

2008년 8월
석사학위논문

배양망막색소상피세포에서
산화성스트레스에 의한 IL-8의
발현변화

조선대학교 대학원

의 학 과

허 준

배양망막색소상피세포에서
산화성스트레스에 의한 IL-8의
발현변화

Expression of IL-8 in cultured ARPE-19 cells under the
oxidative stress

2008년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

허 준

배양망막색소상피세포에서
산화성스트레스에 의한 IL-8의
발현변화

지도교수 지 남 철

이 논문을 의학석사 학위신청 논문으로 제출함

2008년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

허 준

허준의 석사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	변주남	인
위원	조선대학교	교수	지남철	인
위원	조선대학교	교수	최광주	인

2008년 5월

조선대학교 대학원

목차

서론	1
연구대상 및 방법	2
결과	4
고찰	5
참고문헌	7

도 목 차

Figure 1.	Intracellular reactive oxygen species by flow cytometric analysis using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate .	
	12
Figure 2.	The expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in paraquat-treated ARPE-19 cells.	
	13
Figure 3.	The expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in paraquat and N-acetylcysteine treated ARPE-19 cells.	
	14

Abstract

Expression of IL-8 in cultured ARPE-19 cells under the oxidative stress

Jun Heo

Advisor : Prof. Nam Chul Ji M.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Purpose: To evaluate the expression of Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the cultured ARPE-19 cells.

Methods: ARPE-19 cells were exposed to paraquat for 72 hours and then assayed for mRNA expression of IL-8 and MCP-1 by reverse transcription polymerase chain reaction method. And the effect of antioxidant, N-acetyl cysteine (NAC) on the oxidative stressed - ARPE-19 cells was measured.

Results: IL-8 expression was increased in the oxidative stress group compared with the control, but the increase of expression was blocked by mixing NAC with paraquat.

Conclusion: Oxidative stress stimulates IL-8 expression in the cultured human retinal pigment epithelial cells, which could be helpful to understand the mechanism of neovascularization in age-related macular degeneration.

Key words : Interleukin-8, Monocyte chemoattractant protein-1, N-acetyl cysteine, Oxidative stress, Paraquat

서 론

노인에서 호발하는 황반변성은 망막의 황반부에 발생한 변성으로 서구유럽에서 노인실명의 중요한 원인 중의 하나이다.^{1,2} 노인에서 호발하는 황반변성 중에서 삼출성 황반변성은 망막 또는 망막색소상피 아래에 발생하는 맥락막 신생혈관에서 누출된 삼출물이나 혈액에 의해서 그리고 이러한 병소에서 이차적으로 유발되는 허혈 및 섬유혈관조직에 의한 망막손상으로 시력이 상실된다.³ 혈관신생은 맥락막 혈관으로부터 시작되어 손상된 브루크막을 지나 망막색소상피와 망막 하로 생성, 침범한다.^{4,5}

일반적으로 노화에 따른 황반부를 비롯한 변화는 산화적 손상이 축적된 결과이며^{6,7} 황반변성의 병인도 색소상피나 맥락막 모세혈관에 가해진 산화스트레스와 관련이 있다고 알려져 있다.⁷⁻⁹ 그러나, 산화스트레스에 의한 망막조직의 신생혈관의 생성에 대한 기전에 대해서는 명확히 보고된 바가 아직 없다.

혈관신생은 기존에 있는 모세혈관으로부터 여러 단계를 거쳐 형성된다. 시작 단계는 미세혈관세포가 국소적으로 하방의 기저막과 주위의 세포외 물질을 분해하고, 다음 단계로는 혈관 내피세포가 증식하여 조직으로 이동, 혈관이 생성 된다. 이 과정에 관여하는 성장촉진 인자는 vascular endothelial growth factor(VEGF)가 대표적이며 그 외에도 interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), matrix metalloproteinase (MMPs), basic fibroblast growth factor(bFGF) 등이 있다. 본 저자는 연령의 증가에 따라 호발되는 산화스트레스에 의한 황반변성에 있어 맥락막 신생혈관의 발생에 관여할 것으로 알려져 있는 인자들 중 IL-8 과 MCP-1의 발현변화를 규명하고자 인체배양망막색소상피세포(이하 상피세포)에 paraquat을 가하여 산화스트레스를 유도하고, 이들 세포에서 IL-8과 MCP-1의 발현의 변화를 확인하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 배양

Cell line은 인체망막색소상피세포(이하 색소상피)주(ARPE-19; ATCC No. CRL-2302)를 37°C, 95%air-5% CO₂가 공급되는 습윤화된 배양기에서 배양하였다. 배양액은 56°C에서 30분간 열처리한 FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY U.S.A.) 10%와 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml)과 amphotericin B (1 µg/ml)를 포함한 항생제(antibiotic-antimycotic, Gibco BRL, NY, U.S.A.)를 함유한 DMEM:F-12 (1:1) 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 약물처리

색소상피세포주를 1×10^5 cell/ml 수준으로 배양용기에 배양한 후 산화제로 paraquat(Sigma, St Louis, U.S.A.)를 50, 100, 500µM 농도로 72 시간을 배양하였다. 항산화제로 N-acetylcysteine (NAC)(Sigma, St Louis, U.S.A.)를 사용하였으며 항산화제의 효과를 알아 보기위하여 paraquat와 NAC을 동시에 투여하여 72 시간 배양 후 배지를 serum free media로 교체하고 72 시간 추가배양을 시행하였다.

3. 세포내 반응성산소종의 측정

반응성산소종 생성은 형광탐식자인 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하였다. DCFH-DA는 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며 세포내의 esterase에 의해 비형광인 DCFH로 전환되며 반응성 산소종의 존재 시 형광 DCFH로 전환되는 원리를 이용하여 반응성산소종의 생성을 측정한다. 1×10^5 cell/ml의 망막상피세포를 측정하고자 하는 Paraquat 200 µM, 500 µM 과 1 µM의 DCFH-DA 투여 후 37°C에서 2 시간 동안 5% CO₂와 습윤화된 배양기에서 배양 후 흥분파장 485 nm와 방출파장 530 nm에서 형광강도를 측정하였다.¹⁰ (FACSCalibur, Becton Dickinson). 항산화제의 산화스트레스 억제기능은 세포를 1×10^5 cell/ml로 도포한 후 NAC을 30 분 동안 예비배양한 후 paraquat와 1 µM의 DCFH를 함께 처리한 후 2 시간 동안 반응시킨 다음 동일한 파장에서 측정하였다.¹¹

4. IL-8과 MCP-1의 유전자 발현의 측정

혈관형성관련인자의 발현측정을 위하여 역전사중합효소연쇄반응을 시행하였다. 산화제로 3일간 처리한 후 사용된 배지를 serum free media로 교체하여 6시간 배양 후에 TRIzol Reagent(Invitrogen, California, U.S.A.)을 이용하여 총 RNA를 추출하여 IL-8과 MCP-1 유전자의 발현을 정량비교하기 위하여 역전사중합효소반응(GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer)을 시행하였다. 정량을 위하여 5 μ Ci [α -³²p] dCTP 를 PCR 반응 혼합물에 첨가하였다. First strand cDNA를 1 U/ μ l RNasin (Promega. Madison. U.S.A.), oligo(dT) 450 ng, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT(Gibco BRL. Grand Island, NY, U.S.A.)와 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen. California. USA) 200 U가 함유된 20 μ l의 용액에서 총 RNA 1 μ g으로부터 합성하였다. PCR 은 1 \times PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 μ g/ml gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 primers 10 pmole, 50 μ M dNTP와 *taq* DNA polymerase (Perkin Elmer, CT, U.S.A.) 2.5 unit가 함유된 25 μ l의 반응액에서 시행하였다.¹² PCR 산물 25 μ l로부터 IL-8과 MCP-1 10 μ l와 β -actin 5 μ l를 7% 비변성 polyacrylamide gel 상에서 100 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 1시간 30분 동안 80 $^{\circ}$ C에서 건조한 후 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다. IL-8, MCP-1, 그리고 β -actin cDNA의 정량은 IMAGERTM 와 1D MAIN(Bioneer, Korea)로 semi-quantification 하였으며 β -actin cDNA를 기준으로 비교하였다.¹³ 실험은 최소 2회 이상 반복하였다.

5. 항산화제의 IL-8과 MCP-1의 발현억제효과

항산화제로는 NAC와 PDTc를 사용하여 산화제인 paraquat와 함께 3일간 배양한 후 유전자발현측정과 동일한 방법으로 IL-8과 MCP-1의 발현을 역전사중합효소반응을 시행하여 정량측정하였다.

6. 통계분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 형태로 나타내며 통계적인 분석은 SPSS program(Ver 9.0)으로 Kruskal-Wallis test를 이용하였다. p<0.05인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 산화스트레스의 유발에 의한 반응성산소종의 증가

paraquat로 처리한 색소상피에서 측정된 반응성산소종은 의미있게 증가하였고 항산화제인 NAC로 미리 처치한 후 paraquat에 노출된 색소상피에서는 반응성산소종이 의미있게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 1).

2. 산화스트레스유발에 의한 *IL-8*과 *MCP-1*의 유전자 발현증가

paraquat에 노출된 색소상피에서 *IL-8*은 의미있는 발현증가를 보였지만 *MCP-1*은 의미있는 증가를 보이지 않았다($p < 0.05$)(Fig. 2).

3. 항산화제에 의한 유전자발현 변화

paraquat와 NAC에 동시에 노출된 색소상피에서 *IL-8*은 의미 있는 감소를 보였지만 *MCP-1*은 의미 있는 감소를 보이지 않았다($p < 0.05$)(Fig. 3).

고 찰

연령관련황반변성은 50세 이상에서 일어나는 황반의 변성질환으로 연성드루젠과 망막색소상피의 과색소침착, 저색소침착, 그리고 망막색소상피의 지도형 위축의 형태를 보이는 위축성 황반변성과 맥락막신생혈관의 발생에 따른 감각신경망막박리, 망막출혈, 그리고 망막섬유성 반흔 등을 보이는 삼출성으로 대별된다. 심한 시력장애는 대부분 맥락막 혈관신생을 동반한 삼출성 황반변성에서 생긴다.¹⁴ 연령의 증가와 함께 발생빈도가 증가하는 황반변성은 색소상피에 가해진 산화스트레스와 관련된다고 알려져 있다.¹⁵ 그러나 누적된 산화스트레스가 직접 망막색소 상피세포내의 어떠한 기전을 통하여 맥락막 혈관신생을 유도하는 지는 정확히 밝혀져 있지 않다.

정상적인 안구조직에서의 혈관형성은 VEGF와 같은 촉진인자와 PEDF 등의 억제인자 사이의 균형에 의하여 유지되나, 산화스트레스가 가해진 비정상적인 상태에서는 이들 인자간의 불균형이 발생하여 혈관형성이 유지된다고 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸ 이들 보고에서는 VEGF의 생산증가보다는 PEDF의 발현감소에 의한 혈관신생인자의 불균형이 초래되어 혈관신생으로 이어진다고 보고하고 있다. 이러한 불균형의 상태를 Hlekamp 등¹⁹은 안구에서의 노인성 변화인 황반변성으로 인한 맥락막 신생혈관이 있는 환자의 유리체에서 PEDF와 VEGF의 양을 검출 비교하여 입증하였다. VEGF와 PEDF가 혈관신생에서 중요한 역할을 하지만, IL-8, MCP-1, MMP-2, MMP-9 등도 관여한다고 한다.²⁰⁻²¹

저자들은 세포에 산화스트레스를 유발하는 물질로 알려진 paraquat를 사람 망막색소 상피세포주에 노출시켜 산화스트레스의 상태를 유도하였고^{22,23} 이들 세포주에서 산화스트레스 상태가 유지되었음을 확인하였다(Fig. 1). 다음 단계로 산화스트레스가 입증된 세포들에서 혈관신생 유도인자로 알려진 IL-8과 MCP-1을 역전사중합효소반응을 실시하여 조사한 결과 paraquat를 처치하지 않은 대조군에 비하여 약물처치 군에서 IL-8의 유전자 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 2). 또한 항산화제인 NAC를 투여하여 유전자의 발현이 감소함을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 그러나, 함께 조사하였던 MCP-1은 paraquat에 의해 약간 증가하는 듯했으나 통계적인 의미는 없었다. 이러한 결과는 Higgins 등¹⁰이 산화스트레스의 방법을 산화스트레스를 받은 시세포외질을 투여하여 산화스트레스와 비슷한 환경을 조성한 인체망막색소상피에서 IL-8과 MCP-1이 증가하였다고 보고한 결과와 비슷하다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때 인체망막색소상피에서 산화스트레스가 부과될 때 가장 강력한 혈관유도인자인 VEGF 이외에도 다양한 인자들이 발현하여 혈관신생을 유도하리라고 생각된다.

참고문헌

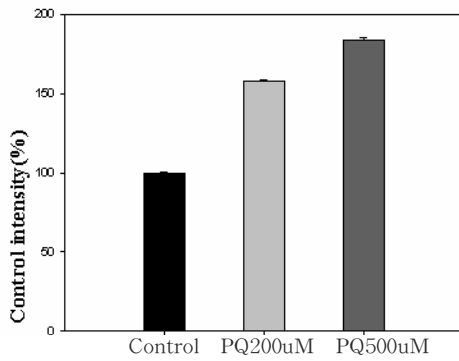
- 1) Klein R, Wang Q, Klein BE, et al. The relationship of age related maculopathy, cataract and glaucoma to visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:182-91.
- 2) Evans J, Wormwald R. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? Br J Ophthalmol 1996;80:9-14.
- 3) Kim JW, Kim HK, Kim HC. Photodynamic Therapy for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration(AMD) J Korean Ophthalmol Soc 2002;43:1435-43
- 4) Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. Ophthalmology 1993;100:1519-35.
- 5) Chang TS, Freund KB, Cruz Z, et al. 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.
- 6) Harman D. The aging process. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:7124-8.
- 7) Zarbin MA. Current concept in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 2004;122:598-614.
- 8) Beatty S, Koh H, Phil M, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 2000;45:115-34.
- 9) Cai J, Nelson KC, Wu M, et al. Oxidative damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res 2000;19:205-21.
- 10) Higgins GT, Wang JH, Dockery P, et al. Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by indigestion of oxidized photoreceptor outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:1775-82.
- 11) Shiraki AG, Pourahmad J, Chan TS, et al. Endogenous and endobiotic re-active oxygen species formation by isolated hepatocytes. Free Radical Biol Med 2002;32:2-10.

- 12) O'Connor KA, Hansen MK, Rachal Pugh C, et al. Further characterization of high mobility group box 1(HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine* 2003;24:254-65.
- 13) 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;82:6133-7.
- 14) Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1987;31:291-306.
- 15) Proctor PH. Free radicals and human disease. In: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. eds. *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine. vol I*, Boca Raton, Florida: CRS Press 1989:209-22.
- 16) Bussolio F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:251-6.
- 17) Dawson DW, Volpert OV, Gillis P. et al. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-8.
- 18) Raymond L, Jacobson B. Isolation and identification of stimulatory and inhibitory cell growth factors in bovine vitreous. *Exp Eye Res* 1982;34:267-86.
- 19) Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2002;134:220-7.
- 20) Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49:117-37.
- 21) Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001; 158:1161-72.
- 22) Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1104-17.
- 23) Noriega GO, Gonzales S, Tomaro ML, Batlle AM. Paraquat-generated oxidative stress in rat liver induces heme oxygenase-1 and aminolevulinic

acid synthase. Free Radic Res 2002; 36:633-9.

- 24) McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, et al. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q₁₀. Toxicology and Applied Phamacology 2004;201:21-31.

A



B

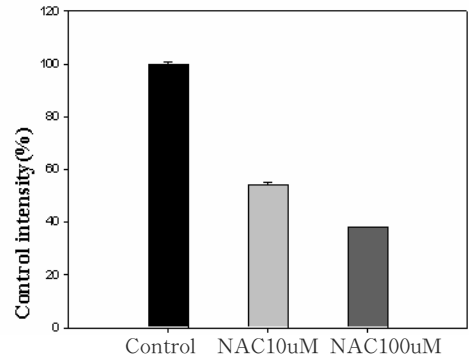


Figure 1. Intracellular reactive oxygen species(ROS) by flow cytometric analysis using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). ROS increase significantly on the paraquat-treated ARPE-19 cells (A). ROS decrease after N-acetylcysteine(NAC) (B). ($p < 0.05$)

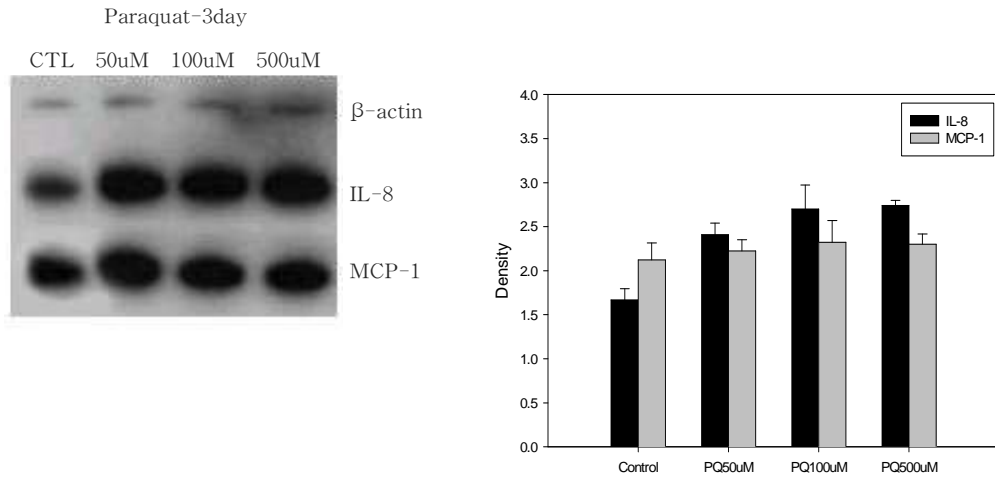


Figure 2. The expression of interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in paraquat-treated ARPE-19 cells. IL-8 was significantly increased in ARPE-19 cells by paraquat ($p < 0.05$), but MCP-1 was not.

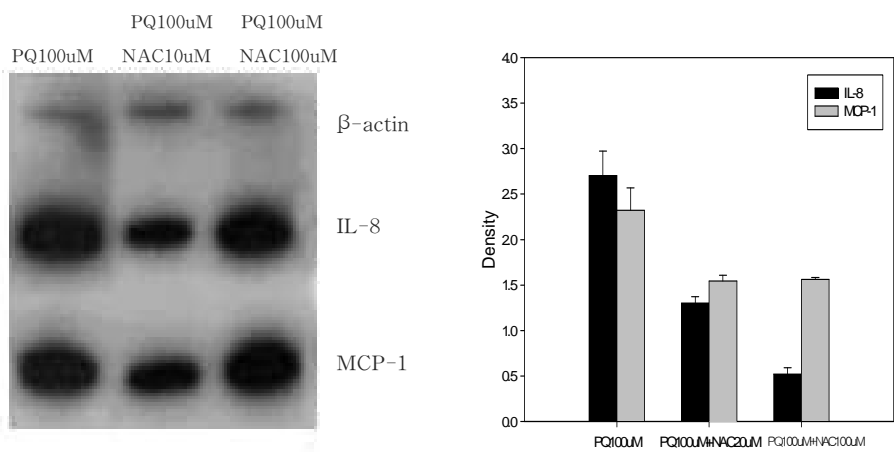


Figure 3. The expression of interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in paraquat and N-acetylcysteine treated ARPE-19 cells. IL-8 was significantly decreased in ARPE-19 cells ($p < 0.05$), but MCP-1 was not.

저작물 이용 허락서

학과	의학과	학번	20067167	과정	(석사) 박사
성명	한글: 허준 한문: 許俊 영문: Heo Jun				
주소	광주광역시 동구 학동 삼익세라믹아파트 3동 1303호				
연락처	E-mail : sjuniya@hanmail.net				
논문제목	한글 : 배양망막색소상피세포에서 산화성스트레스에 의한 IL-8의 발현변화				
	영문 : Expression of IL-8 in cultured ARPE-19 cells under the oxidative stress				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함. 3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함. 4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함. 5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음. 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의(0) 반대()</p> <p style="text-align: center;">2008년 8월 일</p> <p style="text-align: right;">저작자: 허 준 (인)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">조선대학교 총장 귀하</p>					