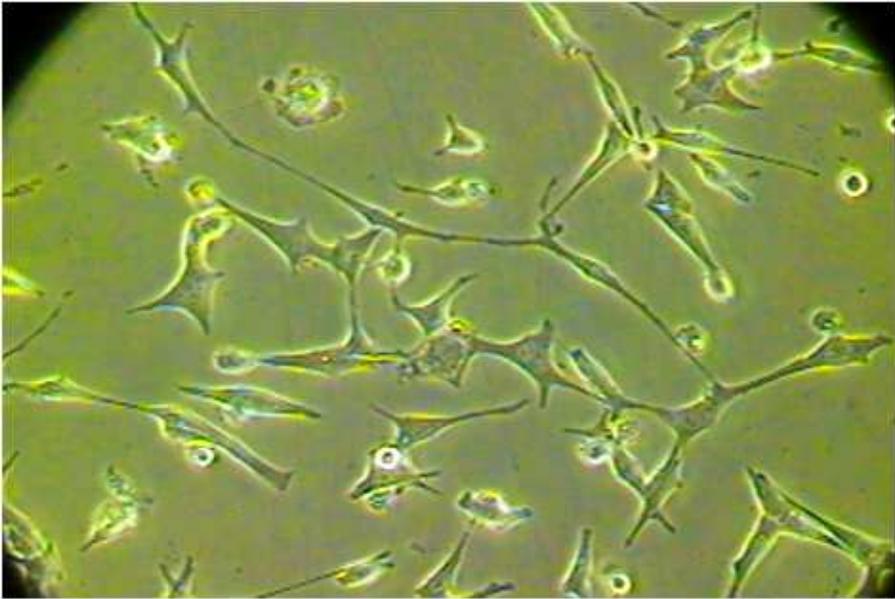


그림 1. 배양된 RGC-5 세포 : 생후 1일된 Sprague-Dawley 쥐에서 추출한 망막신경절세포에 ψ -virus를 감염시켜 망막신경절세포의 특성은 유지하며 무한증식하는 섬유아세포와 유사한 모습을 보인다.

2. 허혈전처치의 적정 농도, 시간 및 산화스트레스 유발

분화된 RGC-5 세포에서 H_2O_2 에 의해서 유발된 산화스트레스에 대해서 허혈전처치가 세포보호효과가 있는지 알아보기 위해 분화한 후 24시간 staurosporin을 제거하고 안정화시킨 RGC-5 세포에 CO_2 0.3%, H_2 10%, N_2 89%의 기체조건을 가지는 저산소배양기 (Anaerobic chamber; Forma Scientific, Seoul, Korea)에서 0, 2, 4, 6, 8, 15, 24시간 동안 허혈전처치를 시행하고 12시간 후 $800\mu M H_2O_2$ 를 15시간동안 처리하여 산화스트레스를 유발하였다.

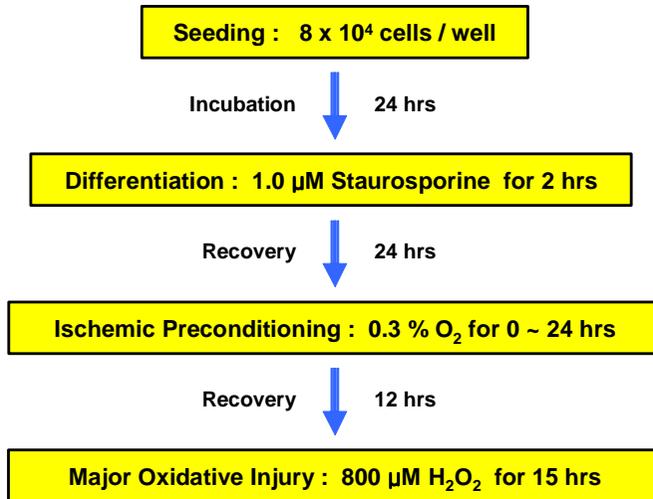


그림 2. 실험순서의 모식도: 배양 분화된 망막신경절세포의 허혈전처치의 가장 적절한 시간을 알아본 후 산화스트레스(800 μ M H₂O₂ 15시간)를 가해 망막신경절세포가 보호효과를 갖는지 알아보았다.

3. 세포생존평가

세포생존은 lactate dehydrogenase(LDH) assay를 사용하여 평가 하였다. LDH assay는 CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity assay kit(Promega, Madison, WI)를 사용하여 시행하였다. 요약하여 설명하면, substrate mix (50 μ L)를 만들어 각 검체에 투여하고 검사 plate를 빛을 차단한 채로 30분간 상온에서 배양한다. 그 후 정지용액을 더하고 490nm파장의 빛에서 흡광도를 측정하였다. 그 후 각 검체의 배경값을 빼서 최종흡광도를 구하고 이것으로 LDH농도를 계산하였다. 각 검체는 배양상층액의 LDH와 세포내의 LDH 활성도를 모두 포함시킨 전체 LDH로 다음과 같은 공식으로 세포독성을 계산하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity (Cell death) } = \frac{\text{Experimental LDH release (OD}_{490})}{\text{Total LDH release (OD}_{490})} \times 100$$

4. Real time RT-PCR

허혈전처치 후 시간에 따른 Hsp, Bcl family의 mRNA 변화를 알아 보기 위해 real time RT-PCR을 시행하였다.

가). cDNA 합성

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제작자의 권장 메뉴얼에 따라 추출한 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 간략하게 서술하면 배양한 RGC-5 세포를 trypsin을 사용하여 부양시킨 후 RNeasy Mini Kit(Quiagen, Valencia, CA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 3 μ g, 50 μ M oligo(dT)20 1 μ L, 10mM dNTP mix 1 μ L 와 DEPC-treated water를 혼합하여 모두 10 μ L의 양이 되도록 한 후 65°C에서 5분간 배양하고 1분간 얼음에 집어넣어 반응을 정지시켰다. 여기에 10X RT buffer 2 μ L, 25mM MgCl₂ 4 μ L, 0.1M DTT 2 μ L, RNaseOUT(40U/ μ L) 1 μ L, SuperScript III RT (200U/ μ L) 1 μ L를 혼합한 용액을 가하여 모두 20 μ L의 양이 되도록 한 후 잘 혼합하였다. 그 후 50°C에서 50분간 배양하고 85°C에서 5분간 배양하여 반응을 멈춘 후 튜브를 얼음에 집어넣었다. 가벼운 원심분리로 반응액을 모으고 1 μ L의 RNase H를 넣고 37°C에서 20분간 배양하여 남아있을 수 있는 RNA를 제거하였다. 그 후 만들어진 cDNA를 -20°C에서 다음 과정까지 보관하였다.

나). Real time PCR

Real time PCR은 QuantiTect SYBR Green PCR Kit(Quiagen, Valencia, CA)를 사용하여 시행하였다. 각 검체의 cDNA 100ng, 2가지 20M primers 1 μ L, master mix 25 μ L, DEPC-treated water를 총 50 μ L 혼합액을 만들고 이것을 96 well plate에 위치시키고 필름으로 반응 중 증발을 방지하였다. PCR은 Biorad사(Hercules, CA)의 cycler를 사용하였다. 사용한 primer sequence는 다음과 같다(표 1).

표 1. Real time RT-PCR 에 사용된 primer sequence.

• Hsp27	F 5'- TCA GGA GGG ATG TGT AAC CCT TGT -3' R 5'- TGG TGA TCT CCG CTG ATT GTG TGA -3'
• Hsp70	F 5'- TGG TGC TGA CCA AGA TGA AGG AGA -3' R 5'- TTG ATG ATC CGC AGC ACG TTC AGA -3'
• Hsp90	F 5'- AAG AGC CTC ACC AAT GAC TGG GAA -3' R 5'- TCC ATG ATG AAC ACA CGA CGG ACA -3'
• Bad	F 5'- GAG CGA TGA ATT TGA GGG TTC -3' R 5'- GAT CCC ACC AGG ACT GGA TAA -3'
• Bax	F 5'- AAT ATG GAG CTG CAG AGG ATG ATT G -3' R 5'- GCA CTT TAG TGC ACA GGG CCT TGA G -3'
• Bcl-2	F 5'- GTG GTG GAG GAA CTC TTC AGG GAT G-3' R 5'- GGT CTT CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC -3'
• Bcl-XL	F 5'- GTA GTG AAT GAA CTC TTT CGG GAT GG -3' R 5'- ACC AGC CAC AGA CAT GCC CGT CAG G -3'
• β -actin	F 5'- AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA -3' R 5'- ACC AGA GGC ATA CAG GGA CAA -3'

각 primer product는 melting curve analysis로 확인하였다. 증폭과 정의 온도조건은 다음과 같다.

Cycle 1: 95°C for 3 minutes

Cycle 2 (50 cycles)

Step 1 : 95°C for 10 seconds

Step 2 : 55°C for 45 seconds

Data collection and real-time analysis

Cycle 3: 95°C for 1minute

Cycle 4: 55°C for 1minute

Cycle 5 (80 cycles)

Step 1: 55°C for 10 seconds

Increases set point temperature after 2nd cycle by 0.5°C

Melt curve data collection analysis enabled.

각 mRNA level은 reference house keeping gene으로 β -actin 을 사용하여 C_t 값을 기반으로 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

5. Western blot

SDS-PAGE은 10-15% SDS-polyacrylamide gel을 만들어서 각 lane에 cell lysate 50 μ g 을 loading하였다. 전기영동 후 Immobilion-P Transfer membrane(Millipore, Bilerica, MA)에 200mA하에 2시간동안 electrotransfer 하였다. 3% BSA(Amresco, Solon, OH)를 사용하여 비특이적 결합을 억제하였다. Western blot시 사용한 일차항체는 다음과 같다.

표 2. Western blots에 사용된 항체

Target	Type	Source
Hsp27	Polyclonal	Rabbit
Hsp70	Monoclonal	Mouse
Hsp90	Monoclonal	Mouse
Bad	Polyclonal	Rabbit
Bax	Polyclonal	Rabbit
Bcl-2	Polyclonal	Rabbit
Bcl-XL	Polyclonal	Rabbit
β -actin	Monoclonal	Mouse

III. 결과

1. RGC-5 세포의 적절한 분화를 위한 staurosporine 농도 및 노출시간

단백질인산화억제제인 staurosporine의 농도와 처리시간에 변화를 주어 관찰했을 때에 축삭과 multiple synapse를 갖는 neuron 과 가장 유사한 모습을 보이는 것은 staurosporine 1.0 μ g의 농도에 2시간 노출시켰을 때 관찰되었다(그림 3).

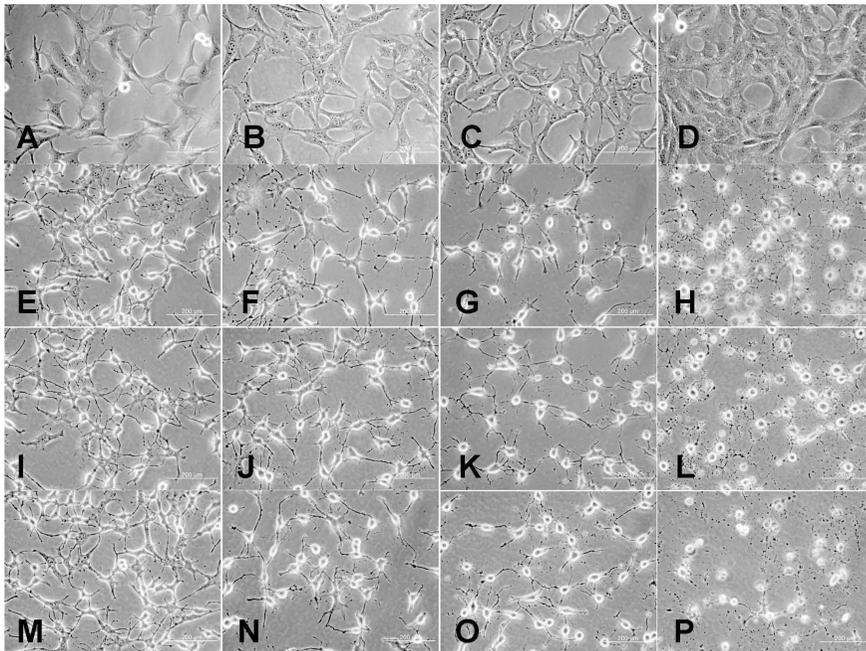


그림 3. RGC-5 세포의 분화를 위한 staurosporine의 적정농도와 노출시간 : Staurosporine 1.0 μ g의 농도에 2시간 노출되었을 때 축삭과 multiple synapse를 보이는 neuron에 가장 근접한 모양변화를 관찰할 수 있었다.

Staurosporine 0 μ g : 1hr(A), 2hrs(B), 6hrs(C), 24hrs(D)

Staurosporine 0.5 μ g : 1hr(E), 2hrs(F), 6hrs(G), 24hrs(H)

Staurosporine 1.0 μ g : 1hr(I), 2hrs(J), 6hrs(K), 24hrs(L)

Staurosporine 2.0 μ g : 1hr(M), 2hrs(N), 6hrs(O), 24hrs(P)

2. 허혈전처치 시간에 따른 세포생존률 변화

저산소배양기(0.3% O₂)를 이용하여 허혈전처치 시간을 0시간부터 24시간까지로 변화시킨 후 800 μ M H₂O₂를 이용한 산화스트레스로 RGC-5 세포에 손상을 야기하고 세포독성은 LDH assay를 사용하여 알아보았다. 허혈전처치를 시행한 경우 대조군(허혈전처치 0시간)에 비해 모두 세포독성이 감소하는 것을 확인할 수 있었고 이것으로 보아 다른 세포의 도움 없이 분화시킨 RGC-5 세포 자체에서 허혈전처치에 의한 세포보호효과가 발생함을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 허혈전처치에 의한 세포보호효과는 8시간의 허혈전처치가 가장 크게 나타남을 알 수 있었다. 허혈전처치 시간이 8시간보다 길어지면 세포 보호효과가 다시 감소함도 관찰할 수 있었다(그림 4).

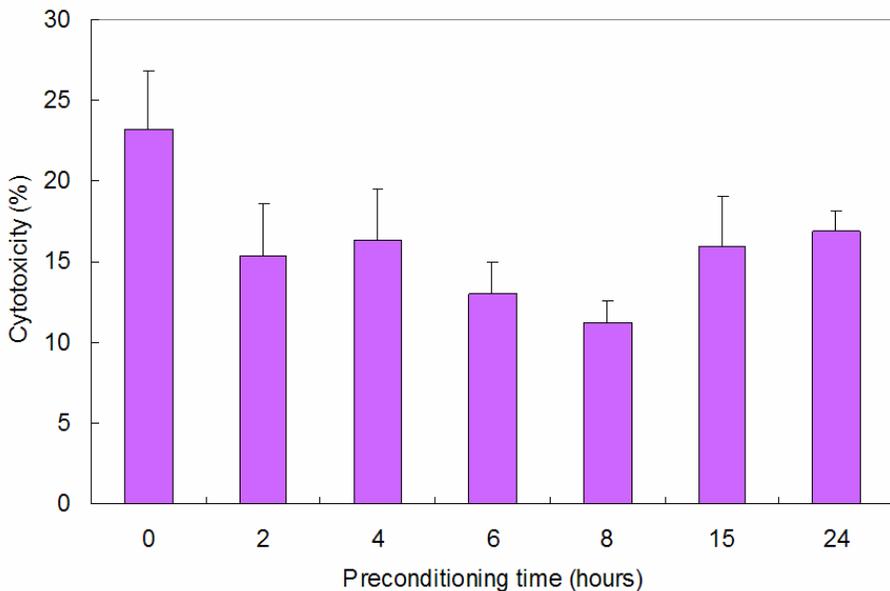


그림 4. LDH assay로 측정된 허혈전처치의 세포보호효과. 산화스트레스(800 μ M H₂O₂ for 15hrs)를 RGC-5 세포에 주었을 때 허혈전처치를 시행하지 않은 대조군에 비해 허혈전처치군(0.3% O₂)이 세포생존률이 증가하였으며 8시간의 허혈전처치가 가장 높은 세포보호효과를 보였다.

3. 허혈전처치 후 열충격단백질 mRNA 변화

허혈전처치(8시간) 후 열충격단백질 mRNA의 변화를 알아보아 허혈전처치와 열충격단백질의 관계를 살펴보고자 real time RT-PCR을 이용하여 열충격단백질 mRNA 변화를 관찰하였다. 허혈전처치 후 상승한 열충격단백질 mRNA(Hsp90, 70, 27)는 2시간째까지 상승하다가 하강하였으며 이중 Hsp27 이 가장 많은 상승을 보였으며 허혈전처치 후 24시간까지도 시행 전보다 증가한 소견을 유지하였다(그림 5).

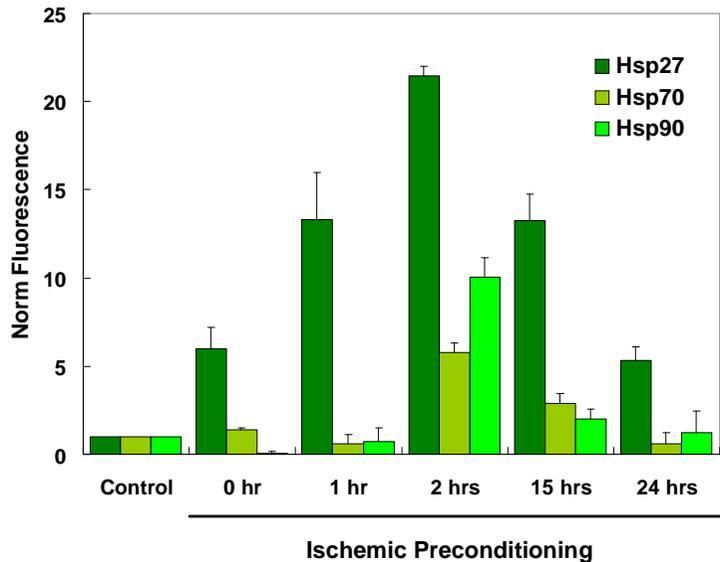


그림 5. Real time RT-PCR 을 이용한 허혈전처치 후 열충격단백질의 mRNA 변화. 산화스트레스(800 μ M H₂O₂ for 15hrs)를 RGC-5 세포에 주었을 때 허혈전처치를 시행하지 않은 대조군에 비해서 허혈전처치군(0.3% oxygen state)의 Hsp27, 70, 90 이 모두 증가하였으며 특히 Hsp27의 상승이 두드러졌다. 허혈전처치 2시간 후까지 증가하다가 감소하였다.

4. 허혈전처치 후 열충격단백질 발현

열충격단백질들의 단백질발현이 허혈전처치 후 어떻게 변화하는지 Western blot을 사용하여 관찰 하였다. 열충격단백질 family 중 Hsp 56이 미세하게 증가하였다가 감소하였고 Hsp60, 70, 90은 허혈전처치 전후로 큰 변화를 보이지 않았다. 하지만 Hsp27은 허혈전처치 후 크게 증가하였고 이러한 증가 추세가 24시간까지 상승하여 있음을 관찰 할 수 있었다 (그림 6).

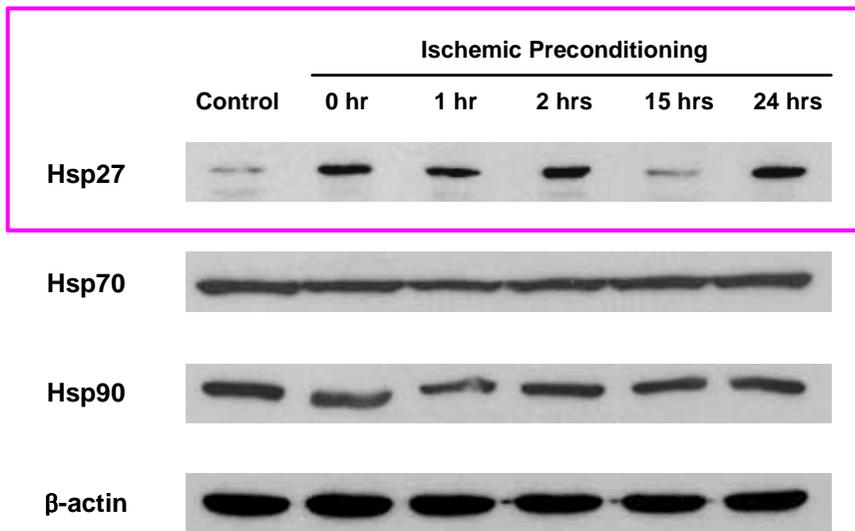


그림 6. 허혈전처치 후 열충격단백질의 변화. Western blot 상에 서는Hsp27이 허혈전처치 직후부터 상승하여 24시간까지 증가하였다. 그 외의 열충격단백질은 상승이나 감소소견을 보이지 않았다. 대조군은 허혈전처치를 시행하지 않은 RGC-5 세포이며 시간은 허혈전처치 시행 직후(0hr), 2시간 후(2hrs), 15시간 후(15hrs), 24시간 후(24hrs) 임.

5. 허혈전처치 후 Bcl family mRNA 변화

허혈전처치 후 발생한 세포사 정도와 이에 밀접한 연관이 있는 Bcl family mRNA 변화를 알아보려고 하였다. 세포사를 일으키는데 관여하는 Bad는 허혈전처치 후 다소간 증가하였지만 정도가 크지 않았고 곧 감소하였다. 그에 반하여 세포사를 막는 Bcl-2, Bcl-XL mRNA 발현은 허혈전처치 직후부터 크게 증가하였다가 서서히 감소하였다 (그림 7).

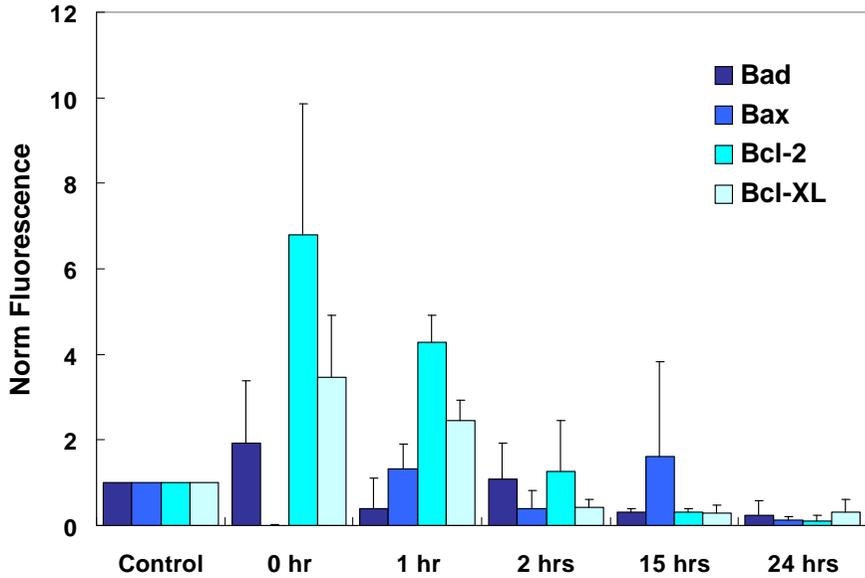


그림 7. Real time RT-PCR을 이용한 허혈전처치 후 Bcl family의 mRNA 변화. 산화스트레스(800 μ M H₂O₂ for 15hrs)를 RGC-5 세포에 가했을 때 허혈전처치를 시행한 직후부터 대조군에 비해 세포생존을 증진시키는 Bcl-2와 Bcl-XL가 증가하였다가 점점 감소하였다. Bad 와 Bax의 변화는 거의 보이지 않았다.

6. 허혈전처치 후 Bcl family 단백질 발현

허혈전처치 후 세포사 발생과 밀접한 연관이 있는 Bcl family 단백질 발현을 Western blot으로 알아보았다. 허혈전처치 후 Bax와

Bcl-XL의 단백질 발현은 큰 변화를 보이지 않았다. 그렇지만 세포사를 야기하는 Bad의 발현은 급격히 감소하였다. 또한 세포사를 억제하는 Bcl-2의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8, 9).

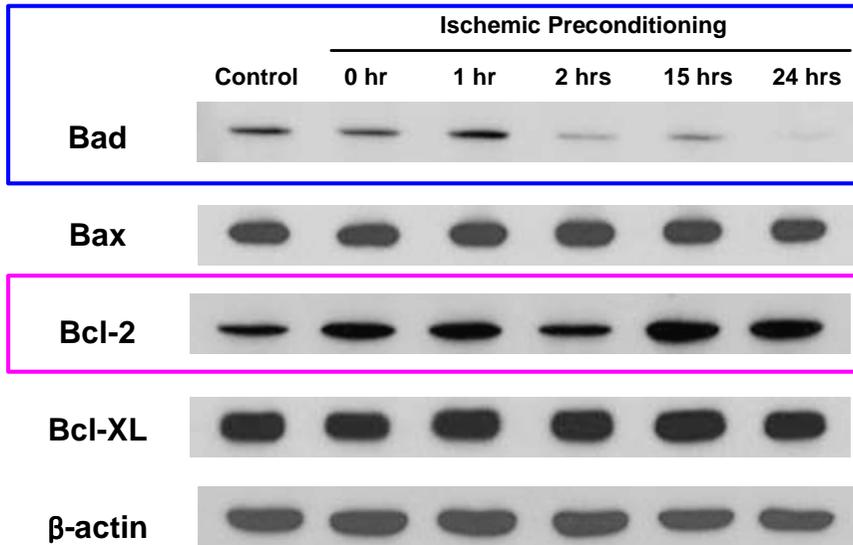


그림 8. 허혈전처치 후 Bcl family 단백질의 변화. Western blot 상에서 Bcl-2가 허혈전처치 직후부터 증가하여 24시간 후까지 지속되었고 Bcl-XL은 변화가 없었으며 Bad는 감소하는 양상을 보였다. 대조군은 허혈전처치를 시행하지 않은 RGC-5 세포이며 시간은 허혈전처치 시행직후(0hr), 2시간 후(2hrs), 15시간 후(15hrs), 24시간 후(24hrs)임.

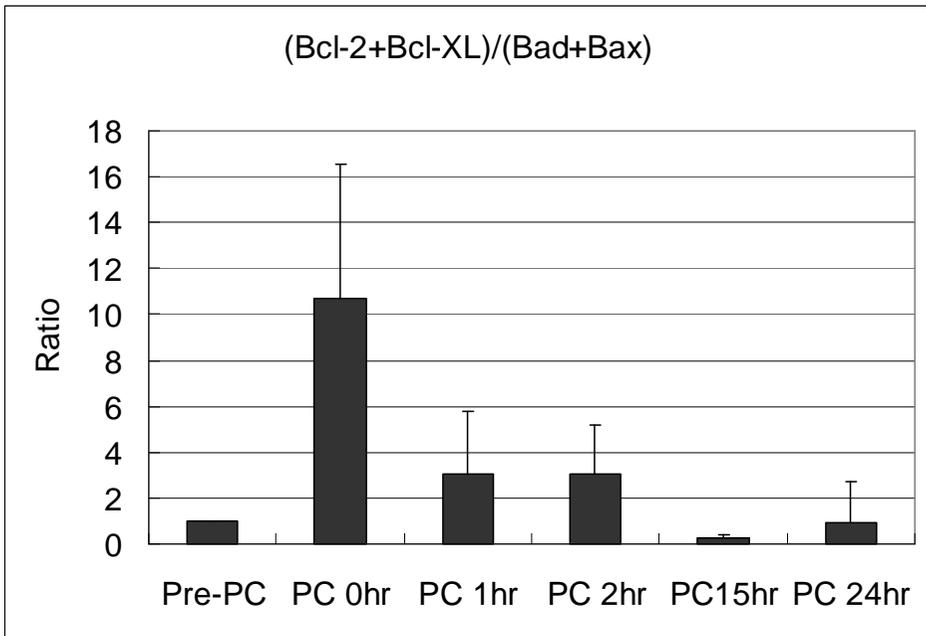


그림 9. 허혈전처치 후 Bcl family mRNA 변화비율. 허혈전처치 후 세포생존과 관계되는 Bcl-2, Bcl-XL이 세포사와 관계되는 Bad, Bax에 비해 상승된 소견을 보인다. 대조군(Pre-PC)은 허혈전처치를 시행하지 않은 RGC-5 세포이며 시간은 허혈전처치 시행 직후(0hr), 2시간 후(2hrs), 15시간 후(15hrs), 24시간 후(24hrs) 임.

IV. 고찰

본 연구에서는 허혈전처치가 망막신경절세포에서 다른 세포의 도움 없이도 일어날 수가 있는지 알아보고 이것이 열충격단백질발현과 어떠한 연관이 있는지 알아보고자 하였다. 그 결과 허혈전처치가 다른 세포 없이도 망막신경절세포가 산화스트레스에 의한 손상을 받을 때에 세포보호효과를 야기함을 확인할 수 있었다. 기존의 망막에서의 허혈전처치 효과는 이미 일부 보고되었었다³¹⁻³⁶. 하지만 이것은 다른 교세포나 또는 망막의 다른 세포들이 함께 존재하는 조건에서의 결과

이기 때문에 망막신경절세포 자체의 효과인지 다른 세포의 도움인지를 구별하기 어려운 점이 있었다. 본 실험에서는 망막신경절세포만을 가지고 시행하였기 때문에 망막신경절세포 단독만으로도 허혈전처치로 인한 세포보호효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 또한 망막신경절세포의 산화스트레스에 대한 보호효과를 관찰할 수 있는 향후 생체외실험모델을 제시했다는 데에 큰 의미가 있다. 두 번째 목적으로 본 실험에서는 이러한 허혈전처치의 세포보호효과와 열충격단백질발현과의 관계를 알아보고자 하였다. 열충격단백질은 대략적인 분자량에 따라 Hsp60, 70, 90 family 및 small Hsp 등으로 분류되며 세포내에서 단백질의 접힘(folding)과 조립(assembly)을 매개하며 단백질의 변성을 방지하거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 알려져 있다. 열충격단백질은 이러한 작용으로 여러 가지 종류의 손상을 야기할 수 있는 스트레스에 대하여 세포를 보호하는 효과를 나타내게 되는데 어떤 종류의 열충격단백질이 어떠한 기능을 가지는 지에 대해서는 아직 확실하게 알려지지 않고 있다. 쥐에서 망막을 허혈전처치한 경우에는 Hsp27, 70, 90 중에 Hsp27 만이 발현되었고, 포유류 신경세포에서 α -synuclein 에 의한 세포사를 막는 데는 Hsp70보다 더 강력한 효과를 가지는 것으로 보고되었다^{25,26}. Hsp27은 세포자멸사를 억제하는 단백질로서 허혈전처치에서 상승 발현되어 망막신경절세포의 세포자멸사를 막는 역할을 담당하는데 쥐를 대상으로 한 실험에서 caspase에 의존적으로 또는 비의존적으로 관여한다고 알려져 있다²⁷. 그에 반하여 일부 쥐 실험에서는 Hsp72의 발현유도가 망막세포 손상을 방지하였다는 보고도 있다²⁸. 본 실험결과에서는 여러 가지 열충격단백질 중에서 Hsp27의 mRNA, 단백질 발현이 허혈전처치의 보호효과와 시간적으로 밀접한 연관이 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 Hsp27의 변화는 다시 세포자멸사와 깊이 연관이 있는 Bcl family의 발현, 그 중에서도 Bcl-2의 발현과 밀접한 상관관계를 보여주었다. 이러한 결과는 Hsp27이 허혈전처치의 보호효과 기전과 밀접

한 연관이 있음을 시사하는 결과라고 생각된다. 이러한 열충격단백질과 허혈전처치 및 Bcl family의 시험관내 변화를 동시에 관찰한 연구 논문은 거의 찾아볼 수 없었고 향후 어떠한 기전으로 허혈전처치와 Hsp27이 연관되어지는가에 대해서 siRNA 등의 실험을 통해서 추후에 연구가 더 필요하리라 생각된다.

이러한 허혈전처치의 기전에 대한 연구는 향후 직접적인 녹내장에서 세포치료의 방법을 탐색하는데 큰 기여를 하리라 생각된다.

V. 결론

망막신경절세포 단독으로 다른 세포의 도움 없이도 허혈전처치에 의하여 산화스트레스에 대한 세포보호효과가 발생함을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 허혈전처치 후 열충격단백질중 Hsp27의 발현이 세포보호효과 발생의 시간과 일치하게 증가하는 현상으로 미루어 Hsp27의 발현이 허혈성 전처치의 기전과 연관이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006;90:262-267.
2. Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1994;38,S3-S6.
3. Flammer J, Orgul S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein G K, Serra LM, Renard JP, Stefánsson E. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retinal Eye Res.* 2002;21:359-393.
4. Garcia-Valenzuela, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 1995;61:33-44.

5. Quigley A, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:7747-7786.
6. Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res.* 2006;1086:191-200.
7. Charles I, Khalyfa A, Kumar DM, Krishnamoorthy RR, Roque RS, Cooper N, Agarwal N. Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1330-1338.
8. Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:749-757.
9. Kuehn MH, Fingert JH, Kwon YH. Retinal ganglion cell death in glaucoma: mechanisms and neuroprotective strategies. *Ophthalmol Clin North Am.* 2005;18:383-395, vi.
10. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1632-1636.
11. Miskevich F, Doench JG, Townsend MT, Sharp PA, Constantine-Paton M. RNA interference of *Xenopus* NMDAR NR1 in vitro and in vivo. *J Neurosci Methods.* 2006;152:65-73.
12. Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain, *Neurology.* 1997;48:306-311.

13. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock*. 1997;8:86-94.
14. Simon RP, Niuro M, Gwinn R. Prior ischemic stress protects against experimental stroke. *Neurosci Lett*. 1993;163:135-137.
15. Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke*. 1998;29:1937-1950.
16. Roth S, Dreixler JC, Shaikh AR, Lee KH, Bindokas V. Mitochondrial potassium ATP channels and retinal ischemic preconditioning. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2114-2124.
17. Ozbay D, Ozden S, Muftuoglu S, Kaymaz F, Yaylali V C, Tatlipinar S. Protective effect of ischemic preconditioning on retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Can J Ophthalmol*. 2004;39:727-732.
18. Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, Yamashiro K, Nishijima K, Miyamoto K, Nishiwaki H, Honda Y, Ogura Y. Inhibitory effect of ischemic preconditioning on leukocyte participation in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2380-2385.
19. Lin J, Roth S. Ischemic preconditioning attenuates hypoperfusion after retinal ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2925-2931.
20. Li B, Roth S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:1200-1216

21. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:777-785.
22. Tezel G, Yang J, Wax MB. Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Res Bull.* 2004;62:473-480.
23. Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin. Invest.* 1995;95:3-12
24. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 1991;66:191-197.
25. 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;46:1092-1098.
26. Whitlock NA, Lindsey K, Agarwal N, Crosson CE, Ma JX. Heat shock protein 27 delays Ca²⁺ induced cell death in a caspase-dependent and independent manner in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:1085-1091.
27. Qing G, Duan X, Jiang Y. Induction of heat shock protein 72 in RGCs of rat acute glaucoma model after heat stress or zinc administration. *Yan Ke Xue Bao.* 2004;20:30-33.
28. Park KH, Cozier F, Ong OC, Caprioli J. Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1522-1530.
29. Kim TH, Han JS, Kim JC. Heat shock protein induction by an infrared warm compression device. *J Korean Ophthalmol Soc.* 2005;46:875-882.
30. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K,

- Lambert W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF, Agarwal N. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:1-12.
31. Sahinkanat T, Ozkan KU, Tolun FI, Ciralik H, Imrek SS. The protective effect of ischemic preconditioning on rat testis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:47.
 32. Obolensky A, Berenshtein E, Konijn AM, Banin E, Chevion M. Ischemic preconditioning of the rat retina: Protective role of ferritin. *Free Radic Biol Med.* 2008 ;44:1286-1294.
 33. Kamphuis W, Dijk F, Bergen AA. Ischemic preconditioning alters the pattern of gene expression changes in response to full retinal ischemia. *Mol Vis.* 2007;13:1892-1901.
 34. Ozbay D, Ozden S, Kaymaz F, Yaylali V, Yildirim C, Tatlipinar S. Protective effect of ischemic preconditioning on retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Can J Ophthalmol.* 2004;39:727-732.
 35. Sakamoto K, Yonoki Y, Kuwagata M, Saito M, Nakahara T, Ishii K. Histological protection against ischemia-reperfusion injury by early ischemic preconditioning in rat retina. *Brain Res.* 2004;1015:154-160.
 36. Casson RJ, Wood JP, Melena J, Chidlow G, Osborne NN. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1348-1354.

Abstract

Neuroprotective effects of ischemic preconditioning against oxidative stress induced death of retinal ganglion cells and relevance to heat shock protein

Seung Hyuck Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Gong Je Seong)

Glaucoma, characterized by axonal loss of the optic nerve and apoptosis of retinal ganglion cells, is a major cause of blindness worldwide. Although various risk factors including increased intraocular pressure, optic nerve ischemia and oxidative stress have been identified, the precise etiologic nature of the disease remains elusive. Ischemic preconditioning seems to be an adaptive process for cell survival against a sustained ischemic insult following an initial brief ischemia. The aim of the present study was to determine the existence of such a protective process in retinal ganglion cells in an in vitro model of glaucoma and to find any relevance with expression of heat shock proteins (Hsp). A retinal ganglion cell line was put through oxidative stress with hydrogen peroxide and the effects were analyzed through lactic dehydrogenase (LDH) assay, western blot and real time RT-PCR. Cellular protective effects of ischemic preconditioning were shown to

be greatest after eight hours of preconditioning. Hsp expression was found to increase immediately after ischemic preconditioning and remained at maximal elevation at two hours after insult from when expression was found to decrease. Hsp27 showed the most increase. The expression of Bcl-2 and Bcl-XL mRNA, believed to influence cell survival, increased dramatically immediately after insult then slowly declined. Bad and Bax mRNA expression, thought to determine cellular apoptosis, showed negligible change. Western blot analysis for protein expression demonstrated an immediate increase of Bcl-2 which was maintained for twenty four hours, while the expression of Bcl-XL failed to show any demonstrable change and Bad decreased. In conclusion, oxidative stress to retinal ganglion cells seems to possess a protective quality through ischemic preconditioning, which seems at least in part to be associated with Hsp27 expression after exposure to such stress. Such cellular protection mechanisms seem to apply at the level of the retinal ganglion cell in vitro and this study can serve as a basis for further investigations into the association of ischemic preconditioning and increased expression of Hsp27.

Key Words : glaucoma, retinal ganglion cell,
heat shock protein, ischemic preconditioning