고농도 포도당이 섬유주세포의 세포고사와 세포노화에 미치는 영향

Effect of High Glucose on the Apoptosis and Senescence of Trabecular Meshwork Cells

장 비, 김재우

Bee Chang, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

목적: 섬유주세포에서 고농도 포도당이 세포고사와 세포노화에 미치는 영향에 대해서 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포를 일차배양한 후 저농도(5 mM)와 고농도(22 mM)의 포도당을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 각각 1주일간 배양한 후 세포생존을 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였으며, 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 annexin-propidium iodide 이중염색을 한 후 유세포 분석을 시행하였으며, 세포노화의 정도를 알아보기 위하여 SA-β-galactosidase염색을 실시하였다. 이때 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 N-acetyl cysteine (NAC)에도 함께 노출시켰다.

결과: 고농도 포도당은 저농도 포도당에 비하여 섬유주세포의 증식을 증가시켰으며 섬유주 세포의 고사와 노화를 유의하게 증가시켰다 ($p < 0.05$). 고농도 포도당에 의하여 유도된 섬유주세포의 고사와 세포노화는 항산화제인 NAC에 의해 감소되었다.

결론: 섬유주세포에서 고농도 포도당은 저농도 포도당에 비해 세포고사와 세포노화를 증가시켰으며 이는 항산화제에 의해 감소될 수 있을 것이다.

Key words: Apoptosis, Cellular senescence, Glucose, Trabecular meshwork

서 론

원발 개방각녹내장은 섬유주의 기능저하로 인해 방수유출로의 저항이 증가되어 안압이 상승하여 발생하며 섬유주를 구성하고 있는 섬유주세포는 방수유출의 조절에 능동적으로 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁻³ 섬유주를 통한 방수유출을 조절함에 있어서 일산화질소 같은 자유유리기가 중요한 역할을 하는데, 녹내장의 경우 일산화질소의 생성저하에 의하여 섬유주를 수축시켜 안압을 상승시킬 수 있으며, 활성산소종의 생성에 의한 산화스트레스에 의해 섬유주의 손상을 유발할 수 있다.⁴⁻⁸

활성산소종은 산화스트레스를 유발하여 인체의 노화를 유발하는 주요한 요인으로 알려져 있으며⁹ 녹내장의 경우에도 산화스트레스는 섬유주세포의 손상을 유발하며 안압 상승과 시야손상의 정도가 섬유주에서의 산화스트레스에 의한 핵산의 손상 정도와 비례하는 것으로도 알려져 있다.¹⁰ 혈관내피세포의 경우 고농도의 포도당에 노출되면 nitric oxide의 생성이 저하되며¹¹ 산화스트레스가 유발되는 것으로 알려져 있다.¹² 당뇨병이 있는 경우 녹내장이 발병할 위험이 높은 것으로 알려져 있고¹³ 당뇨병이 있는 환자의 방수에서의 포도당 농도가 정상인에 비해 약 2배 정도 높다고 보고되어 있다.¹⁴

섬유주세포에서도 고농도의 포도당이 활성산소종의 생성을 유발하여 산화스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있으므로^{15,16} 이에 따라 고농도 포도당이 섬유주세포의 생존에 영향을 미쳐 세포고사를 유발하거나 세포노화를 촉진시킬 수 있을 것으로 생각되나 인체의 섬유주세포에서 고농도 포도당이 세포고사와 세포노화에 미치는 영향에 관해서는 아직 자세히 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 인체의 섬유주세포를 배양하여 고농도의 포도

Received: 2018. 3. 4.

Revised: 2018. 4. 13.

Accepted: 2018. 4. 25.

Corresponding Author: Jae Woo Kim, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine, #33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 42472, Korea
Tel: +82-53-650-4728, Fax: +82-53-627-0133

E-mail: jwkim@cu.ac.kr

당이 섬유주세포의 세포고사와 노화를 유발하는지에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양

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

약물 처리

배양접시의 각 well에 일차배양한 섬유주세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 통상적인 세포배양액에 포함된 저농도의 포도당(5 mM)과 고농도의 포도당(25 mM)을 각각 포함한 DMEM 배지에 1% 우태아혈청을 첨가하여 일주일간 배양하였다. 이때 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 50 µM의 N-acetyl cysteine (NAC; Sigma)에도 함께 노출시켰다.

MTT Assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 발색검사법의 일종인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) assay¹⁷를 이용하였다. MTT assay는 일주일간 고농도와 저농도의 포도당에 각각 노출시킨 후 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 µL씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200 µL씩 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG labtech, Offenber, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물 처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

Annexin-propidium iodide (PI) 이중염색을 이용한 유세포 분석

세포고사의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 상용의 kit (TACS Annexin V-FITC apoptosis detection kit, R & D systems, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 annexin-V와 PI로 이중염색을 한 후 유세포 분석을 시행하였다. 트립신 처리한 세포를 원심분리한 후 차가운 염료용액으로 세척한 다음 5 µL의 annexin V와 1 µL의 PI를 100 µL의 세포부유액에 넣은 후 상온에서 15분간 배양하였다. 그 다음 400 µL의 완충액으로 부드럽게 섞은 후 유세포분석기(Gallios, Beckam Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 fluorescence emission 530 nm와 575 nm 이상의 파장에서 유세포 분석을 시행하였다.

세포노화의 측정

세포의 노화를 측정하기 위하여 노화된 세포의 특징인 β -galactosidase의 활성 정도를 상용의 senescence-associated β -galactosidase kit (SA- β -gal; Sigma)를 이용하였다. SA- β -gal은 노화과정에서 나타나는 비정상적인 효소의 활성도를 측정하는데 이용된다. SA- β -gal 염색액을 추가하여 두 시간 동안 배양한 후 현미경에 격자가 있는 둥근 광학유리를 부착하여 각 영역마다의 세포수를 세어 푸르게 염색된 노화된 세포수와 전체 세포의 수를 세어 퍼센트로 계산하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 3회 이상 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 저농도 포도당과 고농도 포도당을 각각 대조군과 실험군으로 하여 시행하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였고 유의수준은 0.05% 이하로 정하였다.

결 과

세포배양

초대배양 2주째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 특징적인 형태학적인 양상과 섬유주조직의 이식편 주위에서 위성 양상으로 자라나는 섬유주세포의 특징적인 성장 양상으로 확인하였다.^{18,19}

고농도 포도당이 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

섬유주세포를 고농도 포도당에 7일간 노출시켜 배양하였을 때 저농도 포도당에 노출한 대조군에 비하여 세포의 생존을 증가시켰으며($p < 0.05$) 동시에 처리한 항산화제인 NAC는 이러한 고농

도 포도당에 의한 세포의 증식에 유의한 영향을 미치지 않아 고농도 포도당에 의한 세포증식의 증가는 활성산소종의 생성과 무관함을 알 수 있었다(Fig. 1).

Figure 1. Effect of high glucose (HG) on the proliferation of human trabecular meshwork cells. HG increased cellular proliferation significantly compared to low glucose (LG). Co-exposed 50 μ M N-acetylcysteine (NAC) did not affect on the HG-induced increased cellular proliferation. * $p < 0.05$.

Figure 2. Effect of high glucose (HG) on the induction of apoptosis in primarily cultured human trabecular meshwork cells. HG increased apoptosis significantly compared to low glucose (LG), and the degree of HG-induced apoptosis was decreased by co-exposed 50 μ M N-acetylcysteine (NAC). * $p < 0.05$.

고농도 포도당이 섬유주세포의 세포고사에 미치는 영향

세포고사가 일어나게 되면 세포막의 포스파티딜세린이 노출되게 되는데, annexin-V/PI 이중염색을 시행하면 annexin-V는 세포고사가 일어나는 세포 외막의 포스파티딜세린과 결합하게 되며, 괴사되는 세포는 PI에 염색된다. 따라서 정상적인 살아있는 세포는 annexin-V 음성이면서 PI 음성, 세포고사의 경우 annexin-V에 양성이면서 PI에 음성으로, 그리고 세포괴사(necrosis)의 경우에는 annexin-V에 양성이면서 PI에도 양성으로 나타난다.

고농도 포도당은 저농도 포도당에 노출된 대조군에 비하여 유의하게 세포고사를 증가시켰다($p < 0.05$) (Fig. 2). 한편 고농도 포도당과 항산화제인 NAC에 동시에 노출시킨 경우 세포고사를 유발하는 정도에 있어서 고농도 포도당에 단독으로 노출시킨 경우와 비교하여 세포고사의 정도가 21.7%에서 15.5%로 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

고농도 포도당이 섬유주세포의 노화에 미치는 영향

고농도 포도당이 세포노화에 미치는 영향을 알기 위해 SA- β -gal

Figure 4. Effect of high glucose (HG) on the senescence of human trabecular meshwork cells. HG increased cellular senescence compared to low glucose (LG), which was abolished by co-exposed 50 μ M N-acetylcysteine (NAC). * $p < 0.05$; † $p < 0.05$.

Figure 3. Senescence-associated β -galactosidase staining of trabecular meshwork cells after exposure to low glucose or high glucose. High glucose increased the number of senescent cells, which stained blue (B), compared to low glucose (A) (Magnification, $\times 100$).

염색을 시행하였다. 노화된 세포는 푸르게 염색되는데 고농도 포도당에 노출된 섬유주세포에서 더 많은 세포가 푸르게 염색되었다(Fig. 3). 고농도 포도당은 저농도 포도당에 비하여 세포노화를 유의하게 증가시켰으며($p < 0.05$), 이러한 고농도 포도당에 의한 세포노화의 증가는 항산화제인 NAC에 의하여 감소되어 항산화제가 산화스트레스에 의한 섬유주세포의 노화를 억제할 수 있음을 알 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

섬유주세포는 섬유주를 통한 방수유출을 능동적으로 조절하며 endothelin과 일산화질소 같은 활성산소종이 이에 관련한다고 알려져 있다.³²⁰ 인체의 섬유주세포에서 일산화질소의 생성 감소는 일산화질소의 생리적 활성을 저하시킬 뿐만 아니라 유해한 peroxynitrite와 같은 활성산소종의 생성을 증가시키게 되며²¹ 결과적으로 산화스트레스를 유발하여 섬유주를 손상시킬 수 있다.

고농도 포도당은 망막의 혈관내피세포를 비롯한 다양한 종류의 세포에서 산화스트레스를 유발하는데 섬유주세포에서도 글루코코르티코이드 수용체가 나타나므로²² 고농도 포도당에 노출될 경우 섬유주세포의 산화스트레스를 유발하게 되므로 세포의 생존에 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라 세포고사와 세포노화를 유발할 수 있을 것이다.

이전의 연구의 결과에서 고농도 포도당은 유해한 활성산소종을 생성을 증가시켰으며 항산화제를 함께 노출시켰을 때 활성산소종의 생성이 감소하는 것으로 보아 항산화제가 고농도 포도당에 의한 섬유주세포의 산화스트레스를 억제하여 섬유주를 보호할 수 있을 것이다.^{15,16}

활성산소종은 산화스트레스를 유발하여 섬유주세포의 손상을 유발할 뿐만 아니라 세포의 노화도 초래하는 것으로 알려져 있으므로²³⁻²⁵ 섬유주에서 산화스트레스가 유발될 경우 섬유주세포의 손상과 함께 섬유주세포의 변성을 유발하며 섬유주세포의 생존에도 영향을 주어 세포고사 또는 세포노화를 유발할 가능성이 있으므로 이를 알아보기 위한 본 연구의 결과에 의하면 고농도 포도당에 노출된 경우 섬유주세포의 세포고사와 세포노화가 촉진된 것으로 나타났으므로 이에 따라 증가된 섬유주세포의 세포고사와 세포노화는 섬유주의 기능을 저하시켜 녹내장을 유발하는 요인이 될 수 있을 것이다.²⁶⁻²⁹ 뿐만 아니라 산화스트레스는 섬유주세포에서 myocilin 같은 스트레스반응 표지자를 증가시키는 것으로도 알려져 있다.³⁰ 본 연구의 결과에서 고농도 포도당과 동시에 노출시킨 항산화제가 세포고사를 감소시키며 세포노화를 억제하는 것으로 나타나 이러한 고농도 포도당에 의하여 유도된

세포고사와 세포노화에는 산화스트레스가 관여하는 것임을 알 수 있었으며, 항산화제가 섬유주세포의 기능을 유지하는 역할을 할 수 있음을 보여주고 있다.

따라서 고농도 포도당에 장기간에 걸쳐 섬유주세포가 노출되면 섬유주를 수축시키는 endothelin의 증가에 의하여 방수의 유출이 감소할 뿐만 아니라, 산화스트레스에 의해 섬유주세포가 노화되어 그 기능이 떨어지거나 세포의 소실로 인하여 결과적으로 녹내장을 유발하거나 악화시킬 수 있는 요인이 될 수 있을 것이다.³¹⁻³³ 항산화제는 섬유주세포의 노화를 억제할 수 있는 것으로 나타났으나 본 실험은 배양된 세포를 이용하여 비교적 단기간에 관찰한 결과이므로 임상적으로 적용하기 위해서는 향후 좀 더 자세한 장기간의 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 고농도 포도당은 배양된 사람의 섬유주세포에 대해 섬유주세포의 세포고사와 세포노화를 유발하였으며 항산화제를 사용함으로써 이러한 섬유주세포의 손실을 줄임으로써 섬유주세포를 보호하여 섬유주의 기능을 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

References

1. Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
2. Rohen JW, Lütjen-drecoll E, Flügel C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
3. Alvarado JA, Alvarado RG, Yeh RF, et al. A new insight into the cellular regulation of aqueous outflow: how trabecular meshwork endothelial cells drive a mechanism that regulates the permeability of Schlemm's canal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1500-5.
4. Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and ocular facility in monkeys. *Exp Eye Res* 1994;58:99-105.
5. Wana RF, Podos SM. Effect of the topical application of nitroglycerin on intraocular pressure in normal and glaucomatous monkeys. *Exp Eye Res* 1995;60:337-9.
6. Nathanson JA, McKee M. Alteration of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1774-84.
7. Matsuo T. Basic nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 2000;84:631-5.
8. Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA

- mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:53-63.
9. Saccà SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
 10. Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2005;123:458-63.
 11. Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, et al. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:480-6.
 12. El-Remessy AB, Abou-Mohamed G, Caldwell RW, Caldwell RB. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3135-43.
 13. Becker B. Diabetes and primary open-angle glaucoma. The XXVII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 1971;71(1 Pt 1):1-16.
 14. Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humor glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 1984;39:605-9.
 15. Kim JW, Bae CB, Lee JH. Effect of high glucose on the oxidative stress in trabecular meshwork cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2009;50:1563-8.
 16. Bae CB, Kim JW. Effect of high glucose on the production of reactive oxygen species in trabecular meshwork cells. *J Korean Ophthalmol Soc* 2010;51:418-22.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 18. Polansky JR, Weinreb RN, Baxter JD, Alvarado J. Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:1043-9.
 19. Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
 20. Haefliger IO, Dettman E, Liu R, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999;43 Suppl:S51-8.
 21. Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, et al. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 1998;47:945-52.
 22. Weinreb RN, Bloom E, Baxter JD, et al. Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;21:403-7.
 23. Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
 24. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 11):2417-26.
 25. von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann NY Acad Sci* 2000;908:99-110.
 26. Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye (Lond)* 1987;1(Pt 1):204-10.
 27. Tsuyoshi Sato T, Roy S. Effect of High Glucose on Fibronectin Expression and Cell Proliferation in Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:170-75.
 28. Schachtschabel DO, Binninger E. Aging of trabecular meshwork cells of the human eye in vitro. *Z Gerontol* 1990;23:133-5.
 29. Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RC. Age-related changes in protein profiles of the normal human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 1987;45:623-31.
 30. Horstmann HJ, Rohen JW, Sames K. Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Ageing Dev* 1983;21:121-36.
 31. Park JY, Takahara N, Gabriele A, et al. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 2000;49:1239-48.
 32. Chen JZ, Kadlubar FF. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 2003;114:697-8.
 33. Wordinger RJ, Clark AF. Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 1999;5:629-67.