섬유주세포에서 산화스트레스에 대한 Rho kinase 저해제의 세포 보호 효과에 관한 연구

Cytoprotective Effect of Rho Kinase Inhibitors against Oxidative Stress in Trabecular Meshwork Cells

김재우 · 손명서 · 백민주

Jae Woo Kim, MD, PhD, Myung Seo Son, MD, Min Ju Baek, MD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: We evaluated the protective effect of trabecular outflow drugs, Rho kinase (ROCK) inhibitors against oxidative stress in trabecular meshwork cells.

Methods: Primary-cultured human trabecular meshwork cells (HTMCs) were exposed to ROCK inhibitors at 10 and 20 μ M Y-27632, ripasudil or fasudil for 24 hours, after pretreatment with 200 μ M hydrogen peroxide for 30 min. The cell viabilities and metabolic activities were assessed using the Trypan Blue dye exclusion test and MTT assay, respectively. Reactive oxygen species (ROS) production was measured using the H₂DCFDA assay, and the degree of apoptosis was measured with flow cytometry using annexin-propidium iodide double staining.

Results: In HTMCs, Y-27632 suppressed ROS production. Ripasudil and fasudil increased the metabolic activities and decreased the degrees of apoptosis. Fasudil showed the most cytoprotective effects among the three ROCK inhibitors tested.

Conclusions: Against oxidative stress, ROCK inhibitors decreased apoptosis accompanied by decreased ROS production, especially fasudil. ROCK inhibitors may therefore have cytoprotective properties in addition to increasing trabecular outflow.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(4):394-399

Keywords: Apoptosis, Oxidative stress, Rho-associated kinase inhibitor, Trabecular meshwork

섬유주세포는 녹내장에서 방수 유출의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 방수 유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있는 기전이 된다.^{1,2} 기존의 녹내장 치료 약제의 대부분은 방수의 생성을 줄여 안

압하강 효과를 나타내지만 최근에는 섬유주를 통한 방수 유출을 직접 증가시키는 약제가 많이 연구되고 있으며³ 이러한 계열의 약제의 하나로 Rho kinase (ROCK) 저해제가 있다.⁴

ROCK 저해제는 섬유주를 이완시켜 방수 유출을 증가시키는 데, 그 기전은 F-액틴의 중합을 저해하고 세포 내 칼슘을 조절함으로써 세포 간 밀착연접(tight junction)을 해체시켜 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키는 것으로 알려져 있으며⁵ 다양한 종류의 ROCK 저해제의 안압하강 효과에 대한 임상 연구가 시행되고 있다.⁶⁻⁹ ROCK 저해제는 안압하강 효과 이외에도 다양한 작용을 나타내는데 일산화질소 합성 효소를 조절하여 일산화질소의 생성에 관여해서,¹⁰ 망

■ Received: 2019. 2. 7. ■ Revised: 2019. 3. 4.

■ Accepted: 2020. 3. 17.

■ Address reprint requests to Jae Woo Kim, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University
Medical Center, #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

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2020 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

막 소동맥혈관의 수축을 조절한다.^{11,12} 또한 섬유아세포의 분화를 억제하며 섬유주절제술에서 반흔형성을 억제하며,^{13,14} 혈관을 이완시켜 혈류를 촉진시킴으로써 신경 보호 효과를 나타낸다는 보고도 있다.¹⁵ 뿐만 아니라 ROCK은 혈관평활근세포에서 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 촉진하며 이에 근거하여 심혈관질환에서 ROCK 저해제가 새로운 치료제로 보고되었다.¹⁶ 방수 유출을 담당하는 섬유주 조직은 다양한 종류의 산화스트레스에 노출되어 있는데 ROCK 저해제가 ROS의 생성을 저하시켜 산화스트레스를 감소시킨다면 ROCK 저해제는 안압하강 효과뿐만 아니라 섬유주 보호 효과를 나타낼 수 있을 것이다. 이에 따라 본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차 배양하여 산화스트레스를 유발한 다음 ROCK 저해제들이 ROS의 생성과 세포고사에 미치는 영향을 조사하여 섬유주세포에 대한 보호 효과를 나타내는지 알아보고자 하였으며, 그 효과의 차이를 비교해 보고자 하였다.

대상과 방법

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회(IRB)의 승인을 받았고(승인 번호: CR-17-001-L) 헬싱키선언을 따라 시행되었다. 안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, Thermochemical, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대 배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을 제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대 배양하였다. 일차 배양한 섬유주세포를 배양접시에 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 다음 배지를 제거하고 나서 200 μ M 과산화수소(Sigma)에 30분간 노출시켜 산화스트레스를 유발한 다음 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 이용하여 ROCK 저해제인 Y-27632, ripasudil, fasudil (Sigma)을 각각 10 μ M, 25 μ M의 농도로 희석하여 24시간 노출시켰다.

ROCK 저해제의 세포독성을 알아보기 위하여 24시간 ROCK 저해제에 노출시킨 후 trypan blue로 염색한 다음 혈구계를 이용하여 세포의 생존율(%)을 조사하였다.^{17,18} MTT (3-[4, 5 -dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay를 이용하여 미토콘드리아의 활성도를

조사하였다.¹⁹ 24시간 동안 ROCK 저해제와 과산화수소에 순차적으로 노출시킨 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ L 씩 투여한 후 4시간 동안 정치 배양한 다음 염류 용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양접시에 200 μ L씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물 처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타냈다.

ROS의 생성은 dichlorofluorescein diacetate assay로 조사하였다.^{20,21} 96-well 배양접시에 세포를 부착시켜 약물 처리한 후 과산화수소에 노출시킨 다음 배지를 제거하고 5 μ M의 dichlorofluorescein diacetate (Sigma)을 넣어 30분간 배양하였다. 염류 용액으로 씻어낸 후 산화된 dichlorofluorescein을 형광분석계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Offenburg, Germany)를 이용하여 excitation 488 nm, emission 527 nm의 파장에서 60분간 형광도의 변화를 측정하였다.

세포고사의 유발 정도를 알아보기 위하여 상용의 kit (TACS Annexin V-FITC apoptosis detection kit, R & D systems, USA)를 사용하여 fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V/propidium iodide (PI) 이중염색을 한 후 유세포 분석을 시행하였다.²² 섬유주세포를 24-well 배양접시에 분주하여 부착시켜 약물 처리한 후 과산화수소에 노출시킨 다음 트립신으로 분리한 세포를 원심분리하여 차가운 D-PBS로 세척한 다음 5 μ L의 Annexin V와 1 μ L의 PI를 100 μ L의 세포부유물에 추가하여 15분간 실온에서 정치배양한 후 400 μ L의 완충액을 넣어 섞어 유세포분석기(Gallios, Beckam Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며 이때 fluorescence emission은 530 nm와 575 nm 이상으로 하였다. 모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하여 3회 이상 시행하였으며 대조군은 약물 처리를 하지 않은 군으로 하였다. 세포의 생존과 활성도, ROS의 생성, 세포고사의 정도는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 유의성을 비교하였으며 유의수준은 5%로 정하였다.

결 과

초대배양 7일째부터 섬유주조직의 이식편 주위로 섬유주세포가 자라 나오기 시작하였으며 섬유주세포의 확인은 세포들이 밀집해서 단층을 형성하며 세포들 사이에 분지를 내어 서로 연결하며 약간 길다란 모양의 세포체를 가지는 편평한 모양의 특징적 형태학적인 양상과 섬유주 조직의 이식편 주위에서 위성양상으로 자라나는 섬유주세포의 특

징적인 성장양상으로 확인하였다.^{23,24}

약제에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 200 μ M의 과산화수소에만 노출시킨 경우 세포의 생존이 저하되지 않았다. 또한 과산화수소로 전처리한 다음 ROCK 저해제에 노출시킨 경우 각 약물은 약물에 노출되지 않은 대조군에 비해 세포의 생존율에 있어서 유의한 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$) (Fig. 1). ROCK 저해제 중 20 μ M Y-27632는 세포의 생존을 4.1% 증가시켰으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 따라서 본 실험에 사용한 약물에 의한 아래의 실험

Figure 1. Effect of rho-associated kinase (ROCK) inhibitors on the cytotoxicity determined with trypan blue exclusion test. After pre-treated with 200 μ M H₂O₂, trabecular meshwork cells showed no significant cytotoxic effect compared to non-exposed controls ($p > 0.05$). Cells exposed to each ROCK inhibitor at the concentration of 10 or 20 μ M showed no significant cytotoxic effect compared to non-exposed controls ($p > 0.05$). H₂O₂ = hydrogen peroxide; Y = Y-27632; R = ripasudil; F = fasudil.

Figure 2. Effect of rho-associated kinase inhibitors on the mitochondrial enzyme activity determined with MTT assays. Compared to 200 μ M H₂O₂, each 20 μ M R or F increased metabolic activity significantly ($*p < 0.05$). H₂O₂ = hydrogen peroxide; Y = Y-27632; R = ripasudil; F = fasudil.

결과는 세포 독성에 의한 세포사에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있다. 세포 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위한 MTT assay의 결과 과산화수소에만 노출시킨 경우에 비하여 20 μ M ripasudil과 fasudil은 각각 세포의 활성도를 유의하게 증가시켰다($p=0.001$, $p=0.011$) (Fig. 2).

과산화수소에만 노출시킨 경우와 비교하여 10 μ M와 20 μ M Y-27632는 농도에 비례하여 ROS의 생성을 89.43%와 86.57%로 유의하게 저하시켰으며($p=0.022$, $p=0.005$) (Fig. 3), ripasudil과 fasudil은 20 μ M 농도에서 ROS의 생성을 89.31%와 89.42%로 유의하게 감소시켰으나($p=0.004$, $p=0.013$) 10 μ M의 ripasudil과 fasudil은 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Figure 3. Effect of rho-associated kinase inhibitors on the generation of reactive oxygen species (ROS). Both 10 μ M and 20 μ M Y significantly decreased the level of ROS to 89.43% and 86.57%, respectively ($*p < 0.05$). 20 μ M R or F decreased the level of ROS to 89.31% and 89.42%, respectively compared to H₂O₂ ($*p < 0.05$). H₂O₂ = hydrogen peroxide; Y = Y-27632; R = ripasudil; F = fasudil.

Figure 4. Effect of rho-associated kinase inhibitors on the induction of apoptosis. 20 μ M Y decreased apoptotic cell population significantly ($p = 0.043$). Both R or F decreased the degree of apoptosis at the concentration of 10 μ M and 20 μ M, respectively ($*p < 0.05$). H₂O₂ = hydrogen peroxide; Y = Y-27632; R = ripasudil; F = fasudil.

200 μM 과산화수소에 노출시킨 경우 15.55%에서 세포고사를 초래하였다(Fig. 4). 10 μM Y-26732는 세포고사를 유의하게 억제하지 않았으나($p=0.109$), 20 μM Y-26732는 유의하게 세포고사를 억제하였다($p=0.043$). 이와 비교하여 ripasudil과 fasudil은 농도에 비례하여 유의하게 세포고사를 억제하였으며(모두, $p=0.001$), ROCK 저해제 중 fasudil이 더 많은 세포고사 억제 효과를 나타냈다.

고 찰

방수의 생성을 줄이거나 포도막공막 유출을 증가시키는 기존의 녹내장 치료 약제의 작용 기전에 비교하여 최근 섬유주를 통한 방수 유출을 직접 증가시키는 ROCK 저해제가 많이 연구되고 있다.^{3,4} ROCK 저해제는 공통적으로 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키지만 안압하강 작용뿐만 아니라 다양한 효과를 나타낸다. ROCK 저해제는 신경 보호 작용뿐만 아니라 항산화 작용과 항염증 효과를 나타내며 조직의 섬유화를 저하시키는 작용도 나타내어 섬유주절제술에서 반흔 형성을 감소시키는 효과도 있는 것으로 알려져 있는데, ROCK 저해제의 일종인 ripasudil (K-115)에 대한 임상 연구의 결과들이 보고되었고 fasudil의 신경 보호 작용도 보고되었다.^{14,16,25-27}

섬유주는 방수의 순환에 의해 산화스트레스에 노출되어 있으며, 지속적이거나 심한 산화스트레스는 섬유주에 손상을 주게 되며^{28,29} 녹내장환자의 방수에서 산화스트레스를 나타내는 표지자가 증가되어 나타난다.³⁰⁻³³ 따라서 산화스트레스에 의한 섬유주의 손상이 개방각녹내장의 기전 중 하나로 생각되므로 이를 개선하기 위한 치료가 연구되고 있다.³⁴ 최근의 연구에서 섬유주세포에서 menadione에 의해 유도된 산화스트레스에 대해 Y-26732가 부분적으로 항산화 작용을 나타낸다고 보고되었다.³⁵ 이와 같이 ROCK 저해제들이 섬유주에서 산화스트레스를 저하시키는 작용을 나타낸다면 안압하강 작용뿐만 아니라 섬유주 보호 작용도 나타낼 수 있을 것이다. 이를 알아보기 위한 세 가지 ROCK 저해제를 이용하여 시행한 본 실험의 결과에서 Y-26732는 농도에 비례하여 ROS의 생성을 유의하게 억제하며, ripasudil과 fasudil에 비해 조금 더 강한 항산화 작용을 나타냈다. 또한 Y-26732와 비교하여 ripasudil과 fasudil은 세포의 활성도를 증가시켰으며 세포고사를 억제하였다. 이러한 결과에서 각각의 ROCK 저해제들은 작용 기전이 차이가 난다는 것을 알 수 있는데, fasudil이 Y-26732 또는 ripasudil 보다 더 세포고사를 억제한 점을 고려해 보면 섬유주세포에 ROCK 저해제의 세포보호 효과는 항산화 작용 외에 다른 기전이 작용할 가능성이 있으며 ripasudil의 경우

망막신경절세포의 보호 작용에 대한 연구에서 ROS의 생성을 직접적으로 억제하는 작용은 미약하다는 보고도 있었으므로³⁶ 세포보호 작용의 여러 기전에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

본 연구의 결과에 따르면 섬유주세포에서 fasudil이 다른 ROCK 저해제에 비해 세포보호 효과를 더 나타내었는데, 이는 신경세포를 이용한 이전의 연구들에서 fasudil의 세포보호 효과를 더 많이 보고해 온 점들에 의해 뒷받침된다.^{37,38} 또한 신경세포에 유발된 산화스트레스에 대해 fasudil이 ROS의 생성을 억제하여 세포고사를 유발하는 Bax 단백을 감소시켜 세포고사를 억제한다는 이전의 보고들^{39,40} 역시 세포의 종류는 다르지만 섬유주세포에서도 fasudil이 세포고사를 조금 더 억제하는 본 연구의 결과와 일치한다고 볼 수 있을 것이다. 그러나 실제 생체 내에서의 작용은 향후 보다 자세한 연구가 필요하다. Fasudil은 항산화 작용 이외에도 염증 반응을 억제하며, 생체 내에서도 혈관 이완 작용을 나타내며 세포보호 효과를 나타낸다.^{15,37} 이러한 혈관 이완 작용은 일산화질소의 생성과 관련이 있는데^{15,41} 녹내장의 경우에도 본 실험에 사용된 각각의 ROCK 저해제는 섬유주를 통한 방수 유출을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.⁴²

결론적으로 섬유주 방수 유출 촉진 작용을 나타내는 ROCK 저해제는 산화스트레스에 대한 세포보호 효과를 나타낼 수 있으며, 특히 fasudil의 효과가 더 크게 나타났다. ROCK 저해제는 망막신경절세포에 대한 보호 작용과 더불어 섬유주를 통한 방수 유출을 증가시키는 작용뿐만 아니라 섬유주세포에 대한 보호 작용도 나타낼 가능성이 있으므로 녹내장 치료 약제로서 더 유용하게 이용될 가능성이 높으며 향후 이에 관한 보다 자세한 생체 내 연구가 필요할 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. *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 3) Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Pharmacotherapy of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;31:63-77.
- 4) Kocczynski CC, Epstein DL. Emerging trabecular outflow drugs. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;30:85-7.
- 5) Inoue T, Tanihara H. Rho-associated kinase inhibitors: a novel glaucoma therapy. *Prog Retin Eye Res* 2013;37:1-12.
- 6) Thieme H, Nuskovski M, Nass JU, et al. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kin-

- ase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4240-6.
- 7) Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1029-37.
- 8) Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:137-44.
- 9) Novack GD. Rho kinase inhibitors for the treatment of glaucoma. *Drugs Future* 2013;38:107-13.
- 10) Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005;97:1232-5.
- 11) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000;522 Pt 2:177-85.
- 12) Hein TW, Rosa RH Jr, Yuan Z, et al. Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1583-90.
- 13) Knipe RS, Tager AM, Liao JK. The rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis. *Pharmacol Rev* 2015;67:103-17.
- 14) Honjo M, Tanihara H, Kameda T, et al. Potential role of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5549-57.
- 15) Okamura N, Saito M, Mori A, et al. Vasodilator effects of fasudil, a rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:207-12.
- 16) Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H287-96.
- 17) Koga T, Awai M, Tsutsui J, et al. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 2006;82:362-70.
- 18) Jain PT, Pento JT, Graves DC. Cell-growth quantitation methods for the evaluation of antiestrogens in human breast cancer cells in culture. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992;27:203-7.
- 19) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 20) Ammar DA, Hamweyah KM, Kahook MY. Antioxidants protect trabecular meshwork cells from hydrogen peroxide-induced death. *Trans Vis Sci Tech.* 2012;1:4.
- 21) Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-6.
- 22) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
- 23) 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.
- 24) Alvarado JA, Wood I, Polansky JR. Human trabecular cells. II. Growth pattern and ultrastructural characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:464-78.
- 25) Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, et al. Intra-ocular pressure-lowering effects of a rho kinase inhibitor, ripasudil (K-115), over 24 hours in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a randomized, open-label, crossover study. *Acta Ophthalmologica* 2015;93:e254-60.
- 26) Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, et al. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. *Sci Rep* 2016;6:19640.
- 27) Ichikawa M, Yoshida J, Saito K, et al. Differential effects of two ROCK inhibitors, Fasudil and Y-27632, on optic nerve regeneration in adult cats. *Brain Res* 2008;1201:23-33.
- 28) Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J Cell Physiol* 1999;180:182-9.
- 29) Li G, Luna C, Liton PB, et al. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 2007;13:2282-8.
- 30) Sacca 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.
- 31) Ghanem AA, Arafa LF, El-Baz A. Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma. *Curr Eye Res* 2010;35:295-301.
- 32) Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, et al. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 2004;137:62-9.
- 33) Majsterek I, Malinowska K, Stanczyk M, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Exp Mol Pathol* 2011;90:231-7.
- 34) Luna C, Li G, Liton PB, et al. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Food Chem Toxicol* 2009;47:198-204.
- 35) Fujimoto T, Inoue T, Ohira S, et al. Inhibition of rho kinase induces antioxidative molecules and suppresses reactive oxidative species in trabecular meshwork cells. *J Ophthalmol* 2017;2017:7598140.
- 36) Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, et al. The Novel Rho Kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:7126-36.
- 37) Ding J, Li QY, Wang X, et al. Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. *J Neurochem* 2010;114:1619-29.
- 38) Ding J, Yu JZ, Li QY, et al. Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF. *Brain Behav Immun* 2009;23:1083-8.
- 39) Del Re DP, Miyamoto S, Brown JH. RhoA/Rho kinase upregulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:8069-78.
- 40) Li Q, Liu D, Huang X, Guo L. Fasudil mesylate protects PC12 cells from oxidative stress injury via the Bax-mediated pathway. *Cell Mol Neurobiol* 2011;31:243-50.
- 41) Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C661-8.
- 42) Kim JW. Comparative study of the effects of trabecular meshwork outflow drugs on the permeability and nitric oxide production in trabecular meshwork cells. *Korean J Ophthalmol* 2017;31:452-9.

= 국문초록 =

섬유주세포에서 산화스트레스에 대한 Rho kinase 저해제의 세포 보호 효과에 관한 연구

목적: 섬유주 유출 촉진 약제인 Rho kinase (ROCK) 저해제가 산화스트레스에 대한 섬유주세포 보호 효과를 비교해 보고자 하였다.
대상과 방법: 사람의 섬유주세포를 일차배양한 후 200 μ M 과산화수소에 30분간 노출시킨 후 ROCK 저해제인 Y-27632, Ripasudil, fasudil에 각각 10, 20 μ M씩 24시간 노출시켰다. Trypan blue를 이용하여 세포의 생존을 조사하였고, MTT assay를 이용하여 대사량을 측정하였다. H₂DCFDA assay를 이용하여 반응성산소종의 생성량을 측정하였고, Annexin-propidium iodide 이중염색을 이용한 유세포분석으로 세포고사의 정도를 측정하였다.

결과: 섬유주 세포에서 과산화수소에 의한 산화스트레스에 대해 Y-27632는 반응성산소종의 생성을 감소시켰다. Ripasudil과 fasudil은 세포대사를 증가시켰으며 세포고사를 억제하였는데 그 중 fasudil이 더 유의한 세포보호 효과를 나타냈다.

결론: 섬유주 유출 촉진 약제인 ROCK 저해제는 산화스트레스에 의한 세포고사를 감소시켰으며 fasudil이 더 유의한 세포보호 효과를 나타냈다. 따라서 ROCK 저해제는 안압하강 효과뿐만 아니라 섬유주세포에서 산화스트레스에 대한 세포보호 효과도 나타낼 가능성이 있다.

〈대한안과학회지 2020;61(4):394-399〉

김재우 / Jae Woo Kim

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실
Department of Ophthalmology,
Daegu Catholic University School of
Medicine