

r-tPA 제제에 함유된 arginine의  
망막독성에 관한 연구

연세대학교 대학원

의 학 과

정 인

r-tPA 제제에 함유된 arginine의  
망막독성에 관한 연구

지도 권 오 응 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 인

# 정 인의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 완성될 수 있도록 세심한 지도와 격려를 베풀어주신 권오웅 교수님께 진심으로 감사를 드리며, 본 논문을 많은 관심으로 지도해 주신 오상환 교수님, 유호민 교수님, 이성철 교수님, 김혜영 교수님께 충심으로 감사를 드립니다.

또한 어려운 실험에 많은 도움을 주신 (주)아이진의 이성호 박사님과 아이진의 연구진 모두에게 고마움을 전합니다.

그리고 논문이 완성되기까지 많은 이해와 뒷바라지를 해주신 부모님과 아내에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 재료 .....	5
2. 방법 .....	5
가. 조직학적 검사 .....	5
(1) H-E 염색 .....	5
(2) Transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) 염색 .....	6
나. 세포 배양 .....	6
다. 세포사멸 조사 .....	7
(1) 형태학적 관찰 .....	7
(2) Lactate dehydrogenase (LDH) 측정 .....	7
(3) Hoechst-propidium iodide (PI) 염색 .....	7
라. 세포사멸의 기전에 관한 조사 .....	7
(1) Nitric oxide (NO)의 역할 조사 .....	7
(2) cGMP에 관한 실험 .....	8
(가) cGMP의 농도 측정 .....	8
(나) CNG channel blocker에 의한 사멸 억제 .....	8
III. 결 과 .....	9
1. 조직학적 변화 .....	9
가. H-E 염색 .....	9
나. TUNEL 염색 .....	10
2. 세포배양 실험 .....	10

3. 세포사멸 조사 .....	13
가. 형태학적 관찰 .....	13
나. LDH 측정 .....	13
다. Hoechst-PI 염색 .....	16
4. 세포사멸의 기전에 관한 조사 .....	16
가. NO의 역할 조사 .....	16
나. cGMP에 관한 실험 .....	20
(1) cGMP의 농도 변화 .....	20
(2) CNG channel blocker에 의한 사멸 억제 조사 .....	20
IV. 고    찰 .....	22
V.    결    론 .....	25
참고문헌 .....	26
영문요약 .....	29

## 그림 차례

<b>Fig. 1.</b>	Photomicrographs (H-E stain) of transverse sections of mouse retina after the intravitreal r-tPA (with L-arginine) injection of 2.5 $\mu$ g/0.1 ml .....	9
<b>Fig. 2.</b>	TUNEL stained photomicrographs of retina at 12 hours after the intravitreal r-tPA (with L-arginine) injection of 2.5 $\mu$ g/0.1 ml .....	10
<b>Fig. 3.</b>	Immunostain with specific antibodies in the primary cultured retinal cells and phase contrast photomicrograph of primary cultured retinal cells .....	11
<b>Fig. 4.</b>	Phase contrast photomicrographs of retinal cells at 24 hours after the treatment with L-arginine .....	12
<b>Fig. 5.</b>	Phase contrast photomicrographs of retinal cells at 3 days after the treatment with r-tPA (with L-arginine) and L-arginine .....	12
<b>Fig. 6.</b>	Measurement of cell death in retinal cell culture .....	13
<b>Fig. 7.</b>	Time course of cell death of various concentrations of r-tPA (with L-arginine) and L-arginine .....	14
<b>Fig. 8.</b>	Survival of cultured retinal cells after the treatment with 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine .....	14
<b>Fig. 9.</b>	Fluorescence (Hoechst-PI stain) and phase contrast photomicrographs of primary cultured retinal cells at 24 hours after the treatment with tPA (without L-arginine), r-tPA (with L-arginine), and L-arginine .....	15

<b>Fig. 10.</b>	Fluorescence (Hoechst-PI stain) photomicrographs of cultured retinal cells at 24 hours after the treatment with L-arginine 5.0 mM .....	16
<b>Fig. 11.</b>	Measurement of nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) by Griess reaction .....	17
<b>Fig. 12.</b>	Localization of nNOS in the primary cultured retinal cells .....	17
<b>Fig. 13.</b>	Measurement of cell viability (by LDH assay) of cultured retinal cells pretreated with various concentrations of NMMA (NOS inhibitor) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine .....	18
<b>Fig. 14.</b>	Phase contrast photomicrographs of cultured retinal cells pretreated with NMMA (NOS inhibitor) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine) .....	18
<b>Fig. 15.</b>	The effects of r-tPA (with L-arginine) and L-arginine on cGMP formation (by ELISA assay) in cultured retinal cells .....	19
<b>Fig. 16.</b>	Measurement of cell death (by LDH assay) in primary cultured retinal cells at 24 hours after adding various concentrations of cGMP .....	19
<b>Fig. 17.</b>	Measurement of cell viability (by LDH assay) of cultured retinal cells pretreated with various concentrations of amiloride (CNG channel blocker) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine .....	20
<b>Fig. 18.</b>	Phase contrast photomicrographs of cultured retinal cells pretreated with amiloride (CNG channel blocker) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine) .....	21

## 표 차 례

<b>Table 1.</b> 상품화된 r-tPA의 구성성분 .....	3
--	---

## 국문요약

### r-tPA 제제에 함유된 arginine의 망막독성에 관한 연구

Tissue plasminogen activator (tPA)는 섬유소(fibrin) 존재하에 plasminogen을 plasmin으로 전환 활성화시키는 혈전용해제제로 관상동맥 폐쇄증의 치료에 처음 사용되었고, 안과에서는 전방, 초자체 및 망막에 섬유소 막(fibrin membrane)이 형성되어 있을 경우에 사용되고 있다. 망막분야에서는 초자체 출혈, 초자체절제술 후 섬유소 형성, 황반하 출혈, 상맥락막 출혈, 망막혈관폐쇄 질환 및 안내염 등에서의 tPA 사용이 시도되고 있다. 하지만 tPA 제제의 안구 내 심각한 합병증으로 망막의 독성이 보고되고 있어 그 안전성에 대한 연구가 필요한 상태이다.

시판중인 recombinant tPA (r-tPA) 안에 포함된 L-arginine의 농도는 3.5 g L-arginine/100 mg Alteplase로 매우 높은 농도로 존재한다. L-arginine은 nitric oxide synthase (NOS) 효소활성을 통해 nitric oxide (NO)로 전환된다. 안구 내 망막에서 NOS 효소는 3가지 isoform 모두 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 r-tPA (L-arginine 포함), tPA, L-arginine 각각에 대한 일차 배양된 망막세포에서의 독성을 조사하였다. 그 결과 r-tPA (L-arginine 포함)의 경우는 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 농도에서 세포사멸이 관찰되었고, L-arginine의 경우 5.0 mM 농도에서 세포사멸이 크게 증가하였다. tPA만을 처리한 경우에는 전혀 독성이 나타나지 않았다. 또한 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine으로 유도된 세포사멸은 24시간 후에 관찰 결과 40~60% 정도 발생하였고 이후부터는 더 이상 세포사멸이 활발히 진행되지 않았다. 광학 현미경 관찰 결과 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine으로 유도되어 사멸된 세포는 주로 시세포(photoreceptor)들이었으며 세포사멸 형태는 necrosis와 함께 apoptosis 과정을 함께 거치는 것으로 보여졌다. 시세포에서의 L-arginine의 독성 기전을 알아보기 위해서 nitrite (NO<sub>2</sub>) 및 cGMP의 농도를 측정된 결과 대조군에 비해서 L-arginine을 처리한 경우 2배 정도 높은 수치를 보였다. 이렇게 증가된 NO 및 cGMP와 세포사멸과의 관련성을 보기 위해 NOS inhibitor인 NMMA와 cGMP-gated ion channel (CNG channel) blocker인 amiloride 등을 처리한 결과 두 경우 모두 L-arginine에 의한 세포사멸을 억제시켰다.

결론적으로 r-tPA에 포함된 L-arginine은 망막독성을 일으키는 주원인 물질이었고 이는 주로 시세포에서 NO 생성을 증가시켜 cGMP를 축적시켰으며 이것이 CNG channel을 계속적으로 개방시켜 시세포의 사멸을 유발한다는 사실을 밝혔다.

---

핵심되는 말: tPA, L-arginine, 시세포, NO, NOS, cGMP, CNG channel

## r-tPA 제제에 함유된 arginine의 망막독성에 관한 연구

<지도 권 오 웅 교수>

연세대학교 대학원 의학과

정 인

### I. 서 론

Tissue plasminogen activator (tPA)는 일차적으로 내피 세포에서 형성되어진다. 섬유소 (fibrin)가 존재하는 상태에서 tPA는 plasminogen을 빠르게 plasmin으로 바꾸며 이 plasmin은 섬유소를 분해시킨다. 혈중에서 tPA는 반감기가 5~8분 정도이다.<sup>1</sup> 오늘날 tPA는 recombinant DNA technology로 상품화되어 사용되고 있으며 임상적으로 관상동맥 폐쇄증의 치료에 처음 사용되었다. 안과에서는 전방, 초자체 및 망막에 섬유소 막이 형성되어 있을 경우에 사용되고 있으며 망막분야에서는 초자체 출혈, 초자체절제술 후 섬유소 형성, 황반하출혈, 상맥락막 출혈, 망막혈관폐쇄 질환 및 안내염 등에 tPA 사용이 시도되고 있다. 섬유소 막이 생성된 경우 3주 이내에 tPA를 안구 내에 주입하면, 섬유소의 제거가 가능하고 망막 관찰이 용이하며, 동공폐쇄를 예방할 수 있으며, 이론적으로 재발성 망막박리를 막을 수 있으나<sup>10,11</sup> 합병증으로 안구 내 출혈과 망막의 독성이 나타난다.<sup>12,13</sup> 안구내 출혈은 발생 기전과 치료방침이 잘 알려져 있으나 망막독성에 관한 원인과 그 기전에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다. 지금까지 망막독성에 관한 연구는 실험 동물에서 일정 양의 r-tPA를 주입 후 망막의 전기 생리학적 검사나 병리 검사로 안전한 r-tPA의 용량을 결정하는 정도였다.<sup>14</sup> 최근에 상업적으로 판매되고 있는 r-tPA (L-arginine 포함)의 용액을 고양이 눈에 주입 시 약물 투여량에 의존하는 독성을 나타냈다는 보고가 있었다.<sup>15</sup> 또한 이런 망막의 독성은 부형제로 사용되는 L-arginine에 의한 것으로 추정하고 있다. 이처럼 안과 질환에서 사용되는 r-tPA의 사용량에 따른 독성은 보고되었으나 그 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 지금까지 L-arginine에 의한 망막의 독성은 arginine이 lysine과 구조가 비슷하여 망막에 독성을 일으킬 것으로 추정하고 있는 정도이다.<sup>14,16</sup> 안약제제에 대한 arginine 독성에 관해서는 1993년 Loewenstein 등<sup>17</sup>에 의하면 토끼실험에서 항생안약제제의 부형제로 사용된 5 mg의 arginine만으로 독성이 나타남을 관찰함으로써 arginine의 독성을 언급하고 있다. 하지만

**Table 1.** 상품화된 r-tPA의 구성성분

Quantitative composition of the lyophilized product		
	100 mg vial	50 mg vial
Alteplase	100 mg (58 million IU)	50 mg (29 million IU)
<b>L-arginine</b>	3.5 g	1.7 g
Phosphoric Acid	1 g	0.5 g
Polysorbate 80	≤11 mg	≤4 mg

r-tPA와 마찬가지로 정확한 독성 기전에 대한 설명을 하지 못하고 있다. 고양이 눈에서 r-tPA의 독성실험을 한 결과에 의하면<sup>15</sup> 상업적으로 판매되고 있는 r-tPA (L-arginine 포함)는 50 $\mu$ g/0.1 ml 이상으로 투여 시 독성을 보이는 것으로 나타났다. 이 농도에 포함된 L-arginine의 농도는 1.75 mg/0.1 ml에 해당된다. 고양이 눈의 망막은 혈관을 함유하며 초자체의 부피가 사람의 눈과 유사하다. 따라서 이런 결과는 사람의 눈에 적용 시 비슷한 결과가 나오리라 예상할 수 있다. Human r-tPA 제제(Boehringer Ingelheim, Germany)의 구성성분 중 부형제로 1.7 g과 3.5 g의 L-arginine이 각각 포함된 것을 알 수 있다(Table 1).

초자체 내에 약물을 주입하면 신경원과 시세포가 존재하는 망막층에 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 이것은 통상 tPA의 사용 목적인 혈관에 투여하는 심혈관 질환과는 다르게 눈이라는 독립된 공간으로 투여함으로써 일정 농도의 약물에 지속적으로 노출되어 더 이상 새로운 세포를 분열시킬 수 없는 신경원에 영향을 미칠 수 있으므로 tPA의 효소활성 뿐 아니라 첨가된 부형제의 안정성이 매우 중요하다고 생각되어진다.

부형제로 쓰이는 L-arginine은 tPA의 짧은 반감기를 연장시키는 stabilizer 뿐 아니라 fibrinogen을 안정화시키는 작용을 한다. 시판되는 모든 r-tPA의 경우 이 L-arginine이 포함된 제제만이 판매 허용되어 있다. 현재까지 아미노산인 arginine 자체는 무독성인 것으로 알려져 있다. 하지만 L-arginine은 nitric oxide synthase (NOS)의 기질로 작용하여 NOS 활성을 갖는 세포에 들어간다면 nitric oxide (NO) 생성에 관여할 것으로 보인다. NO에 대한 상반되는 의견이 있지만 부정적인 면에서 보면 조직에서 NO는 tyrosine을 nitrotyrosine으로 변화시키고,<sup>18,19</sup> cGMP의 농도를 비정상적으로 상승시킨다.<sup>20</sup> 이런 생화학적 변화는 세포 내 여러 기능의 장애를 유발하여 기능적 손상을 유발할 수도 있다.

안구 내에 존재하는 NOS는 inducible NOS, endothelial NOS, neuronal NOS 등으로 알려졌다.<sup>21</sup> 특히 inducible NOS (iNOS)는 heme, interleukin 등에 의해 더욱 많은 NO를 생성하는 것으로 연구되었다.<sup>22,23</sup> 특히 heme에 의한 iNOS의 활성화는 tPA의 사용목적이 혈전의 용해라는 점에서 주목하게 한다. 안구 망막 내에서 NOS는 망막신경세포, 색소상피세포(pigment epithelium), amacrine 세포, ganglion 세포, 시세포 등에서 발견되는 것으로 알려져 있다.<sup>24,25</sup>

그리고 망막에서 NO가 생리적, 병리적 과정에서 매개체 역할을 하고 있다는 증거가 나타나고 있다. 첫째로 NO가 간체 시세포(rod photoreceptor)에서 voltage-gated ion channel을 조절하고,<sup>26</sup> 둘째로 망막혈류를 조절하고,<sup>27,28</sup> 셋째로 당뇨병성 혈관 질환에 부분적으로 NO가 관여한다는 증거들이 있다.<sup>29</sup>

이들 중에서 NO와 간체 시세포와의 관련성을 살펴보면, 시 감각 및 전달(visual processing and visual transduction) 과정에서 3'-5' cyclic guanosine monophosphate (cGMP)는  $Ca^{2+}$ 과 더불어 중요한 매개체로 역할을 한다.<sup>30</sup> 시세포 안에 존재하는 rhodopsin은 빛에 의해 활성화되어 cGMP phosphodiesterase를 활성화시키고 이로 인해 cGMP가 분해되어 그 농도가 줄어들게 된다. 따라서 cGMP에 의해 열렸던 ion channel (현재는 cyclic-nucleotide-gated channel; CNG channel이라 부름)이 닫히고 hyperpolarization이 형성된다.<sup>31</sup> 그런 후 다시 cGMP는 guanylate cyclase (GC)에 의해 재합성이 된다. 위에서도 언급했지만 NO의 target 효소 중 하나가 cGMP를 생성하는 GC이다. NO는 이 효소를 활성화시켜 cGMP를 많이 만들도록 자극한다.<sup>32</sup>

cGMP는 NO에 의한 합성 증가에 의해 양이 증가할 수도 있지만 분해가 되지 않아서 증가할 수도 있다. 그 예로 남은 cGMP 분해효소인 cGMP phosphodiesterase의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있는데, 안구에서 남은 NO에 의한 독성의 기전으로 cGMP가 축적된다는 사실을 많은 연구자들이 발표하고 있다.<sup>33,34</sup> 따라서 안구 내에서 증가된 cGMP농도와 독성이 관련되어 있다는 점에서 과량의 NO의 생성에 의한 cGMP 축적 또한 독성과 관련성이 있으리라 추정할 수 있다. 만약 첨가된 L-arginine이 과량의 NO를 생산시킨다면 안구 내에서 cGMP의 정상적인 생리적 매개체로서의 역할을 방해하고 혼란을 유도할 것으로 생각되며 그것이 독성의 기전과 관련이 있을 것으로 생각된다.

이전 연구들은 r-tPA 투여에 따른 병리학적 소견으로 단순히 독성이 있음을 제시하고 있다. 하지만 이 제제의 유용성을 고려한다면 보다 정확한 눈에서의 독성의 원인이 무엇인지를 알아야 할 것이다. 부형제인 L-arginine의 직접적인 독성이 있는지는 확실하지 않지만 그 대사물인 NO의 독성이 의심됨에 따라 이 과정에서 L-arginine이 관여되었는지를 집중적으로 알아보려고 한다.

이 연구 결과는 임상적으로 안과 질환에 r-tPA를 사용하는데 있어 망막 세포에서의 r-tPA 제제의 독성의 기전을 세포생화학적 방법을 통해 파악함으로써 안정성을 확보하는데 중요성을 갖고 있으며, 더 나아가 부형제인 L-arginine을 안과치료제에 첨가시 심각한 독성을 일으키는 기전을 밝힘으로써 안과약물 성분조성에 기여를 하리라 생각되어진다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

실험동물로는 ICR 마우스를 이용하였다. 세포배양에 사용되는 시약으로는 endotoxin-free water, glutamine, 그리고 MEM은 Gibco-BRL사(Grand Island, NY, USA), fetal bovine serum, calf, 그리고 horse serum은 Hyclone사(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였으며, 플라스틱 제품은 Falcon사(Lincoln, NJ, USA) 제품을 이용하였다. NADPH, Griess reagent, Hoechst 33258, propidium iodide, anti-syntaxin 항체 등은 Sigma Chemical Co.사(St. Louis, MO, USA), anti-GFAP 항체는 Chemicon사(Temecular, CA, USA) 제품을, anti-rhodopsin 항체는 Neo-Markers사(Fremont, CA, USA) 제품을, anti-nNOS 항체는 StressGene사(Victoria, BC, Canada) 제품을, 그리고 cGMP ELISA kit는 Assay Design Inc.사(Ann Arbor, MI, USA) 제품을 사용하였다. Amiloride와 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine acetate (NMMA)는 Tocris사(Avonmouth, Bristol, UK)에서 구입하였으며, ABC kit는 InnoGenex사(San Ramon, CA, USA) 제품을 사용하고, TUNEL 염색에 사용되는 ApopTag Plus *in situ* Apoptosis Detection Kit는 Oncogene사(Boston, MA, USA) 제품을 사용하였다.

### 2. 방법

r-tPA (상품명; 액티라제 주사, Boehringer Ingelheim)는 증류수로 먼저 100 $\mu$ g/0.1 ml 농도의 용액(L-arginine 3.5 mg/0.1 ml 함유)을 만들어 -70°C에서 보관하였다. 이 고농도의 r-tPA를 일차 배양된 망막세포에 처리 시에는 최종농도를 1, 5, 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l로 농도를 달리 하여 사용하였다. 이에 상응되는 L-arginine은 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액으로 고농도 용액(100 mM)을 만들어 최종농도가 0.5, 2.5, 5.0 mM이 되게 배양세포에 처리하였다. tPA 단독 처리 시에는 tPA를 PBS에 준비하여 r-tPA 10 $\mu$ g에 해당되는 5,800 IU의 Alteplase (tPA)를 배양액 400 $\mu$ l에 처리하였다.

#### 가. 조직학적 검사

(1) H-E 염색: r-tPA (L-arginine 포함)의 용액(최종농도 2.5 $\mu$ g/0.1 ml)을 흰쥐 안구의 초자체에 주입한 후 6시간과 24시간 후에 ether 마취 하에 흰쥐의 흉곽우리를 열고, 오른심방귀(right auricle)를 절개함과 동시에 왼심실(left ventricle)을 통해 4% paraformaldehyde 고정액(0.1 M PBS, pH 7.4)으로 관류하였다. 안구를 적출하여 고정액에 2~24시간 둔 후 파라핀에 포매하고 포매한 조직은 약 6 $\mu$ m 두께로 절편하여, 깨끗이 닦은 슬라이드 warmer에 있는 증류수 위에 조직을 띄워 조직을 잘 편 후 슬라이드 위에 얹고 H-E 염색 후에 광학현미경으로 관찰하였다. 대조군은 r-tPA 대신 balanced salt solution (BSS)으로 초자체에 주입하였으며 같은 방법으로 조직을 만들어 광학현미경으로 관찰하였다.

**(2) Transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) 염색:** r-tPA (L-arginine 포함)의 용액(최종농도 2.5 $\mu$ g/0.1 ml)을 흰쥐 안구의 초자체에 주입한 후 12시간이 지난 다음 염색을 위하여 안구조직을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정한 후 파라핀 포매를 거쳐 조직절편을 만들었다. 이 절편은 탈 파라핀 과정을 거친 후 PBS용액으로 세척하였다. 3% hydrogen peroxide 용액으로 5분간 전처리하고, equilibrium buffer로 균질화시킨 후, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme과 digoxigenin-labeled substrate용액으로 42°C에서 1시간 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin을 처리한 후, diaminobenzidine (DAB)으로 발색시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다. 대조군은 r-tPA 대신 balanced salt solution (BSS)으로 초자체에 주입하였으며 같은 방법으로 조직을 만들어 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 나. 세포 배양

Glia 세포 없이 순수한 망막세포만 배양하는 것은 매우 어려운 일이다. 이를 해결하기 위해서 중추신경세포 배양법을 응용하였다. 중추신경세포만을 순수하게 배양하기 위해서 GCM (glial conditioned medium) 배지로 배양하면 신경세포의 생존율을 높이고 신경 연결을 증가시키므로 이 방법을 망막세포 배양에 이용하였다. 이에 GCM 준비를 위하여 일차 별아교세포 배양을 하였다. 배양방법은 생후 1~2일된 신생 마우스를 희생하여 수술현미경 하에서 뇌를 적출한 다음, 뇌막을 조심스럽게 제거한 후 대뇌피질부위를 해부하여 0.09% trypsin용액에 넣은 후 37°C 배양기에 30분간 배양하였다. 한 plate에 1.0 대뇌반구의 밀도로 10% fetal bovine serum (Hyclone)을 준비한 후 세포 현탁액을 plating하였다. Confluent를 형성할 때까지 배양하며 매주 2회씩 GM (growing media)으로 배지를 바꿔주었다.

일차 망막세포 배양은 별아교세포 배양 때와 같은 신생마우스에서 시행하였다. 수술현미경하에서 마우스 눈을 적출한 후, 각막, 맥락막, 수정체를 조심스럽게 제거하고 망막층 부위만을 분리하여 Hanks balanced salt solution (HBSS)에 담은 후 fire-polished Pasteur pipette을 사용하여 단일세포로 분리시켰다. 분리된 세포는 poly-D-lysine으로 coating된 24-well plate에 plating하였다(12 retinas per plate). 사용된 배지는 10% heat-inactivated fetal bovine serum과 MEM 배양액을 사용하였다. 배양조건은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 농도로 유지하였다. Plating 후 24시간 내지 48시간이 경과한 후에 60%의 배지를 미리 준비해 놓은 GCM 배지로 바꾸었다. 배양 후 10~11일에 실험에 사용하였다.

배양된 망막세포에서 세포의 종류를 확인하기 위해 면역화학적 염색법(immunocytochemistry)을 이용하였다. 세포배양액을 methanol과 acetone이 1 : 1로 혼합된 용액으로 -20°C에서 하룻밤 동안 고정한 후 일차항체, 즉 anti-rhodopsin, anti-GFAP, anti-syntaxin, anti-MAP2ab, anti-nNOS 항체들과 4°C에서 overnight 반응시켰다. 그후 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)법으로 염색을 하였다. 이때 사용하는 1차 항체는 2 $\mu$ g/ml로 희석하여 사용하였고, 2차 항체로는 biotin이 표지된 항체를, 그리고 3차 시약으로서는 2차 항체와 특이적 결합을

하는 avidin-biotin peroxidase complex를 사용하며, 0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합액으로 발색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 다. 세포사멸 조사

(1) **형태학적 관찰:** 배양된 망막세포 중 사멸을 일으킨 세포의 종류 및 형태학적 관찰을 위해 위상차현미경을 이용하였고, r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l와 L-arginine 5.0 mM을 투여한 후 3일 동안 관찰하였다.

(2) **Lactate dehydrogenase (LDH) 측정:** 배지로 분비된 LDH의 활성을 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. Total LDH release는 각 실험을 시행한 후 세포를 -70°C에서 2시간 이상 얼렸다가 녹인 후 측정하였고 실험방법은 일차배양된 망막세포배지에 tPA 5,800 IU/400 $\mu$ l Alteplase, r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 및 L-arginine 5.0 mM을 투여한 후 24시간 후에 LDH 분비량을 측정하였다. 모든 결과는 mean $\pm$ S.E.M으로 표시하였고, SigmaStat (Jandel)의 one-way ANOVA와 the Student-Newman-Keul's test를 이용하여 통계처리하였다. P<0.05이면 통계적으로 유의한 결과로 인정하였다.

(3) **Hoechst-propidium iodide (PI) 염색:** 형광염료인 Hoechst 33258과 propidium iodide 염색액(Sigma)으로 염색하여 살아있는 세포와 사멸세포를 구분하고, 핵의 형태와 막의 손상 유무에 기초하여 apoptotic 세포를 식별하였다. 실험방법은 LDH 측정 때와 같이 일차배양된 망막세포배지에 tPA 5,800 IU/400 $\mu$ l Alteplase, r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 및 L-arginine 5.0 mM을 투여한 후 24시간 후에 염색을 하였다. 염색방법은 먼저 Hoechst 염색액을 2~5 mg/ml의 농도로 배지에 첨가한 후 37°C에서 30분 동안 배양한 다음 propidium iodide 용액을 2~5 mg/ml 농도로 배지에 첨가하였다. UV filter를 사용하여 위상차현미경으로 관찰하였다.

#### 라. 세포사멸의 기전에 관한 조사

(1) **Nitric oxide (NO)의 역할 조사:** NO의 발생을 조사하기 위해 간접적으로 nitrite (NO<sub>2</sub>)의 발생을 측정하였다. 정상 세포 및 r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l와 L-arginine 5.0 mM로 24시간 동안 처리된 세포 배양액으로부터 얻은 시료 100 $\mu$ l를 96-well plate에 담은 후 nitrite 표준용액 100 $\mu$ l를 넣었다. 그 후 Griess working solution 100 $\mu$ l를 넣고 15분 동안 상온에서 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite-standard curve와 비교하여 sample에서의 nitrite의 농도를 계산하였다.

또한 모든 type의 NOS를 억제할 수 있는 inhibitor인 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine acetate (NMMA)는 r-tPA (L-arginine 포함)와 L-arginine으로 처리하기 1시간 전에 1, 10, 100 $\mu$ M의 농도로 전처리 하였으며 24시간 후 LDH 측정 및 위상차현미경 관찰로 세포생존율을 조사하였다.

## (2) cGMP에 관한 실험

(가) cGMP의 농도 측정; 시세포에서는 cGMP가 매우 중요한 시자극 전달과정의 매개체로 알려져 있다. NO는 guanylate cyclase (GC) 효소를 활성화시켜 cGMP를 증가시키므로 NO를 측정하기 위한 간접적인 방법으로 cGMP를 측정하였다. r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 및 L-arginine 5.0 mM을 처리한 후 0, 12, 24시간 후에 망막세포 배양배지를 취한 다음 1/100 부피의 concentrated HCl을 넣고 -20°C에서 측정 할 때까지 보관하였으며 100 $\mu$ l의 sample을 중화 과정을 거친 후 ELISA kit를 사용하여 cGMP의 양을 측정하였다. 이 kit의 sensitivity는 약 1 pmole/ml 정도이며 실험이 진행된 plate는 405 nm 파장에서 kit에 포함된 manual을 참조하여 ELISA reader로 측정하였다.

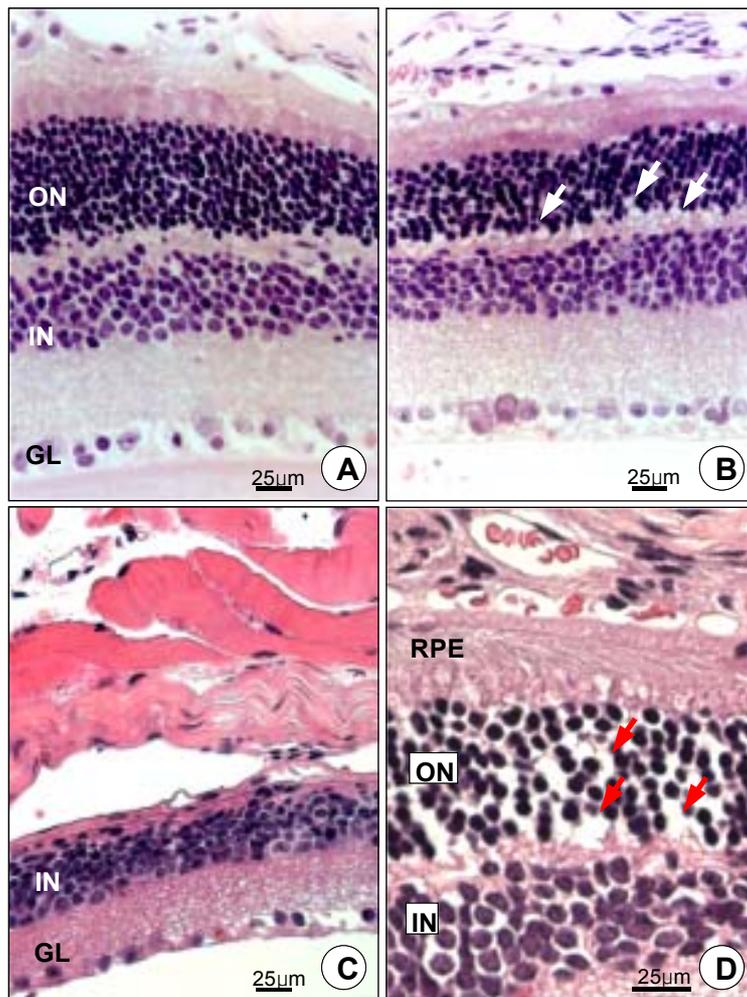
(나) CNG channel blocker에 의한 사멸 억제; CNG channel blocker인 amiloride는 r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l와 L-arginine 5.0 mM로 처리하기 1시간 전에 1, 10, 100 $\mu$ M의 농도로 전처리 하였으며 24시간 후 LDH 측정 및 위상차현미경 관찰로 세포생존율을 조사하였다.

### III. 결 과

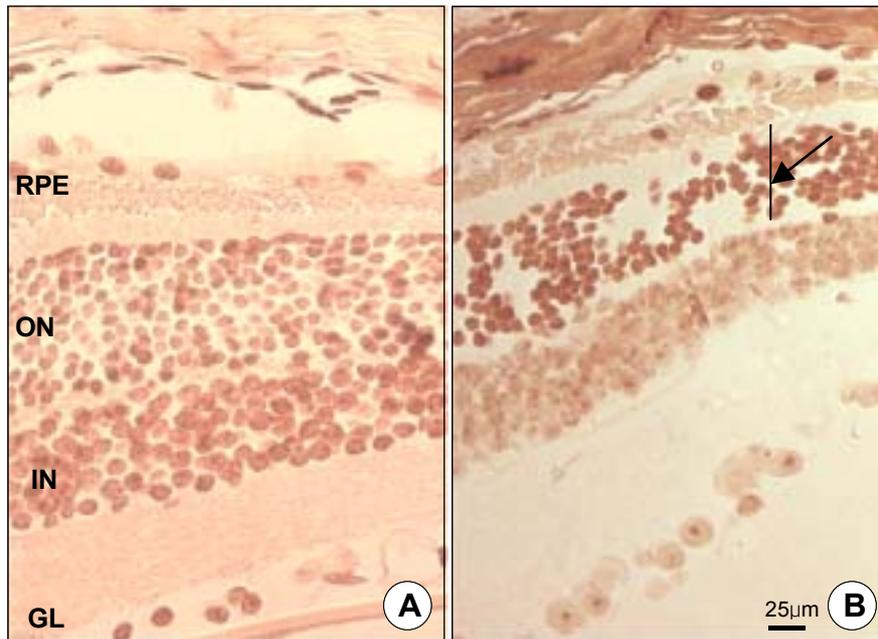
#### 1. 조직학적 변화

##### 가. H-E 염색

r-tPA (L-arginine 포함)를 안구 내에 주입하였을 때 망막에 어떤 조직학적 변화가 일어나



**Fig. 1.** Photomicrographs (H-E stain) of transverse sections of mouse retina after the intravitreal r-tPA (with L-arginine) injection of 2.5µg/0.1 ml. A, control; B, D, 6 hrs; C, 24 hrs after the treatment with r-tPA (with L-arginine). There are many vacuoles in ON (arrows in D). IN, Inner nuclear layer; ON, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium; GL, ganglion cell layer.



**Fig. 2.** TUNEL stained photomicrographs of retina at 12 hrs after the intravitreal r-tPA (with L-arginine) injection of 2.5µg/0.1 ml. Cell death showed DNA fragmentation; dense stained nuclei (arrow in B). A, control.

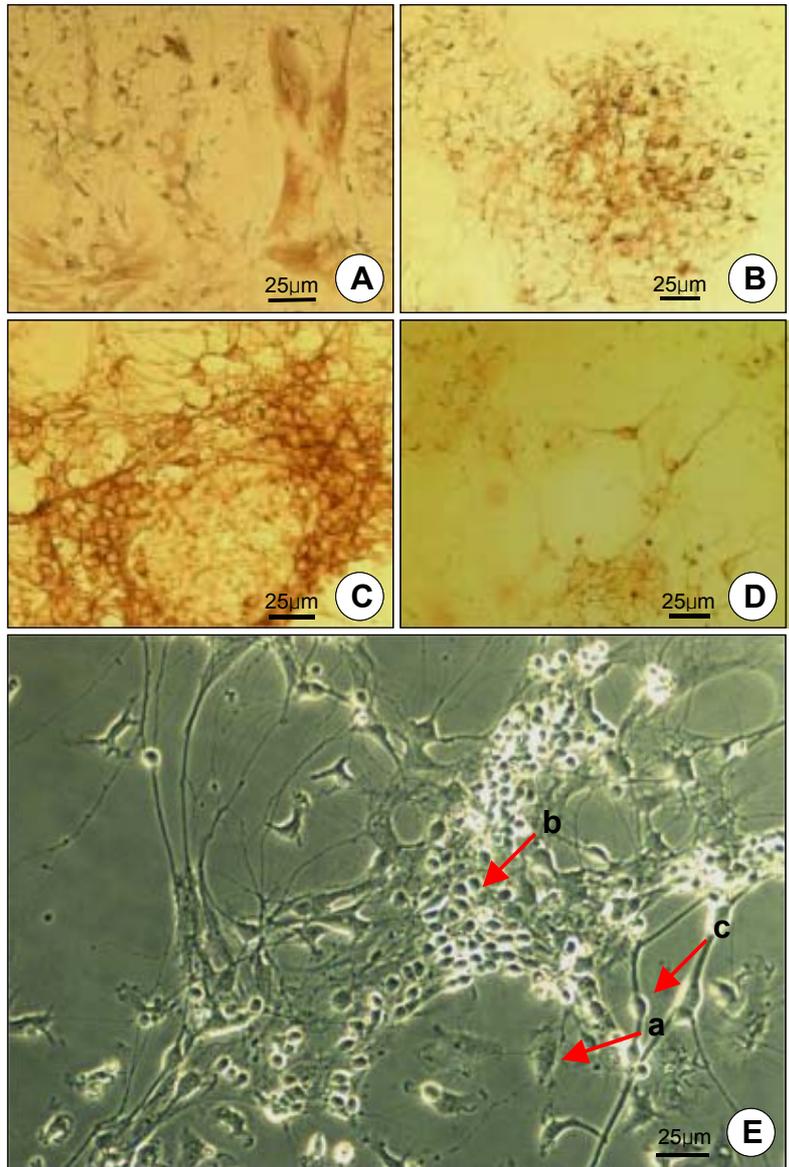
는 지에 대한 실험을 수행하였다. r-tPA (L-arginine 포함)의 용액(최종농도 2.5µg/0.1 ml)을 흰쥐 안구의 초자체에 주입한 후 조직을 관찰한 결과 외핵층(outer nuclear layer)이 얇아지고, 세포가 없어진 후 생긴 vacuole들이 관찰되었다. r-tPA (L-arginine 포함)로 처리된 지 24 시간 후의 조직에서는 외핵층이 거의 관찰되지 않는 부분이 존재하였다(Fig. 1).

#### 나. TUNEL 염색

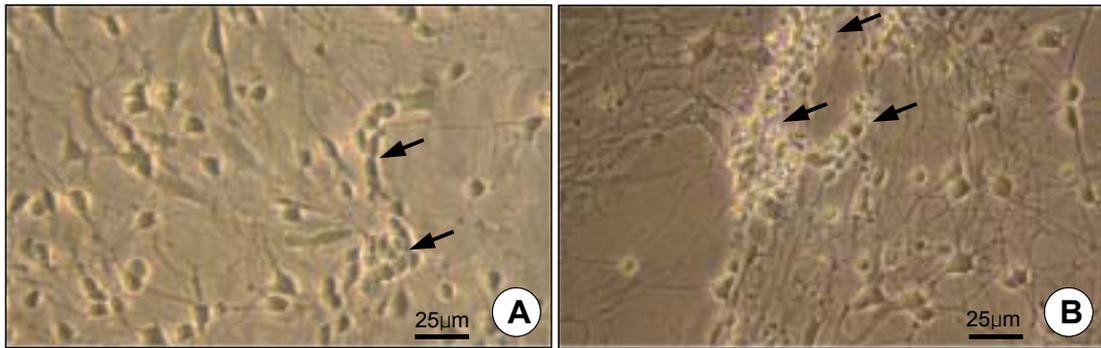
TUNEL 염색 결과 대조군에 비해 r-tPA (L-arginine 포함)로 처리한 안구조직 내 외핵층에 존재하는 세포가 강한 반응을 보였다(Fig. 2).

### 2. 세포배양 실험

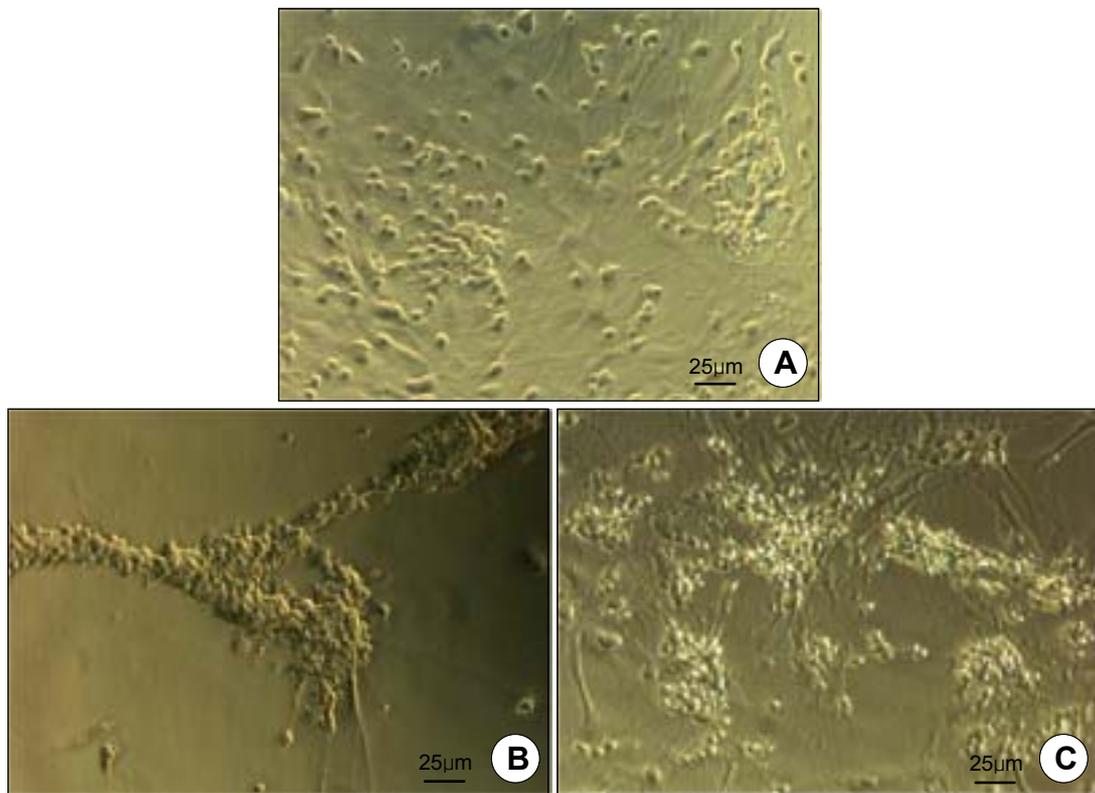
흰쥐 망막세포를 배양한지 10일 정도 지난 후 위상차현미경으로 관찰한 결과 망막세포들이 별아교세포로 준비한 GCM 배양액으로 성공적으로 배양되어 신경세포들의 성장 및 연결(synapse)이 잘 형성되었음을 알 수 있었다. 배양된 망막세포 각각에 대한 일차 항체를 이용한 면역화학적 염색으로 세포의 종류를 확인할 수 있었다. 이 중 세포가 가장 작은 것이 시세포이며 이들은 서로 뭉쳐서 배양되는 특징을 보였고 amacrine 세포는 시세포 주위를 감싸고 있었다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Immunostain with specific antibodies in the primary cultured retinal cells. A, Müller cell (anti GFAP); B, photoreceptor (anti rhodopsin); C, amacrine cell (anti syntaxin); D, neuron (anti MAP2ab). Phase contrast photomicrograph of primary cultured retinal cells (E). a, Müller cell; b, photoreceptor; c, neuron.



**Fig. 4.** Phase contrast photomicrographs of retinal cells at 24 hours after the treatment with L-arginine. A, control; B, L-arginine 5.0 mM. The arrows indicate photoreceptor cells (A) and dead photoreceptors induced by L-arginine (B).



**Fig. 5.** Phase contrast photomicrographs of retinal cells at 3 days after the treatment with r-tPA (with L-arginine) and L-arginine. A, control; B, r-tPA (with L-arginine) 10µg/400µl: synapse were destroyed; C, L-arginine 5.0 mM: synapse were remained.

### 3. 세포사멸 조사

#### 가. 형태학적 관찰

L-arginine을 투여한 후 24시간 후에 위상차현미경으로 관찰한 결과 세포사멸은 시세포에서 주로 일어남을 알 수 있었다(Fig. 4). r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l와 L-arginine 5.0 mM을 투여한 후 3일째에 관찰한 결과 r-tPA (L-arginine 포함)가 유도시킨 세포사멸이 L-arginine의 경우보다 더 심하게 일어났으며, 현미경 관찰 결과 r-tPA (L-arginine 포함)의 경우에는 신경세포의 synapse 연결에 영향을 주는 것으로 보여졌다(Fig. 5).

#### 나. LDH 측정

r-tPA (L-arginine 포함)의 성분 중 tPA와 L-arginine이 독성과 연관성이 있는지를 알아보기 위해 세포사멸 정도를 조사하였다. 세포사멸 정도는 LDH 측정과 Hoechst-PI 염색법을 통해서 수행하였다. 배지로 유출된 LDH는 세포사멸의 late stage를 반영한다. 실험 결과 일차 배양된 망막세포에서 r-tPA (L-arginine 포함)와 L-arginine은 각각 49.6 $\pm$ 3.9%와 39.3 $\pm$ 2.4%로 세포사멸을 유도했으나 tPA 단독으로는 21.1 $\pm$ 1.5%로 대조군(18.7 $\pm$ 2.4%)에 비해 유의한 세포사멸을 일으키지 못하였다(Fig. 6).

좀 더 구체적인 세포사멸과정을 조사하기 위해서 약물의 투여량과 시간을 다양하게 조절하여 실험하였다. 실험 결과 r-tPA (L-arginine 포함)농도 5와 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 사이에서 세포 생존율의 급격한 변화를 보였고, L-arginine인 경우 최종농도 5.0 mM에서 급격히 세포사멸

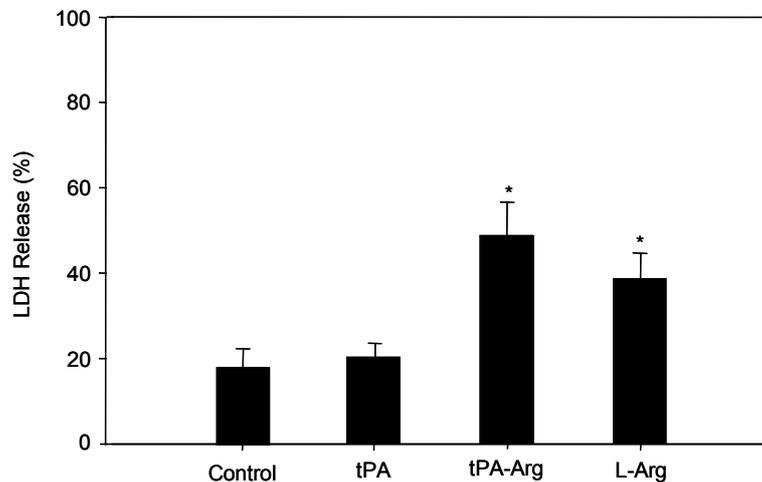
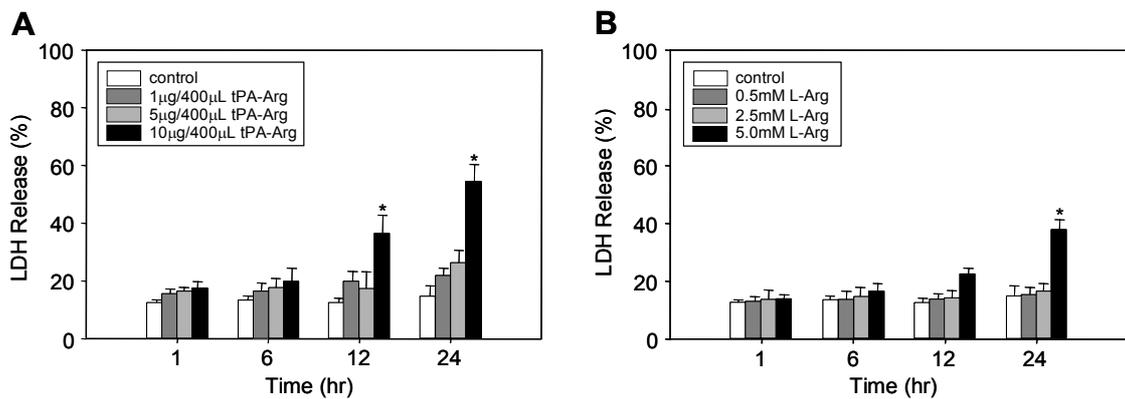


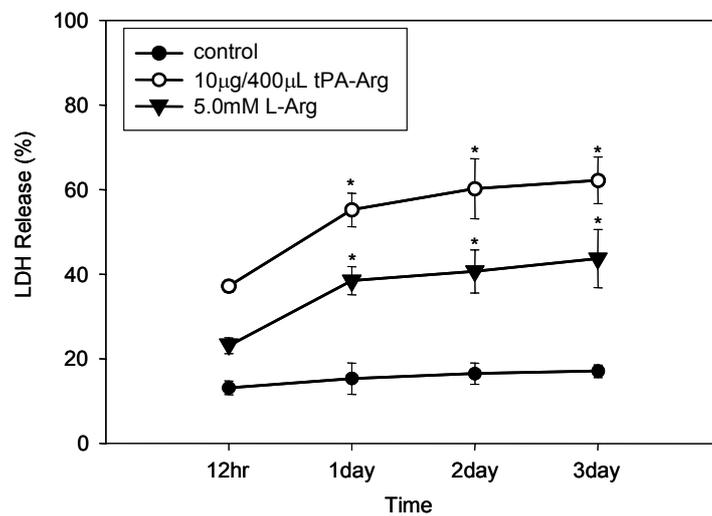
Fig. 6. Measurement of cell death in retinal cell culture. LDH assay was performed at 24 hours after the treatment with tPA (tPA without L-arginine) tPA-Arg (tPA with L-arginine) and L-arginine. \*P<0.01 compared with control.

이 일어났다(Fig. 7). 5.0 mM의 L-arginine의 농도는 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l의 r-tPA (L-arginine 포함)에 포함된 L-arginine 농도와 일치한다. 또한 이런 결과는 세포사멸이 necrosis 과정에 의해 일어남을 말해준다.

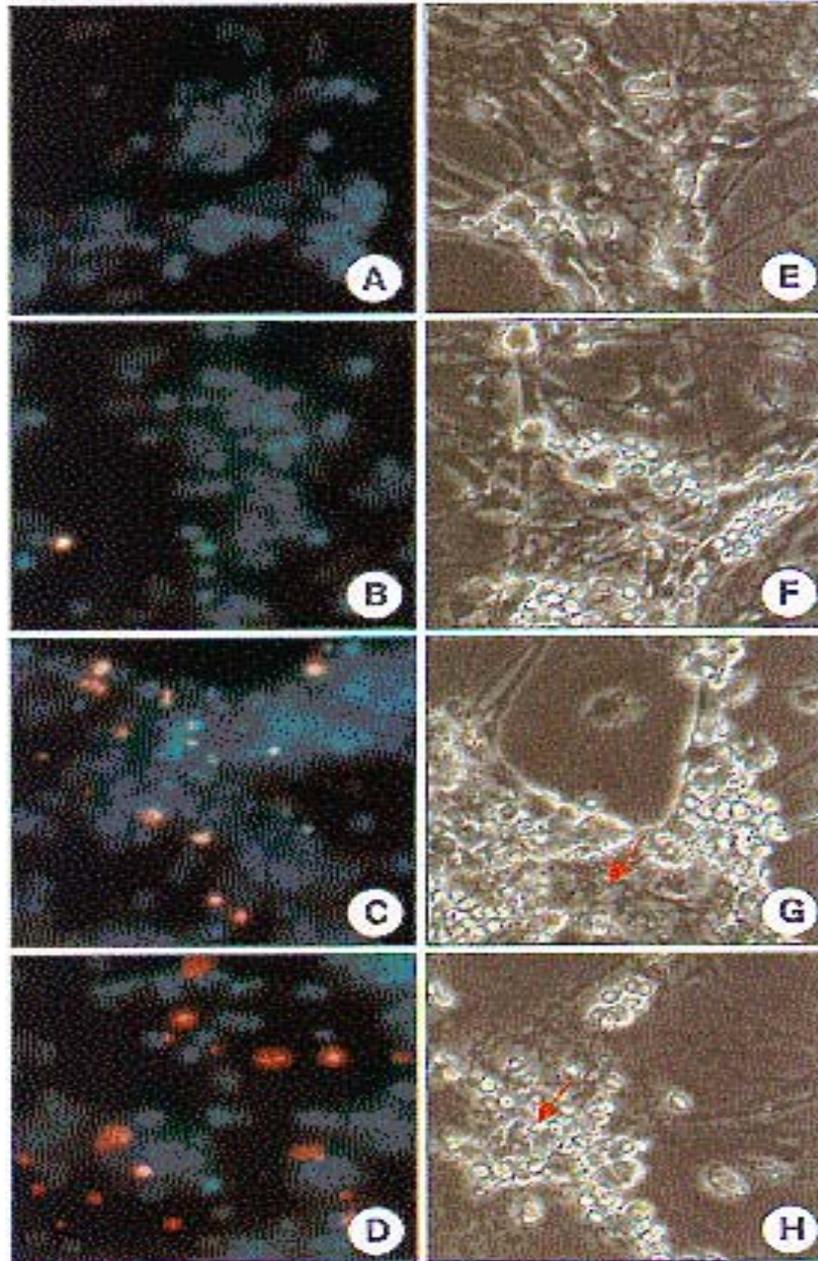
세포사멸을 3일째까지 조사한 결과 24시간 이후에는 세포사멸현상이 크게 일어나지 않았고, r-tPA (L-arginine 포함)의 경우는 약 40%, L-arginine의 경우는 약 60%의 세포 생존율을 계속해서 유지하였다(Fig. 8).



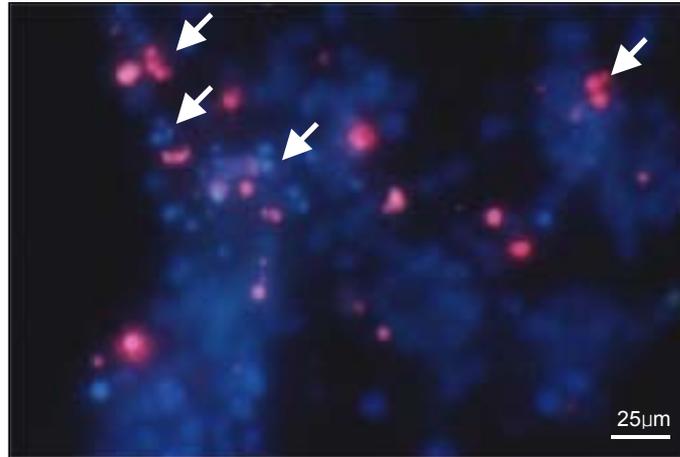
**Fig. 7.** Time course of cell death of various concentrations of r-tPA (with L-arginine) (A) and L-arginine (B). \*P < 0.01 compared with same time control.



**Fig. 8.** Survival of cultured retinal cells after the treatment with 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine. \*P < 0.01 compared with same time control.



**Fig. 9.** Fluorescence (Hoechst-PI stain) (A~D) and phase contrast (E~H) photomicrographs of primary cultured retinal cells at 24 hours after the treatment with tPA (without L-arginine), r-tPA (with L-arginine), and L-arginine. A, E, control; B, F, tPA (without L-arginine) 5,800 IU/400µl Alteplase; C, G, r-tPA (with L-arginine) 10µg/400µl; D, F, L-arginine 5.0 mM. Arrows indicate dead cells. Fluorescence photomicrographs illustrate the change of the nuclear morphology of retinal cells (C&D)(Original magnification  $\times 300$ ).



**Fig. 10.** Fluorescence (Hoechst-PI stain) photomicrographs of cultured retinal cells at 24 hours after the treatment with L-arginine 5.0 mM. L-arginine induced cell death showed condensed nuclear fragmentation (arrows).

#### 다. Hoechst-PI 염색

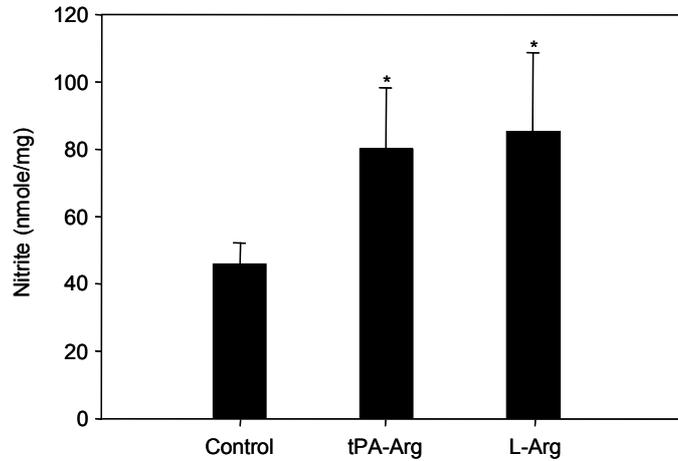
일차 배양된 망막세포를 Hoechst-PI 염색 후 형광현미경으로 관찰하였다. Hoechst 염색(푸른색)은 모든 세포의 핵을 염색할 수 있지만 PI (붉은색)는 세포막의 기능을 상실한 경우에만 염색이 된다. 실험 결과 LDH 측정 때와 마찬가지로 tPA 단독으로는 세포사멸이 일어나지 않았고 r-tPA (L-arginine 포함)나 L-arginine을 투여한 경우 유사한 정도로 세포사멸이 일어났다(Fig. 9). 사멸된 세포의 형태는 핵분절(nuclear fragmentation)이 뚜렷한 apoptosis 과정을 거치는 세포들이 보였다(Fig. 10).

### 4. 세포사멸의 기전에 관한 조사

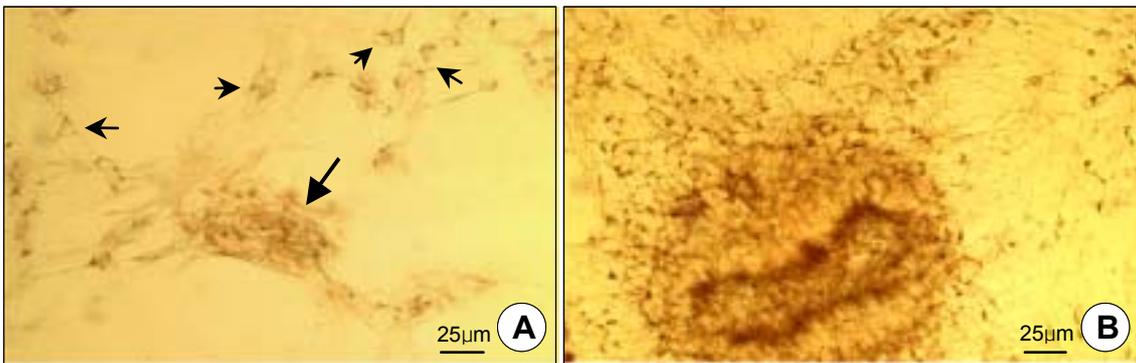
#### 가. Nitric oxide (NO)의 역할 조사

L-arginine은 NOS의 기질로서 효소반응이 일어나면 NO를 발생시킨다. 이 NO는 매우 불안정한 기체이며 산소와 결합하여 안정된 물질인 nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )를 발생시킨다. 이 물질은 Griess reagent로 발색시켜 측정이 가능하다. 본 실험 결과 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine은 각각  $81.0 \pm 8.9$  nmole/mg과  $86.1 \pm 11.5$  nmole/mg으로 이 두 약물을 투여하지 않은 대조군( $46.8 \pm 3.6$  nmole/mg)에 비해 유의하게 많은 nitrite를 발생시켰다(Fig. 11).

다음으로 NOS가 여러 망막세포에 어떻게 분포하는지를 알아보려고 하였다. 실험방법으로 nNOS 항체를 이용한 면역화학적 염색법을 사용하였다. 그 결과 nNOS는 주로 시세포에서 풍부하게 발현되고 있음을 보이고 있다(Fig. 12). 이것은 L-arginine이 세포 안으로 전달된다면 충분히 NO를 생성할 수 있음을 보여주는 결과이다. r-tPA (L-arginine 포함) 및



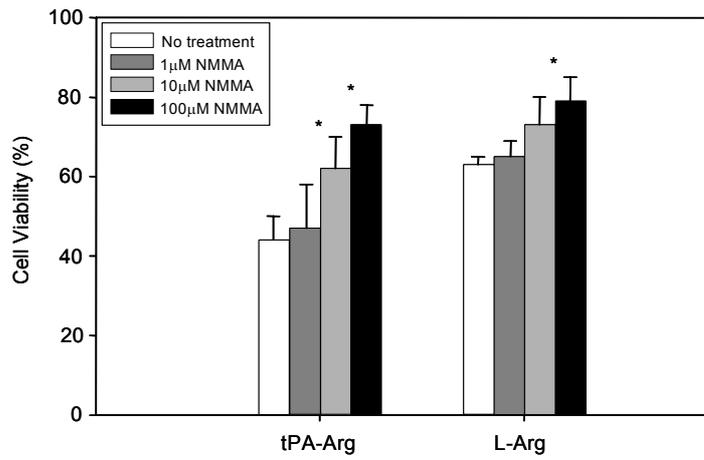
**Fig. 11.** Measurement of nitrite ( $\text{NO}_2$ ) by Griess reaction. \* $P < 0.05$  compared with control.



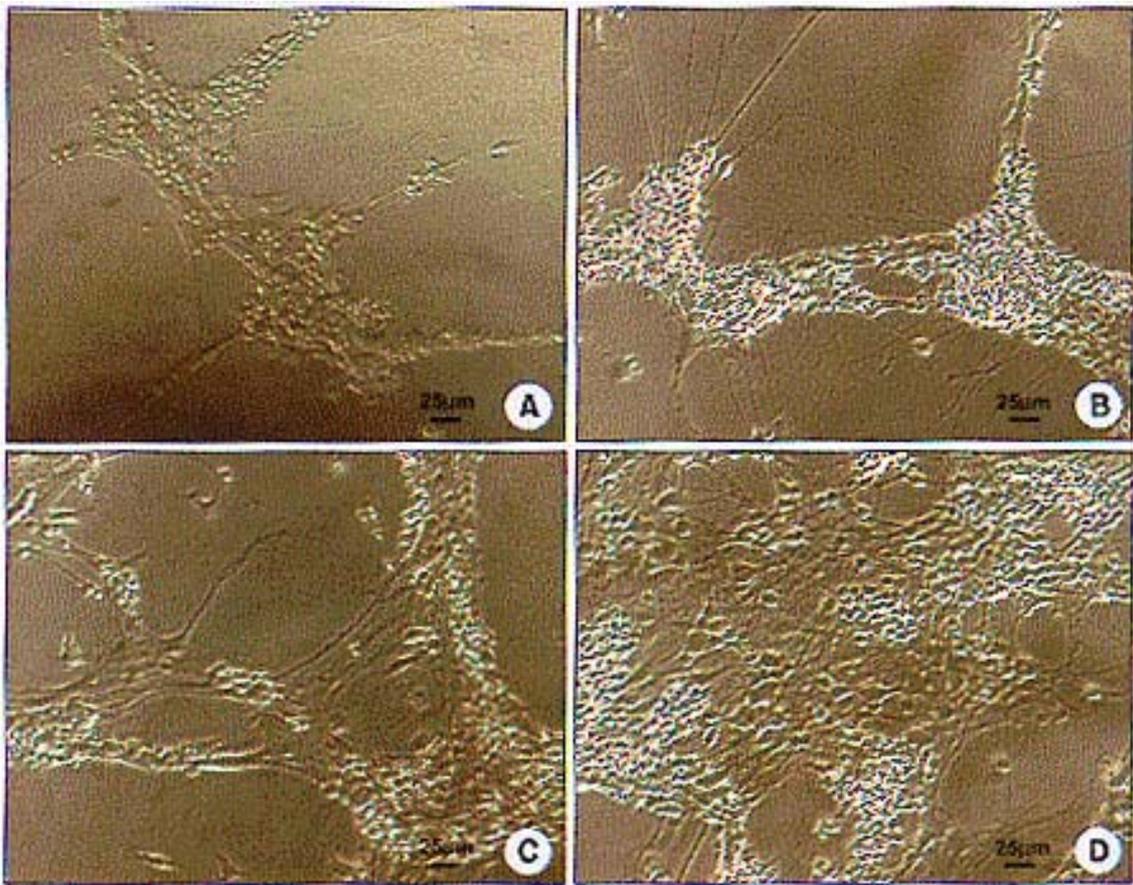
**Fig. 12.** Localization of nNOS in the primary cultured retinal cells. A, Small arrows indicate neurons and large arrow indicates photoreceptor cells. B, photoreceptor cells.

L-arginine 처리 시 nitrite양이 증가한다는 사실은 망막세포에 L-arginine 전달 시스템과 풍부한 NOS가 존재함을 나타내 주고 있는 것이다.

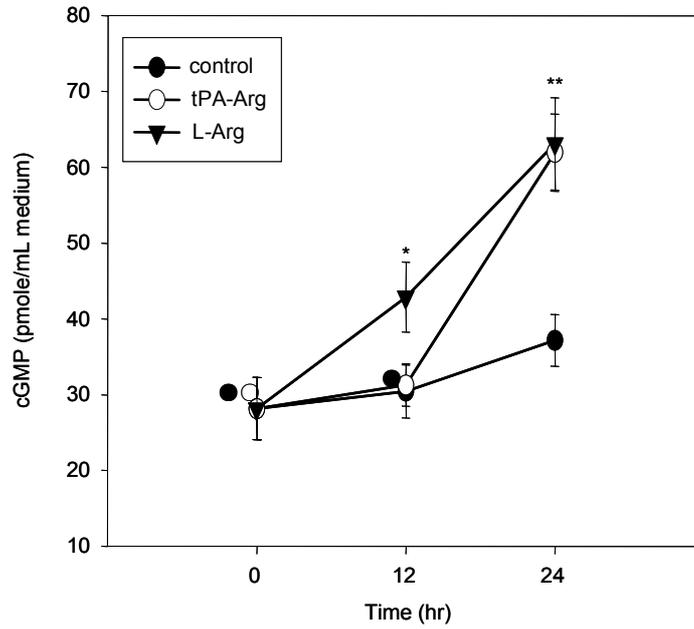
아직까지도 NO는 세포사멸과 보호작용이라는 양면성을 갖는 것으로 알려져 있다. 실제로 NO의 발생이 망막세포, 특히 시세포의 사멸을 유도했는지에 대한 조사가 필요했다. 세포사멸과 NO와의 관련성을 찾기 위해 nonspecific NOS inhibitor인 NMMA ( $\text{N}^G$ -monomethyl-L-arginine acetate)를 이용해서 알아보았다. 그 결과 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine 처리군 모두에서 NMMA의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 높아짐이 관찰되었으며 NMMA 농도  $100\mu\text{M}$  이상에서 세포사멸을 효과적으로 막을 수 있었다(Fig. 13, 14).



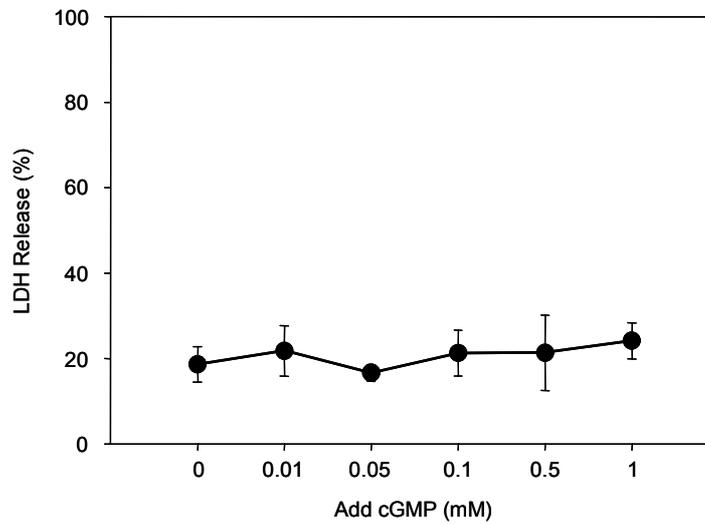
**Fig. 13.** Measurement of cell viability (by LDH assay) of cultured retinal cells pretreated with various concentrations of NMMA (NOS inhibitor) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine. \*P<0.05 compared with control.



**Fig. 14.** Phase contrast photomicrographs of cultured retinal cells pretreated with NMMA (NOS inhibitor) followed by the treatment with 10µg/400µl of r-tPA (with L-arginine). A, no NMMA; B, 1µM NMMA, C, 10µM NMMA; D, 100µM NMMA.



**Fig. 15.** The effects of r-tPA (with L-arginine) and L-arginine on cGMP formation (by ELISA assay) in cultured retinal cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with same time control.



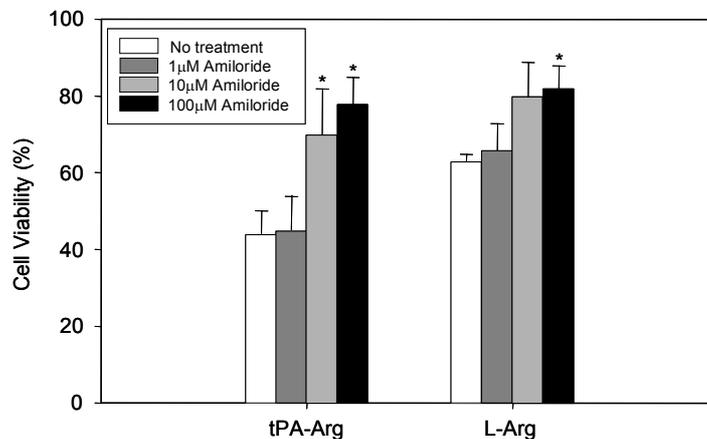
**Fig. 16.** Measurement of cell death (by LDH assay) of primary cultured retinal cells at 24 hours after adding various concentrations of cGMP.

## 나. cGMP에 관한 실험

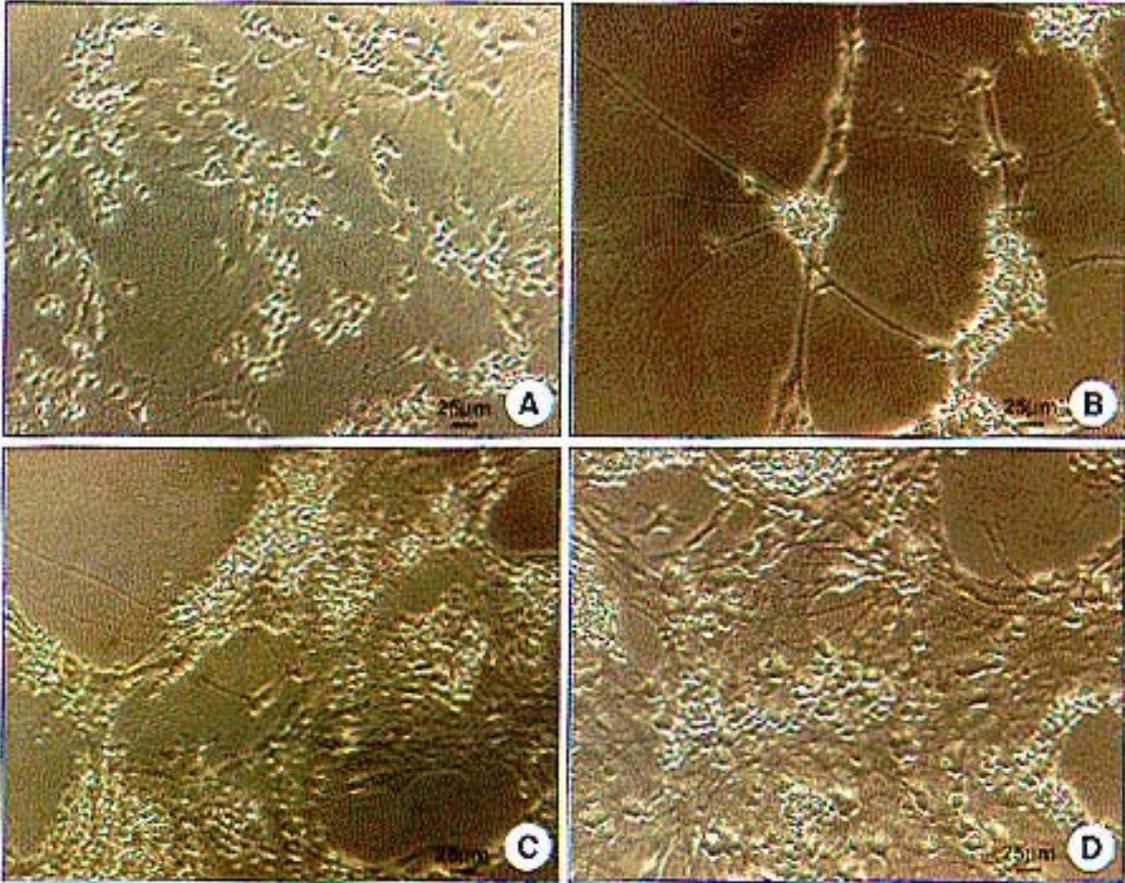
(1) **cGMP의 농도변화:** r-tPA (L-arginine 포함) 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l와 L-arginine 5.0 mM을 투여한 두 군에서 24시간 후에 cGMP 양이 각각 61.9 $\pm$ 5.1 pmole/ml와 63.1 $\pm$ 6.1 pmole/ml로 발생하였으며 약물을 처리하지 않은 대조군(37.2 $\pm$ 3.4 pmole/ml)에 비해 유의한 차이가 있었다 (Fig. 15).

한편 cGMP를 세포 밖에서 처리한 경우에도 세포사멸이 일어나는지를 조사하였다. cGMP를 PBS로 녹여 최종농도가 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM이 되게 하여 일차 배양된 망막 세포에 투여하였다. 24시간 후 LDH 측정 결과 배지에 투여된 cGMP로는 세포사멸 현상을 일으키지 못하였다(Fig. 16).

(2) **CNG channel blocker에 의한 사멸 억제 조사:** 증가된 cGMP와 세포사멸과의 관련성을 찾기 위하여 시세포에서 cGMP에 의해 유도되는 ion channel 개방과정과 연관시켜 실험을 수행하였다. 실제로 많은 경우 세포사멸은 과량의 ion influx와 관련이 있다. Cyclic nucleotide gated (CNG) channel blocker인 amiloride를 투여한 결과 r-tPA (L-arginine 포함)와 L-arginine 처리군 모두에서 amiloride의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 증가함을 알 수 있었으며 amiloride 농도 10 $\mu$ M 이상에서 세포사멸이 현저히 감소하였다(Fig. 17, 18). 이런 결과는 시세포에서 L-arginine에 의한 세포사멸 과정이 CNG channel의 지속적인 개방과 관련되어 있는 것을 시사한다.



**Fig. 17.** Measurement of cell viability (by LDH assay) of cultured retinal cells pretreated with various concentrations of amiloride (CNG channel blocker) followed by the treatment with 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine. \*P<0.05 compared with control.



**Fig. 18.** Phase contrast photomicrographs of cultured retinal cells pretreated with amiloride (CNG channel blocker) followed by the treatment with  $10\mu\text{g}/400\mu\text{l}$  of r-tPA (with L-arginine). A, no treatment; B,  $1\mu\text{M}$  amiloride; C,  $10\mu\text{M}$  amiloride; D,  $100\mu\text{M}$  amiloride.

#### IV. 고 찰

L-arginine은 무독성 아미노산으로 알려져 있다. 따라서 많은 의약품의 부형제로 L-arginine은 널리 사용되고 있다. 관상동맥 폐쇄증에 사용되는 r-tPA도 L-arginine을 부형제로 사용한다. 안 질환에서도 혈전을 제거해야 하는 경우 소량의 tPA를 투여하면 큰 효능을 볼 수 있는데, 여러 연구자들에 의해서 안구 내에 상용화된 r-tPA를 투여하는 경우 망막독성이 발생할 수 있다고 보고하였다. 하지만 그 독성이 어떤 기전을 통해서 생겼는지는 아직까지 밝혀지지 못한 상황이다. 그리고 r-tPA 뿐 아니라 L-arginine이 포함된 항생제를 눈에 투여 시에도 독성이 나타났다는 보고가 있었기 때문에 L-arginine이 안구 내에서 독성에 관여했을 가능성이 있다.

안과 치료제로서 r-tPA의 독성을 연구하기 위해서는 안구 내 초자체에 직접 r-tPA를 투여한다는 것이 혈액 내 투여 시와 어떤 점에서 큰 차이가 있는지에 대한 검토가 먼저 필요하다. 우선 초자체는 망막과 직접 접해 있고 망막은 중추신경계로써 여러 신경세포가 분포하고 있다. 따라서 r-tPA 제제가 중추신경계에 어떠한 영향을 미치는가 하는 것이 중요하게 고려되어야 한다. 또한 초자체강이라는 독립된 공간 안에 직접 투여함으로써 혈액투여 시 보다 장기간 일정농도의 약물에 노출될 수 있다는 것도 고려되었다.

우선 신경세포에 대한 방어기전과 독성에 대한 연구 분야 중 최근 중요하게 생각하고 있는 물질 중 하나가 NO라는 점에 주목하였다. NO는 L-arginine이 NOS의 반응으로 생성되는 물질로서 신경계에서는 신경전달물질(neurotransmitter)로 매우 중요한 역할을 하지만 NO의 반응성과 유해성 때문에 최근에 관심이 높아지고 있다.<sup>20</sup> 그리고 NOS 발현이 조직에 따라 다른데, 망막신경세포의 경우 여러 isotype의 NOS가 존재한다.<sup>21</sup> 실제로 본 실험에서 일차 배양된 흰쥐 망막세포 중 주로 시세포 내에 많은 nNOS가 분포하고 있음이 관찰되었다. 따라서 L-arginine의 독성실험으로 우선적으로 L-arginine을 기질로 사용하는 NOS와의 연관성을 조사하였고, 본 연구 결과는 이런 가정을 설명할 수 있는 한 증거를 제시하는데 중점을 두었다.

NOS는 1980년대에 처음으로 보고되었는데 조직에 따라 다른 isotype이 존재하는 것으로 알려져 있으며 현재까지 3종류가 밝혀져 있다. 이 효소는 P<sub>450</sub> heme, pteridine cofactor, FAD, FMN-containing reductase domain, calmodulin (CaM)-dependent activation 등의 구조요소를 갖고 있다. Calcium 의존성 NOS의 경우 calcium은 calmodulin과 반응한 후 이 효소에 붙어서 분리되어 있는 redox center, 즉 reductase region에 존재하는 FMN, FAD, NADPH binding domain과 oxygenase region에 존재하는 heme이 서로 이웃할 수 있게 해줌으로서 활성화를 유도하는 것으로 생각되고 있다.<sup>35</sup> 신경세포와 골격근에 존재하는 nNOS와 혈관 내피세포와 상피세포에 존재하는 eNOS는 항시 발현되며 calcium 의존성을 나타내고, macrophage,

간세포, 별아교세포, 평활근세포 등에 존재하는 iNOS는 inducible하며 calcium 비의존성을 나타낸다고 알려져 있다. nNOS의 경우 중추신경계에 골고루 퍼져 있으며 soluble form과 membrane-associated form 모두 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>36</sup>

NO는 세포신호전달분자(cell-signaling molecule)로 생체조직에서 중요한 역할을 담당한다. 혈관계통에서는 혈관을 이완시킴으로서 혈류속도를 조절하며,<sup>27,28</sup> 면역계통에서는 큰 포식세포의 방어 체계에 중요한 역할을 하고,<sup>36</sup> 신경 전달에 있어서는 guanylate cyclase (GC)를 활성화시켜서 intercellular messenger 중 하나인 cGMP의 양을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>32</sup> 하지만 NO의 과량 생산은 세포 손상에 결정적 원인으로 생각되어지고 있다.

시자극전달과정에서는 그 매개체로 cGMP가 매우 중요하다.<sup>31</sup> 또한 시세포에는 망막의 다른 종류의 세포보다도 많은 NOS와 CNG channel을 가지고 있다.<sup>31</sup> 즉 시세포에 과량의 L-arginine이 들어가게 되면 과량의 NO 형성과 더불어 cGMP가 축적되므로 계속적으로 ion channel이 개방될 수 있다. 본 연구 결과 L-arginine이 NO와 cGMP 모두를 증가시키는 것으로 조사되었다. 그리고 nonspecific NOS inhibitor (NMMA)와 CNG channel blocker (amiloride)는 실제로 세포사멸을 방어하였다. 따라서 L-arginine의 망막세포에서 독성을 나타내는 기전이 NO의 작용에 밀접하게 관여했음을 알 수 있을 뿐 아니라 시세포에 독성이 나타나는 이유를 설명할 수 있다.

정상적인 세포활동에서 NO는 시세포에서 크게 2가지 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하나는 빛에 반응한 생리반응 매개, 또 하나는 시세포에서 bipolar 세포와 horizontal 세포로의 synaptic transmission 조절이다.<sup>37</sup> 면역화학적 연구와 생화학적 연구를 통해서 NOS의 활성이 간체 내절(rod inner segment)에서 주로 나타난다는 것이 밝혀져 있다.<sup>38</sup> NO의 target 효소인 GC는 NOS와 매우 근접해서 존재한다. 분리된 개구리 간체세포에서 NO의 제공자인 SNP (sodium nitroprusside)를 첨가해서 NO를 증가시켜 cGMP의 증가 및 빛에 대한 반응 연구를 수행한 논문이 발표된 적이 있다.<sup>39</sup> 이것은 NO-sensitive GC가 시세포 안에 존재한다는 것을 시사한다. 지금까지 GC는 크게 soluble form과 particulate form 2가지 형태가 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>40</sup> 이 두 가지 형태의 효소는 모두 망막에 존재한다. Particulate GC는 세포막에 붙어 있으며 세포질 안쪽에 guanylate catalytic domain을 갖고, extracellular domain은 receptor-like ligand binding activity를 갖는다. 이 particulate GC는 간체 시세포에서 다른 형태의 GC에 비해 다량 존재한다.<sup>41,42</sup> 또한 particulate GC는 NO insensitivity를 나타내는 큰 특징을 갖고 있다. 반면 rod 세포는 세포질에 존재하는 soluble GC를 갖고 있다.<sup>43</sup> Soluble GC는 망막 전체에서 발견된다. 이 soluble GC는 70과 82 kDa subunit으로 구성된 heterodimer인데, subunit 사이에 heme group이 존재해서 NO 혹은 oxygen radical과 반응하여 활성화되는 것으로 알려져 있다.<sup>44</sup>

NO의 독성기전으로는 NO의 대사산물들을 reactive nitrogen species (RNS)라 불리는 물질

(대표적 물질; peroxynitrite)의 작용으로 알려져 있다. 이런 물질의 작용은 궁극적으로 대부분의 biomolecules들의 oxidation, nitration (addition of  $\text{NO}_2$ ), nitrosation (addition of  $\text{NO}^+$ ), nitrosylation (NO)을 유도하며 이것이 세포독성과 관계한다.<sup>45</sup> 그런데 본 연구에서는 이런 RNS 반응이 아닌 NO에 의해서 증가한 cGMP가 독성과 연관되어 있다는 증거를 제시하고 있다. 중금속인 납에 노출 시 간체 세포의 apoptosis 현상은 납에 의한 cGMP 분해 억제, cGMP 농도의 증가, 이에 따른 calcium 축적의 일련의 기전에 의해 이루어짐이 다른 연구진에 의해서 밝혀진 바 있다.<sup>33,34</sup> 이것은 안구 내에서 cGMP의 과도한 생성이나 축적이 세포사멸로 이어질 수 있음을 시사한다. 비정상적으로 높아진 cGMP는 cGMP에 의해서 개방되는 CNG channel이 풍부히 존재하는 시세포에서는 세포사멸의 중요한 원인이라고 생각되어진다. 그리고 본 연구는 이것을 뒷받침해 줄 수 있는 증거를 제시하고 있다. 또한 NO가 일으킨 세포사멸의 형태는 necrosis와 apoptosis를 함께 거치는 것으로 관찰되었으며, 최근 Park 등<sup>46</sup>은 NO가 독성을 일으킨 각막조직이 TUNEL 양성으로 나타났으나 전자현미경 사진 상 atypical necrosis를 보인다고 하였다.

결론적으로 안구 내에서 조직특성상 L-arginine이 NO-cGMP-CNG channel 개방이라는 과정을 거쳐 독성을 나타내므로, 심혈관 질환에서의 사용 때와는 달리 안과에서 사용되는 제제에 포함시키는 부형제로서 L-arginine은 문제점이 있다고 판단된다. 앞으로 이 연구는 안과치료제 구성물 결정에 있어 크게 참조가 되리라 생각된다.

## V. 결 론

현재 의약품으로 사용되는 r-tPA의 안과에서의 처방 시 일어나는 망막독성의 기전을 알아보기 위해서 흰쥐의 안구로부터 얻은 일차 혼합 배양된 망막세포를 이용하였고, 조직화학적 및 생화학적 방법을 통해서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 시판되는 r-tPA (L-arginine 포함)의 용액(최종농도 2.5 $\mu$ g/0.1 ml)을 흰쥐 안구내 초자체에 주입한 후 조직을 관찰한 결과 외핵층의 세포가 없어진 후 생긴 vacuole들이 관찰되었다. 또한 외핵층과 시세포층이 얇아지거나 소실되었다. TUNEL 염색 결과 외핵층에 존재하는 세포에서 강한 반응을 보였다.

2. 형태학적 관찰에 의해 세포사멸은 시세포에서 주로 관찰되었고, 24시간 이후에 세포사멸 현상은 크게 진행하지 않았으며, L-arginine의 경우 60% 정도의 세포 생존율을 계속해서 유지하였다.

3. r-tPA (L-arginine 포함)가 유도한 세포사멸은 L-arginine과 비교해서 더 크게 일어났으며 조직학적 관찰 결과 신경세포의 synapse 연결에 영향을 주는 것으로 보여졌다.

4. 일차 배양된 망막세포에서 LDH 측정 결과 r-tPA (L-arginine 포함)와 L-arginine은 세포사멸을 유도했으나, tPA 단독으로는 세포사멸을 일으키지 못하였다.

5. 세포사멸은 약물 투여량에 의존함을 보였으며, r-tPA (L-arginine 포함)농도 5와 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l 사이에서 세포사멸의 급격한 변화를 보였고, L-arginine인 경우 최종농도 5.0 mM에서 급격히 세포사멸이 일어났다. 이 L-arginine의 농도는 10 $\mu$ g/400 $\mu$ l의 r-tPA (L-arginine 포함)에 포함된 L-arginine 농도와 일치한다.

6. LDH 측정 및 Hoechst-PI 형광 염색 결과 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine에 의한 세포사멸 형태는 necrosis 및 apoptosis 과정을 모두 보이고 있다.

7. r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine으로 처리된 망막세포들은 대조군에 비해 많은 nitrite (NO<sub>2</sub>)를 발생시켰고, NOS inhibitor인 NMMA에 의해서 세포사멸이 감소됨이 관찰되었다.

8. 면역화학적 방법에 의해 nNOS는 주로 시세포에서 다른 세포보다 많이 발현되고 있었다.

9. r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine은 cGMP의 농도를 증가시켰으나, 배지에 투여된 cGMP에 의해서 세포사멸 현상은 일어나지 않았다.

10. cGMP에 의해서 열리는 CNG channel blocker (amiloride)를 사용한 결과 r-tPA (L-arginine 포함) 및 L-arginine으로 유도된 세포사멸을 막을 수 있었다.

따라서 r-tPA (L-arginine 포함)에 의해 유도된 세포사멸은 대부분 L-arginine에 의한 반응으로 보이며, L-arginine은 망막세포 특히 NOS를 많이 발현하는 시세포에서 NO를 생산하는 기질로 사용되어, 이 NO가 세포 내 GC를 활성화시켜 cGMP의 축적을 유발시키며, 이로 인해 CNG channel의 지속적인 개방현상이 결국 독성을 일으키는 것으로 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Collen D, Lijnen HR. Tissue-type plasminogen activator. Mechanisms of action and thrombolytic properties. *Haemostasis* 1986;16(suppl 3):25-32.
2. Johnson MW, Olsen K, Hernandez E. Tissue plasminogen activator thrombolysis during surgical evacuation of experimental subretinal hemorrhage. *Ophthalmology* 1992;99:515-21.
3. Lewis H. Intraoperative fibrinolysis of submacular hemorrhage with tissue plasminogen activator and surgical drainage. *Am J Ophthalmol* 1994;118:559-68.
4. Kamei M, Tano Y, Maeno T, Ikuno Y, Mitsuda H, Yuasa T. Surgical removal of submacular hemorrhage using tissue plasminogen activator and perfluorocarbon liquid. *Am J Ophthalmol* 1996;121:267-75.
5. Heriot WJ. Further experience in management of submacular hemorrhage with intravitreal tPA. Paper presented at: American Academy of Ophthalmology Vitreoretinal Update; October 24, 1997; San Francisco, Calif.
6. Hassan AS, Johnson MW, Schneiderman TE, Regillo CD, Tornambe PE, Poliner LS, et al. Management of submacular hemorrhage with intravitreal tPA injection and pneumatic displacement. *Ophthalmology* 1999;106:1900-6.
7. Jaffe GJ, Abrams GW, Williams GA, Han DP. Tissue plasminogen activator for postvitrectomy fibrin formation. *Ophthalmology* 1990;97:184-9.
8. Williams DF, Bennett SR, Abrams GW, Han DP, Mieler WF, Jaffe GJ, et al. Low-dose intraocular tissue plasminogen activator for treatment of postvitrectomy fibrin formation. *Am J Ophthalmol* 1990;109:606-7.
9. Lahey JM, Fong DS, Kearney J. Intravitreal tissue plasminogen activator for acute central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30:427-34.
10. Folk JC, Hershey JM, Rivers MB. Lack of effectiveness of tissue plasminogen activator or more days after vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 1991;109:614.
11. Dabbs CK, Aaberg TM, Aguilar HE, Sternberg P Jr, Meredith TA, Ward AR. Complications of tissue plasminogen activator therapy after vitrectomy for diabetes. *Am J Ophthalmol* 1990;110:354-60.
12. Williams GA, Lambrou FH, Jaffe GJ, Snyder RW, Green GD, Devenyi RG, et al. Treatment of post-vitrectomy fibrin formation with intraocular tissue plasminogen activator. *Arch Ophthalmol* 1988;106:1055-8.
13. Williams DF, Bennett SR, Abrams GW, Han DP, Mieler WF, Jaffe GJ, et al. Low-dose intraocular tissue plasminogen activator for treatment of postvitrectomy fibrin formation. *Am J Ophthalmol* 1990;109:606-7.
14. Irvine WD, Johnson MW, Hernandez E, Olsen KR. Retinal toxicity of human tissue plasmi-

- nogen activator in vitrectomized rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 1991;109:718-22.
15. Hrach CJ, Johnson MW, Hassan AS, Lei B, Sieving PA, Elnor VM. Retinal toxicity of commercial intravitreal tissue plasminogen activator solution in cat eyes. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:659-63.
  16. Johnson MW, Olsen KR, Hernandez E, Johnson RN. Retinal toxicity of recombinant tissue plasminogen activator in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1990;108:259-63.
  17. Loewenstein A, Zemel E, Lazar M, Perlman I. Drug-induced retinal toxicity in albino rabbits: the effects of imipenem and aztreonam. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3466-76.
  18. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Res Commn* 1993;18: 195-9.
  19. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, et al. Extensive nitration of protein tyrosines observed in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994;375:81-8.
  20. Kerwin Jr. JF, Lancaster JR, Feldman PL. Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995;38:4342-62.
  21. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxides synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995;57:707-36.
  22. Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
  23. Suzuki S, Kassell NF, Lee KS. Hemin activation of an inducible isoform of nitric oxide synthase in vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg* 1995;83:862-6.
  24. Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993;75:1273-86.
  25. Park C-S, Pardhasaradhi K, Gianotti C, Villegas E, Krishna G. Human retina expresses both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;205:85-91.
  26. Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey KA, Barnes S. Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* 1994;13:315-24.
  27. Deussen A, Sonntag M, Vogel R. L-arginine-derived nitric oxide: A major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* 1993;57:129-34.
  28. Wienke AK, Nilsson H, Nielson PJ, Nyborg NC. Nonadrenergic noncholinergic vasodilation in bovine ciliary artery involves CGRP and neurogenic nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3268-77.
  29. Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Smith SR, Petrash JM, Misko TP, et al. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-production formation. *Diabetes* 1993;42:221-32.
  30. Koch KW. Biochemical mechanism of light adaptation in vertebrate photoreceptors. *Trends Biochem Sci* 1992;17:307-11.

31. Kramer RH, Molokanova E. Modulation of cyclic-nucleotide-gated channels and regulation of vertebrate phototransduction. *J Exp Biol* 2001;204:2921-31.
32. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 1987;39:163-96.
33. Fox DA, He L, Poblenz AT, Medrano CJ, Blocker YS, Srivastava D. Lead-induced alteration in retinal cGMP phosphodiesterase trigger calcium overload, mitochondrial dysfunction and rod photoreceptor apoptosis. *Toxicol Lett* 1998;102-103:359-61.
34. Fox DA, Srivastava D. Molecular mechanism of the lead-induced inhibition of rod cGMP phosphodiesterase. *Toxicol Lett* 1995;82-83:263-70.
35. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994;14:5147-59.
36. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase: Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1849-57.
37. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: A review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 1996;36:2979-94.
38. Koch K-W, Lambrecht H-G, Haberecht M, Redburn D, Schmidt HHHW. Functional coupling of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J* 1994;13:3312-20.
39. Schmidt KF, Noll GN, Yamamoto Y. Sodium nitroprusside alters dark voltage and light responses in isolated retinal rods during whole-cell recording. *Vis Neurosci* 1992;9:205-9.
40. Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: Regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:153-75.
41. Ahmad I, Barnstable CJ. Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. *Exp Eye Res* 1993;56:51-62.
42. Horio Y, Murad F. Solubilization of guanylate cyclase from bovine rod outer segments and effects of lowering  $Ca^{2+}$  and nitro compounds. *J Biol Chem* 1991;266:3411-5.
43. Margulis A, Sharma RK, Sitaramayya A. Nitroprusside-sensitive and insensitive guanylate cyclases in retinal outer rod segments. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;185:909-14.
44. Ignarro LJ. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: A unique transduction mechanism for transcellular signalling. *Pharmacol Toxicol* 1990;67:1-7.
45. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:385-400.
46. Park GS, Kwon NS, Kim YM, Kim JC. The role of nitric oxide in ocular surface diseases. *Korean J Ophthalmol* 2001;15:59-66.

## Abstract

### A study of retinal toxicity of L-arginine contained in r-tPA

In Chung

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Oh Woong Kwon)

Tissue plasminogen activator (tPA) is a thrombolytic agent that activates plasminogen into plasmin almost exclusively in the presence of fibrin. Intravitreal injection of commercial recombinant tPA (r-tPA) has been proposed to be promising for the treatment of vitreoretinal diseases, such as vitreous hemorrhage, postvitrectomy fibrin formation, submacular hemorrhage, retinal vascular occlusive disorders, suprachoroidal hemorrhage and endophthalmitis. However, the safety of r-tPA in the eye has not been proved yet. It has been recently reported that intravitreal injection of r-tPA solution (with L-arginine) results in dose-dependent retinal toxicity in cat eyes. The amount of L-arginine in r-tPA solution is 3.5 g L-arginine/100 mg Alteplase. L-arginine contained in r-tPA, may have toxic effect to the neural tissue of retina, because L-arginine is a precursor of nitric oxide (NO). NO is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS). This enzyme has three isoforms, which are expressed in the retina. The toxicity of r-tPA and L-arginine was investigated using the primary culture of mouse retinal cells. The concentration of r-tPA (with L-arginine) was 1, 5, 10  $\mu$ g/400  $\mu$ l and that of L-arginine was 0.5, 2.5, 5.0 mM. Ten  $\mu$ g/400  $\mu$ l of r-tPA (with L-arginine) and 5.0 mM of L-arginine resulted in cell death in 24 hours after the treatment. But cell death did not progress more than 40~60% at 3 days after the treatment. The pathological and immunohistochemical study showed that the majority of dead cells were photoreceptors. But, tPA (without L-arginine) didn't have toxic effect on retinal cells. The type of retinal cell death induced by r-tPA (with L-arginine) and L-arginine was apoptosis and necrosis. Nitrite and cGMP were increased in cultured retinal cells treated with r-tPA (with L-arginine) and L-arginine as compared to the control. The protection effects of NMMA (NOS inhibitor) and amiloride (CNG channel blocker) from retinal toxicity of L-arginine were assessed. This study demonstrates that L-arginine contained in commercial r-tPA induced retinal toxicity and the mechanism of retinal toxicity was accumulation of cGMP and opening the CNG channel.

---

Key Words: tPA, L-arginine, photoreceptor, apoptosis, NO, NOS, cGMP, CNG channel