[UCI]I804:24011-200000231709

망막색소상피세포에서 산화성 스트레스에 의한 MMP-2 분비의 촉진

Oxidative Stress Stimulates MMP-2 Secretion In Human Retinal Pigment Epithelial Cells

2004年 8月 20日

조선대학교

100284534 2004-10-15

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 광 우

망막색소상피세포에서 산화성 스트레스에 의한 MMP-2 분비의 촉진

지도교수 최 광 주

이 논문을 의학석사학위 논문으로 제출함

2004年 4月 16日

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 광 우

김 광 우의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 용 (인)

위원 조선대학교 교수 양 남 웅 (인)

위원 조선대학교 교수 최 광 주 (인)

2004년 5월 31일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

LIST OF TABLES ····· ii
LIST OF FIGURES ····· iii
ABSTRACT ····· iv

Ⅰ 서 론 ····· 1

Ⅱ 실험대상 및 방법 ····· 3

Ⅲ 결 과 ····· 7

Ⅳ 고 찰 ····· 9

Ⅴ 참 고 문 헌 ····· 11

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sequences used for PCR ····· 15
Table 2. PCR conditions of MMP-2, MMP-9 and β-actin ····· 16

LIST OF FIGURES

Figure 1. Human retinal pigment epithelial cell, ARPE-19 mortality according to various concentrations of paraquat ····· 17

Figure 2. Flow cytometric analysis for induction and inhibition of oxidative stress. The oxidative stress is induced according to the concentrations of paraquat (A). Antioxidant, N-acetyl cysteine blocks the oxidative stress (B). ····· 18

Figure 3. Stimulation of MMP-2 secretion in ARPE-19 under oxidative stress induced by paraquat. MMP-2 expression is significantly increased in ARPE-19 by paraquat in RT-PCR (A) and MMP-2 production is significantly increased in zymography (B). ····· 19

Figure 4. Blocking of stimulation of MMP-2 secretion in ARPE-19 under the oxidative stress by addition of antioxidant, N-acetyl cysteine. MMP-2 expression in ARPE-19 is decreased in RT-PCR (A) and MMP-2 production decreased in zymography (B). ····· 20

ABSTRACT

Oxidative Stress Stimulates MMP-2 Secretion In Human Retinal Pigment Epithelial Cells

Gwang-Woo Kim
Advisor : Prof. Gwang-Joo Choi, Ph.D., M.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Purpose: To evaluate mechanism macular neovascularization in age-related macular degeneration (AMD), we examinated whether or not human retinal pigment epithelial cells, ARPE-19, secret angiogenic factors including Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) under oxidative stress induced by paraquat(PQ)

Methods: ARPE-19 cells were exposed to PQ for 72 hours and then assayed for mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 by

reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The culture free medium was assayed for protein production of MMP-2 and MMP-9 by Gelatin zymography. And the effect of antioxidant, N-acetyl cysteine (NAC) on the oxidative stressed - ARPE-19 cells was measured.

Results: MMP-2 secretion was increased in the oxidative stress group compared with the control but the increase of secretion was blocked by mixing NAC with PQ.

Conclusion: Oxidative stress stimulates MMP-2 secretion in the cultured human retinal pigment epithelial cells, which could be helpful to understand the mechanism of neovascularization in AMD.

I 서 론

Age-related macular degeneration (AMD)은 황반의 퇴행성 망막변성 질환으로서 서구 유럽에서는 노인의 심각한 시야 손실과 실명을 일으키는 주요한 안저 질환으로 알려져 있다 (Klein R. et al., 1995; Evans J. et al., 1996). AMD의 병인은 나이가 증가됨에 따라 망막 색소 상피에 가해진 산화성 스트레스의 증가와 관련된다고 알려져 있다 (Beatty S. et al., 2000; Cai J. et al., 2000).

망막 색소상피세포는 망막의 광수용체와 맥락막 모세혈관 사이에 있는 세포인데 생리적으로 광수용체의 영양공급과 대사물질의 배출 및 세포탈락물의 탐식 등의 시력유지에 중요한 작용을 한다고 알려져 있다 (Schraermeyer U. et al., 1999). 이러한 망막색소 상피세포는 특히 산소의 이용이 많은 까닭에 나이가 증가됨에 따라 산화성 스트레스에 더 많이 노출되어 산소 유리기를 방출 한다 (Cai J. et al., 2000). 이러한 산화성 스트레스는 또한 혈관신생을 촉진한다고 알려져 있다 (Maulik N, et al., 2002).

혈관신생은 원래 존재하던 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 자라나는 여러 단계의 과정을 의미하는 데, 맥락막 혈관신생 (choroidal neovascularization)은 삼출성 변성에 의한 AMD의 중요한 조직학적 소견으로 알려져 있다. 이때 맥락막 혈관신생은 맥락막 혈관으로부터 시작되어 부르크 막을 지나서 망막색소상피하의 공간까지 자라 들어온다. 이때 맥락막 혈관신생은 부르크 막과 망막색소상피세포의 분리를 촉진하여 결국 환자의 실명을 초래하게 된다 (Green WR. et al., 1993; Chang TS. et al., 1994). 이러한 맥락막 혈관신생의 과정은 다음과 같은 몇 가지 인자가 관련되는 것으로 알려져 있다. 즉 혈관

내피세포의 증식과 이동을 야기하는 혈관신생 촉진인자인 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)와 basic fibroblast growth factor(bFGF)와 또 다른 혈관신생 촉진 인자로는 세포외 기질을 분해할 수 있는 Matrix Metalloproteinase (MMPs)가 알려져 있다 (Steen B. et al., 1998).

VEGF가 혈관신생에서 중요한 혈관 생성 촉진인자이지만, 실제 VEGF 단독으로는 맥락막 혈관이 브루크 막을 통과하여 망막하의 공간으로 자라 들어오는 것을 야기할 수 없는 것으로 보고 되었다 (Schwesinger C. et al., 2001).

MMP-2, 그리고 MMP-9은 혈관 내피세포의 이동을 쉽게 하는 콜라겐 IV형을 포함하여 세포외 기질을 분해하는 것으로 알려져 있다 (Pepper MS. 2001; Migantti P. et al., 1996).

망막 색소상피는 MMPs의 분비에 대한 조절 기능을 가지고 있으며 결국 맥락막 혈관신생을 야기할 수 있다고 보고 되여 있다 (Plantner JJ. et al., 1998; Guo L. et al., 1999). 또한 산화성 스트레스는 심장의 섬유아세포 (cardiac fibroblasts)에서 MMP 활성의 조절에서 중요한 작용을 하고 있다고 알려져 있다 (Myocardial Biology Unit, et al., 2001). 그러나 산화성 스트레스에 노출된 망막 색소상피세포에서 MMP의 분비와 생산을 확인 보고한 연구는 아직 없다.

따라서 본 연구에서는 망막 색소상피에서 산화성 스트레스에 의한 여러 가지 변화 중에서 혈관형성에 참여하는 MMP-2와 MMP-9의 분비를 조사하여 산화스트레스와 황반변성의 인과관계를 대하여 밝혀 보고자 하였다.

Ⅱ 실험대상 및 방법

1. 세포주 배양

망막 색소상피세포주 [ARPE-19; ATCC No. CRL-2302]를 5% CO_2 와 습윤화된 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 56℃에서 30분간 열처리한 FBS (GibcoBRL) 10%와 항생제(antibiotic-antimycotic, GibcoBRL)를 함유한 DMEM:F-12 (1:1) 배지 (GibcoBRL)를 사용하였다. 세포를 저장하고자 할 때는 FBS 23.5%, DMSO (Sigma) 10%, DMEM:F-12 (1:1) 배양액 66.5%를 혼합한 세포동결배지에 넣어 액체 질소에 보관하였다. (Grout B. et al. 1990).

2. 산화성 스트레스의 유발 및 시료의 획득

하룻밤 배양한 1×10^5 cell/3㎖의 망막 색소상피세포주에 여러 농도의 paraquat (PQ, Sigma)를 각각 가하고 다시 72시간을 배양하였다. 항산화제로는 N-acetylcysteine (NAC, Sigma)을 사용하였다.

항산화제의 효과는 PQ를 먼저 처리 후 곧 바로 항산화제를 처리하였으며 역시 72시간을 배양하였다. 72시간 배양 후 배지를 serum free media로 교체하고 72시간 배양하였다. 배양 후 PBS (GibcoBRL)로 1-2회 세척한 뒤 세포를 모아 TRIzol (Invitrogen) method로 RNA를 추출하고 역전사중합효소반응(RT-PCR)을 시행하였다. 세포의 배지인 serum free media를 취하여 Gelatin zymography를 시행하였다.

3. 세포활성도 검사

본 실험에서는 Pieters(1988) 등의 방법을 사용하여 세포활성도를

측정하였다. 96 well microplate (Falcon)에 $0.5x10^4$ cell/ml의 망막상피세포 부유액 90 ㎕씩을 각각 넣었다. 그리고 18 시간 후에 측정하고자 하는 PQ를 농도별로 10 ㎕씩 넣고 이때 약물대신 PBS를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 잘 흔든 후 3 일간 CO_2 배양기에서 배양한 후 모든 well에 MTT 용액(5 mg/ml PBS, Sigma) 10 ㎕를 가해주고 다시 37℃, 5% CO_2에서 4-5 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에서 80 μL씩 버린 다음 150 ㎕ DMSO (Sigma)를 넣고 10 min동안 Shaking해서 생성된 formazan 결정을 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포내 반응성 산소유리기의 측정

$1x10^5$ cell/ml의 망막 상피세포를 측정하고자 하는 PQ 200 μM, 500 μM 과 1 μM의 DCFH-DA 투여 후 37℃에서 2 시간 동안 5% CO_2 와 습윤화된 배양기에서 배양 후 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 형광강도를 측정하였다 (Higgins GT. et al., 2003) (FACSCa- libur, Becto Diskison). 항산화제의 oxidative stress 억제기능은 세포를 $1x10^5$ cell/ml로 도포한 후 NAC을 30 분 동안 preincubation 한 후 PQ와 1 μM의 DCFH를 함께 처치한 후 2 시간 동안 반응시킨 후 동일한 파장에서 측정하였다.

5. 산화성 스트레스에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현의 측정

약물 처리한 후 모은 세포를 TRIzol Reagent (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. First strand cDNA를 oligo dT, Tris-HCl (pH 8.4), KCl, MgCl2, dNTP, DTT (GibcoBRL)와

MMLV reverse transcriptase (GibcoBRL)가 함유된 20 ㎕의 용액에서 총 RNA 1 ㎍으로부터 합성하였다. 얻은 cDNA를 RNasin (Promega)을 처리하고 나서 secondary PCR을 진행하였다. PCR은 1×PCR 완충액(Tris-HCl pH 8.3, KCl, MgCl2)에 cDNA, 각각의 primers, dNTP와 *taq* DNA polymerase (Perkin Elmer)가 함유된 반응액에서 시행한다. PCR 산물을 전기영동한 다음 염색 후 확인하였다.

6.산화성 스트레스에 의한 MMP-2와 MMP-9의 생산의 측정

약물처리해서 얻은 serum free media를 72시간 처리한 다음 모아 단백질 정량 후 Gelatin zymography를 시행하였다. 10%의 SDS-PAGE gel[Sol A(30% acrylamide 0.8% bis-dimethylacrylamide) 4 ㎖, Sol B(1.5M Tris-HCl pH8.3, 0.4% SDS) 2.5 ㎖, third D/W 2.44 ㎖ 10% APS 40 ㎕, TEMED 20 ㎕]에 Gelatin을 1 mg/ml수준으로 첨가하여 Separating Gel로 사용하였고 5% SDS-PAGE gel(Sol A 0.67 ㎖, Sol C 1 ㎖, third D/W 2.3 ㎖, APS 20 ㎕, TEMED 10 ㎕)을 stacking gel로 사용하였다. 전압이 100-200V에서 전기영동을 끝내고 나서 2.5% Triton X-100를 이용하여 30 분 내외 세척하고 나서 incubation buffer에 넣고 37℃에서 18 시간 좌우 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Brilliant Blue staining 방법으로 반응 여부를 확인하였다. 분자량에 따라서 72 kD의 pro-MMP-2와 92 kD의 pro-MMP-9을 분별하였다.

7. 항산화제에 의한 MMP-2와 MMP-9의 분비의 측정

항산화제로는 NAC을 사용하였으며 혈관형성 활성인자의 검출은 RT-PCR과 Gelatin zymography를 이용하여 동일한 방법으로 검출

하였다.

8. 통 계 분 석

실험 결과는 평균±표준편차 형태로 나타내며 통계적인 분석은 SPSS program으로 Kruskal-wallis test를 이용하였다. $P \leq 0.05$인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ 결 과

1. 세포활성도

세포를 죽이지 않으면서 세포 변형을 일으킬 수 있는 적정 PQ의 농도를 조사하였다. PQ 농도가 100 uM인 경우에 세포 생존율이 50% 이상 이였다. PQ 농도가 1000 uM 이상인 경우 세포 생존율이 10% 이하였다 (Fig. 1).

2. 산화성 스트레스 유발 확인

산화제인 PQ가 산화성 스트레스를 유발하는지를 형광강도를 측정하여 알아보았다. 대조군을 100%로 하여 비교하였으며, PQ 농도 의존적으로 반응성 산소유리기의 생성이 증가하였다. 특히 PQ는 200 μM의 농도에서 대조군에 비해 두 배에 가까운 반응성 산소유리기를 생성하였다. 또한 항산화제를 동시에 처치 시에 반응성 산소유리기의 생성은 PQ와 같이 처치 시에 감소하였다 (Fig. 2).

3. PQ에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현

PQ 50 μM, 100 μM, 500 μM을 처리하고 RT-PCR을 시행했을 때 MMP-2는 약물처리 하지 않은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 발현이 증가 하였다 ($P \leq 0.05$). MMP-9은 발현은 되였지만 의미가 없었다 (Fig. 3A).

4. PQ에 의한 MMP-2와 MMP-9의 생산

PQ 50 μM, 100 μM, 500 μM을 처리하고 Gelatin zymography를

시행했을 때 MMP-2는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 생산이 증가 하였다 ($P \leq 0.05$). MMP-9은 대조군에 비하여 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3B).

5. 항산화제에 의한 산화 스트레스 억제효과

PQ 100 μM과 NAC 20 μM을 처리했을 때 RT-PCR 상에서 MMP-2의 발현은 대조군에 비하여 발현이 감소하였다 ($P \leq 0.05$) (Fig. 4A). 동일한 조건에서 배양한 serum free media에서 zymography로써 MMP-2 생산은 대조군에 비하여 생산이 감소하였다 ($P \leq 0.05$) (Fig. 4B).

Ⅳ 고 찰

서구 유럽에서 노인실명의 가장 중요한 요인으로 알려져 있는 AMD는 임상, 조직학적 특징 상 두개 유형으로 나뉜다. 위축성 망막변성은 전체에서 80%를 차지하며, 황반에서의 드루젠 형성, 망막 색소상피의 변성과 광수용체의 파괴되며, 그러나 임상적으로는 중심 시야의 손실이 천천히 진행되는 것이 특징이다 (Young RW. et al., 1987). 두 번째 유형은 삼출성 망막변성으로 AMD 발생의 20%를 차지하지만 삼출성 망막변성의 80-90%에서 실명이 초래되며, 망막 하부종과 임상적으로는 중심시야의 손실이 빨리 유도되는 것이 특징이다 (Leibowitz HM. et al., 1980). 삼출성 망막변성 유형의 경우, 18%만이 레이저 광응고술을 받아서 치료할 수 있으나, 시술 후 재발이 많은 것으로 알려져 있다(Macular photocoagulation study group, 1994).

AMD의 발병 원인 중의 하나는 망막 색소상피의 산화성 스트레스에 의한 손상과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다 (Proctor PH., 1989). 즉 나이가 들면서 받는 산화성 스트레스에 의해서 발생하는 산소 유리기에 의하여 망막 색소 상피세포의 손상이 AMD의 중요한 병인으로 보고 되었다 (Beatty S. et al., 2000). 반응성 산소 유리기는 세포의 정상적인 대사과정이나, 중성구 등 면역세포에서 생성될 수 있고, PQ와 같은 화학물질이나 방사선 조사 등에 의해서도 생성 된다 (Fridovich I., 1986).

저자는 망막 색소상피세포주에 PQ를 사용하여 산화성 스트레스를 가하였으며, PQ에 의한 반응성 산소 유리기의 생성을 유세포분석을 통하여 확인하였다 (Fig. 2). 산화성 스트레스를 받은 망막 색소상

피세포에서 혈관 형성 촉진인자인 MMP-2의 분비의 증가를 확인하였다(Fig. 3). 동시에 산화성 스트레스를 준 세포에 항산화제(NAC)를 처리했을 때 MMP-2의 분비가 감소하는 것도 확인하였다 (Fig. 4).

상기의 결과는 명확히 밝혀지지 않는 AMD의 망막하 신생혈관의 발생의 경우, 산화성 스트레스에 의해서 망막 색소상피세포가 MMP-2의 분비를 촉진하고, 결국 혈관신생을 유발 할 수 있음을 강력히 시사한다. 이러한 결과는 산화성 스트레스를 받은 경우, 망막 색소상피에서 혈관 형성에 관여하는 VEGF, FGF 촉진인자를 분비하여 혈관신생이 가능하였다는 다른 보고와도 일치되는 결과이다 (Ohno-matsui K. et al., 2001; Wada M, et al., 2001).

또한 항산화제에 의한 MMP-2 생산의 감소를 확인해 본 결과는, 항산화제에 의해서 망막 색소상피의 혈관신생 촉진인자의 분비 감소를 통해서 신생혈관이 억제될 수 있음을 알 수 있다. 나아가 적절한 항산화제의 투여가 AMD의 혈관신생을 억제하여 AMD의 발현을 지연시키거나 혹은 AMD 발생을 사전에 예방할 수도 있다고 사료된다.

향후, 산화성 스트레스를 가한 후, 항산화제를 처리한 경우, 망막 색소상피세포에서 MMP-2 뿐만 아니라, 그 외 혈관촉진 인자의 분비의 감소를 확인하여, 항산화제의 혈관신생 억제효과를 좀 더 확증하고자 한다. 즉 이러한 연구를 통해서 AMD의 예방 및 AMD의 진행을 저지하는 약제로서의 항산화제의 가능성을 확인하고자 한다.

V 참 고 문 헌

Beatty S., Koh H., Phil M., Henson D,, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol., 20004; 5:115-134.

Cai J., Nelson KC., Wu M., Sternberg P Jr., Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res., 2000; 19:205.

Chang TS., Freund KB., Cruz Z., Yannuzzi LA., Green WR. Clinicopathologic correlation of choroidal neovascularization demonstrated by indocyanine green angiography in a patient with retention of good vision for almost four years. Retina, 1994; 14:114-24.

Evans J., Wormwald R. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? Br J Ophthalmol, 1996; 80:9-14.

Fridovich I. Bilogical efects of the superoxide radical. Arch Biochem Biphys., 1986; 247:1.

Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. Ophthalmology, 1993; 100:1519-35.

Grout B., Morris J., McLellan M. Cryopreservation and the maintence of cell lines. Trends Biotechnol., 1990; 8:293-7.

Guo L., Hussain AA., Limb GA., Marshall J. Age-dependent variation in metalloproteinase activity of isolated human Bruch's membrane and choroid. Invest Ophthalmol Vis Sci., 1999; 40:2676-2682.

Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell, 1996; 86:353-364.

Higgins GT., Wang JH., Dockery P., Cleary PE., Redmond HP. Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(4):1775-82.

Klein R., Wang Q., Klein BE., Moss CE., Meuer SM. The relationship of age related maculopathy, cataract and glaucoma to visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci., 1995 36:182-191.

Leibowitz HM., Krueger DE., Maunder LR. The Framingham Eye Study Monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973 - 1975. Surv Ophthalmol., 1980; 24;335-609.

Lambert V., Munaut C., Jost M., Noel A., Werb Z., Foidart JM., Rakic JM. Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascu- larization. Am J Pathol., 2002; 161(4):1247-53.

Macular photocoagulation study group. Laser photocoagulation for juxta-foveal choroidal neovascularization. Arch Ophthalmol., 1994; 112: 500-509.

Migantti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein. 1996; 49:117-137.

Maulik N, Das DK: Redox signaling in vascular angiogenesis. Free Radic Biol Med 2002, 33:1047-1060.

Myocardial Biology Unit, Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Massachusetts 02118, USA
Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Jan;280(1):C53-60.

Nakajima-Iijima S., Hamada H., Reddy P., Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. Proc Natl Acad Sci USA., 1985; 82(18):6133-6137.

Ohno-matsui K., Morita I., Tombran-tink J. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factor VEGF and PEDF. J Cell Physiol., 2001; 189(3): 323-33.

Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2001; 21:1104-1117.

Pieters R., Huismans DR., Leyva A., Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. Cancer Lett., 1988; 41(3):323-332.

Plantner JJ., Jiang C., Smine A. Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. Exp Eye Res., 1998; 67:637-645.

Proctor PH. Free radicals and human diseases, In CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine. vol I. Miquiel J., Quintanilha AT. and Weber Heds., CRS Press, Florida., 1989; 209.

Schraermeyer U, Heiman K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. Pigment Cell Res., 1999; 12:129.

Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Joussen AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJK, Redmond TM, Liu S, Adamis AP., D'Amato RJ. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal

pigment epithelium. Am J Pathol., 2001; 158:1161-1172.

Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes.Invest OphthalmolVisSci.1998Oct;39(11):2194-200.

Vince GH,, Wagner S,, Pietsch T,, Klein R,, Goldbrunner RH,, Roosen K,, Tonn JC. Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas, Int J Dev Neurosci., 1999; 7(5-6): 437-45.

Wada M, Gelfman CM, Matsunaga H, Alizadeh M, Morse L, Handa JT, Hjelmeland LM. Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro. Curr Eye Res. 2001 Sep;23(3):226-31.

Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmo. 1987; 131:291-306.

Table 1. Primer sequences used for PCR.

Gene	S&AS[b]	Nucleotide sequences	Length	References[c]
MMP-2	S	5'-TTTCCATTCCGCTTCCAGGGCACAT-3'	253bp	Vince GH, 1999
	AS	5'-TCGCACACCACATCTTTCCGTCACT-3'		
MMP-9	S	5'-GCGCTGGGCTTAGATCATTCCTCA-3'	475bp	Vince GH, 1999
	AS	5'-GCAGCGCGGGCCACTTGTC-3'		
β-actin[a]	S	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	501bp	Nakajimalijima et al., 1985
	AS	5'-GTTGAACTCTCTACATACTTCCG-3'		

[a] PCR control (house keeping gene).

[b] Sense and antisense.

[c] References for primer sequences.

Table 2. PCR conditions of MMP-2, MMP-9 and β-actin.

Gene	Hot start	Dena-turation	Annea-ling	Exten-sion	Cycle	72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에 보관
MMP-2	94℃ 5min	94℃ 30sec	68℃ 30sec	72℃ 45sec	30 cycles	
MMP-9		94℃ 30sec	68℃ 30sec	72℃ 45sec	35 cycles	
β-actin	94℃ 12min	94℃ 30sec	53℃ 30sec	72℃ 1min	25 cycles	

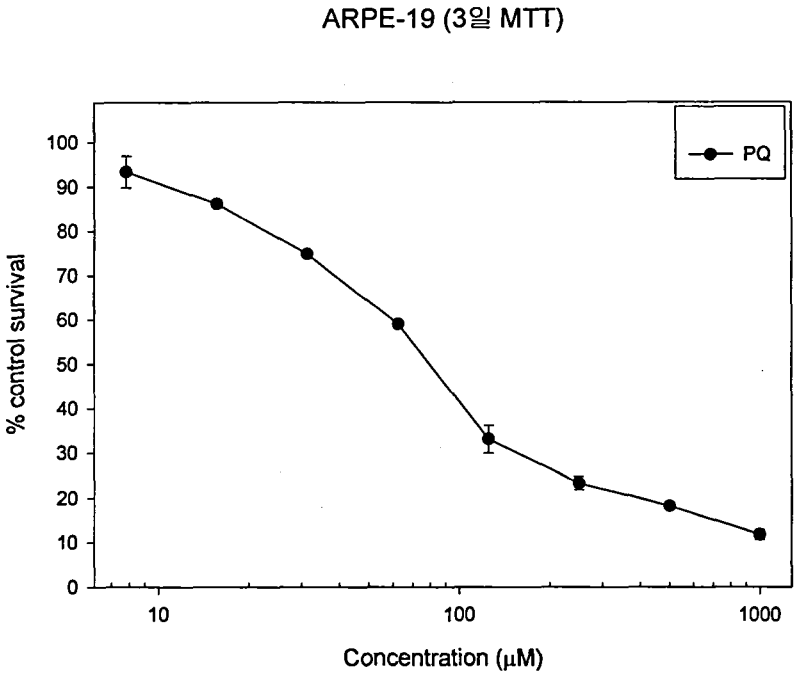

Figure 1. Human retinal pigment epithelial cell, ARPE-19 mortality according to various concentration of paraquat

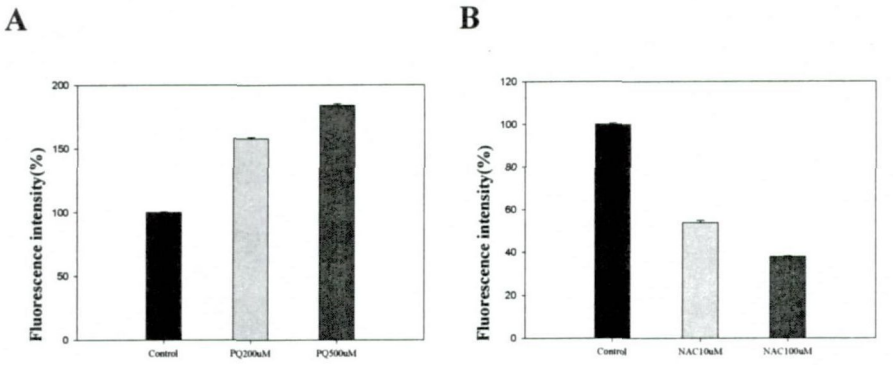

Figure 2. Flow cytometric analysis for induction and inhibition of oxidative stress. The oxidative stress is induced according to the concentrations of paraquat (A). Antioxidant, N-acetylcysteine blocks the oxidative stress (B).

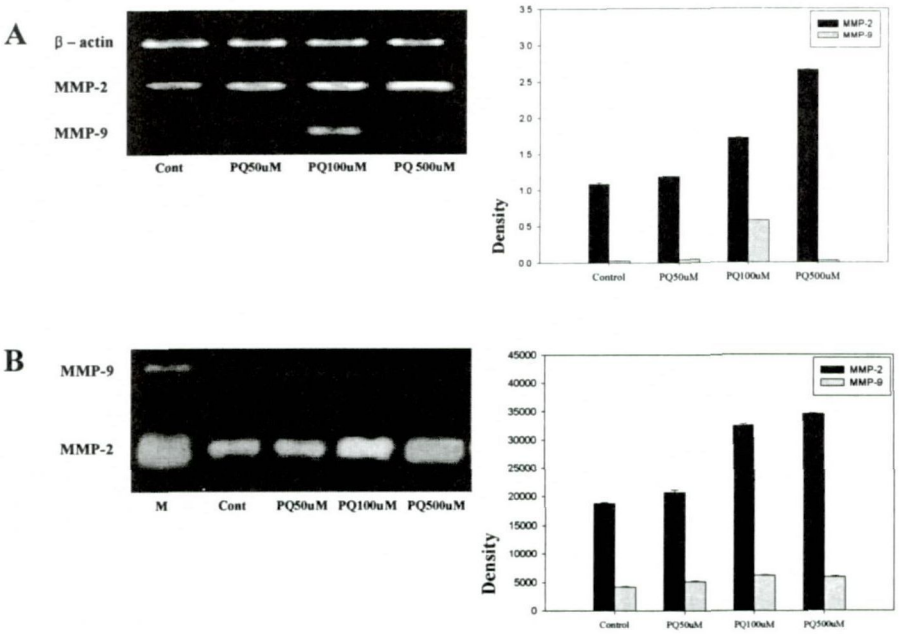

Figure 3. Stimulation of MMP-2 secretion in ARPE-19 under oxidative stress induced by paraquat. MMP-2 expression is significantly increased in ARPE-19 by paraquat in RT-PCR (A) and MMP-2 production is significantly increased in zymography (B).

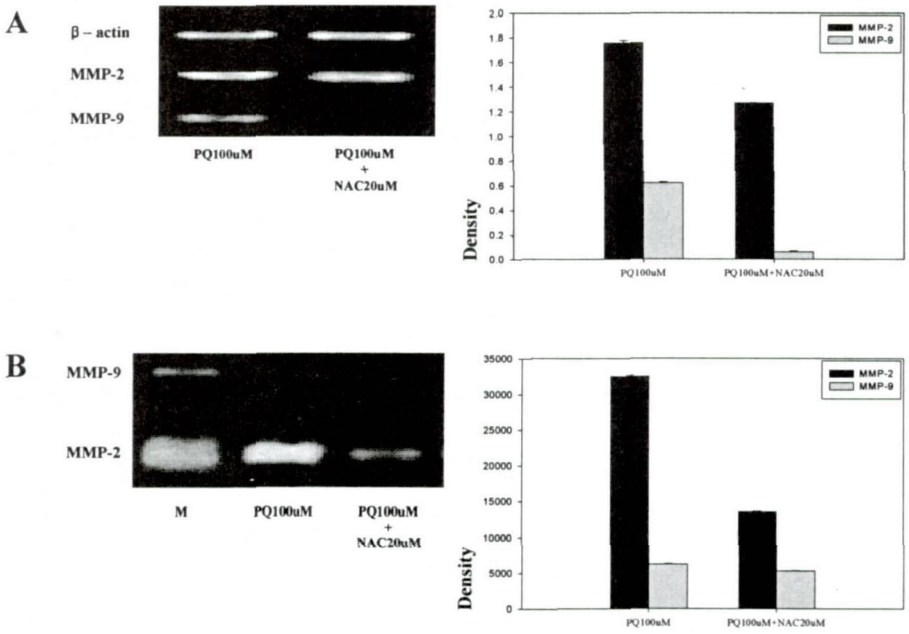

Figure 4. Blocking of stimulation of MMP-2 secretion in ARPE-19 under the oxidative stress by addition of antioxidant, N-acetyl cysteine. MMP-2 expression in ARPE-19 is decreased in RT-PCR (A) and MMP-2 production decreased in zymography (B).

감사의 글

학업의 한 단계를 마무리 하면서 지난 2년 동안 사심 없는 도움과 배려를 주신 많은 분들을 돌이켜 보면서 이 글을 쓰게 됩니다.

지난 2년 동안 격려와 배려, 그리고 가르침을 주신 최광주 교수님께 진심으로 감사를 드리는 바입니다. 또한 제가 논문을 쓸 수 있게 많은 도움을 주신 양남웅 교수님, 마지막 까지 꼼꼼히 논문을 심사해주신 임용교수님께 감사의 말을 드립니다. 그리고 항상 인생의 참뜻을 깨우쳐 주신 지남철 교수님, 김영덕 교수님, 윤태중 교수님 등 많은 안과 동문 교수님들에게 새삼 감사의 글을 올리는 바입니다. 한번 스승은 영원한 스승입니다. 스승님들이 항상 건강하시기를 기원합니다.

지난 유학생활을 항상 저를 지켜주시고 배려해주신 안과 선배님들이 고마웠습니다. 부족한 저를 감싸주시고 항상 가족처럼, 친구처럼 대해주신 안과 선배님들이 앞으로 많은 발전이 있기를 기원하며 또한 조대안과 교실이 더 많은 번영과 발전이 있기를 기원합니다.

여기서 특히 제가 논문을 쓸 수 있게 실험을 가르치신 이영화 선생님께 심심으로 감사를 드리고 싶습니다. 모든 일이 순리롭고 건강하십시오.

지금까지 제게 많은 도움을 주시고 힘이 되신 의대선배인 석홍림 형님, 허성준 형님, 현문호 형님, 이용 형님, 김영호 형님, 호림 형님에게 감사 하며 고향선배인 오성욱 형님, 고춘길 형님에게도 감사의 말을 올리는 바 입니다. 그리고 힘든 유학생활을 서로가 도움이 되면서 걸어온 친구 정길록, 박정국, 김려화, 이홍선, 또 서로의 의지이며 힘이 된 여자친구인 미홍이에게 고맙다는 말을 전합니다.

마지막으로 저를 키워주시고 지켜주신 부모님의 은혜에 큰 절을 올립니다. 자식으로 효도를 하지 못하는 제가 심히 부끄러운 생각이 듭니다. 부모님, 언제나 행복하시고 부디 건강하십시오.

학위논문을 마무리 지으면서

2004. 05. 31