섬유주세포에서 황화수소가 산화스트레스와 세포노화에 미치는 영향

Effect of Hydrogen Sulfide on the Oxidative Stress and Senescence in Trabecular Meshwork Cells

박현진 · 김윤영 · 김재우

Hyeon Jin Park, MD, Yoon Young Kim, MD, PhD, Jae Woo Kim, MD, PhD

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

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

Purpose: To investigate the effects of hydrogen sulfide (H_2S) on the senescence and oxidative stress of cultured human trabecular meshwork cells (HTMCs).

Methods: After inducing oxidative stress with 200 μM hydrogen peroxide (H_2O_2), primary cultured HTMCs were exposed to 0, 50, and 100 μM sodium hydrogen sulfide (NaHS) for 24 hours. Cell survival and senescence were measured using an MTT assay and SA- β -galactosidase staining, respectively. Generation of reactive oxygen species (ROS) and superoxide were measured using the dichlorofluorescein assay and modified cytochrome c assay. Production of nitric oxide (NO) and expression of eNOS mRNA were assessed using the Griess assay and reverse polymerase chain reaction.

Results: Cell survival was not affected by 200 μM H_2O_2 . Exposure to 50 and 100 μM NaHS significantly decreased cellular senescence, compared with the H_2O_2 -exposed control. Exposure to 50 and 100 μM NaHS decreased the generation of ROS, and exposure to 100 μM NaHS decreased the generation of superoxide. Treatment with 100 μM NaHS increased the production of NO and expression of eNOS mRNA, respectively.

Conclusions: NaHS decreased the cellular senescence associated with the decreased generation of free radicals. Thus, H_2S could inhibit the senescence of HTMCs by reducing oxidative stress.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(4):400-406

Keywords: Hydrogen sulfide, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Senescence, Trabecular meshwork

황화수소(hydrogen sulfide, H_2S)는 3가지 효소에 의해 내
인적으로 생성되며 생리적으로 다양한 역할을 하는데¹⁻⁵ 혈

관의 이완에도 관여할 뿐만 아니라 심혈관계와 중추신경계
에서 세포보호작용을 나타내며, 산화스트레스와 세포고사
를 감소시키고 노화를 지연시키는 작용도 나타낸다.⁶⁻⁸

안구 내 다양한 조직에서 H_2S 는 기질인 L-cysteine에 의
해 내인성으로 생성되는데⁹ 동물 실험에서 안압을 낮추는
효과가 있으며, 전안부 관류 실험에서 방수유출을 증가시
키는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 또한 H_2S 는 안구 내에서 산
화스트레스에 대해 신경보호작용을 나타내며,¹² 녹내장 모
델을 이용한 연구에서도 망막신경절세포 보호 효과가 있는
것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁵

섬유주에서 산화스트레스의 증가는 섬유주의 손상을 유
발하여 개방각녹내장을 유발하는 요인으로 알려져 있으며¹⁶⁻¹⁸

■ Received: 2019. 9. 2. ■ Revised: 2019. 10. 21.

■ Accepted: 2020. 3. 17.

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

* This work was supported by the grant of Research Institute of
Medical Science, Catholic University of Daegu (2019).

* 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.

이러한 산화스트레스는 세포의 조기 노화를 유발하여 기능을 저하시키는 원인이 된다.^{19,20} 사람의 섬유주세포는 연령이 증가할수록 숫자가 감소하는데 정상인에 비해 개방각녹내장의 경우에서 섬유주세포의 노화가 더 많이 나타나므로 섬유주세포의 노화가 녹내장의 발병기전의 하나로 알려져 있다.²¹⁻²³

H₂S는 혈관내피세포 또는 망막신경절세포에서 산화스트레스에 대해 세포보호 효과를 나타내므로 방수유출로에서도 산화스트레스에 대하여 섬유주세포 보호작용과 섬유주세포의 노화를 지연시키는 작용을 나타낼 가능성도 있으나 섬유주세포에서 이와 관련된 연구는 아직 자세히 행해지지 않았다. 이에 따라 본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 산화스트레스를 유도한 다음 H₂S가 섬유주세포의 노화를 억제하는 효과가 있는지 알아보고, 산화스트레스와의 관련성을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

세포배양과 약물처리

본 연구는 대구가톨릭대학교병원 의학윤리심의위원회(IRB)의 승인을 받았고(승인 번호: CR-19-010-L), 헬싱키선언을 따라 시행되었다. 각막이식에 동의한 42세 환자로부터 사후 6시간 이내에 적출한 안구를 안구은행에서 얻어 전방각에서 섬유주를 벗겨내어 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 10% 우태아혈청(Hyclone, ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen)를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 초대배양하였다. 배양된 인체의 섬유주세포에 0, 50, 100 μ M 황화수소 나트륨(sodium hydrogen sulfide, NaHS, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 24시간 노출시켰다. 이때 산화스트레스를 유발하기 위하여 200 μ M 과산화수소(hydrogen peroxide, [H₂O₂], Sigma)를 30분간 먼저 노출시켰다.

MTT assay

세포의 증식에 대한 효과는 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay를 이용하였다.^{24,25} 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100 μ L씩 투여한 후 4시간 동안 정지배양한 다음 염류용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 96-well plate에 옮겨 spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG labtech, Offenberg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율

로 나타내었다.

SA- β -galactosidase assay

노화된 세포에서 특징적으로 발현되는 β -galactosidase의 활성을 측정하기 위해 상용의 senescence-associated β -galactosidase kit (SA- β -gal, Sigma)을 이용하였다.^{26,27} 배지를 흡입 제거한 후 염류용액으로 세척한 다음 염색액을 넣어 2시간 동안 배양하였다. 이때 노화된 세포는 β -galactosidase를 발현하여 푸른색을 나타내므로 광학현미경으로 100 배율로 무작위로 세포 구역을 정하여 β -galactosidase 양성인 푸르게 염색된 노화된 세포 수와 전체 세포 수를 수동으로 세어서 노화된 세포의 정도를 표시하였다.

반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)와 superoxide의 측정

ROS의 생성 정도는 dichlorofluorescein assay로 측정하였다.²⁸ 96-well 배양접시를 이용하여 약물처리한 세포배양에서 배지를 제거한 다음 Phosphated Buffered Saline로 세척한 후 5 μ M dichlorofluorescein diacetate (Sigma)를 투여한 다음 암실에서 30분간 배양하였다. 산화된 dichlorofluorescein의 형광 변화를 excitation 파장 488 nm, emission 파장 527 nm에서 형광분석계(FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech)를 이용하여 측정하였다. Superoxide의 생성 정도는 modified cytochrome c assay로 측정하였다.^{29,30} 160 μ M cytochrome c (Sigma)와 100 U/mL superoxide dismutase (Sigma)를 혼합한 반응용액 100 μ L에 약물 처리한 세포를 20분간 노출시켰다. 540 nm에서 환원된 cytochrome c를 측정하였다. 10⁶개의 세포에 대해 시간당 환원된 cytochrome c의 양(nmol)을 2.1 $\times$ 10⁴/M/cm의 net extinction coefficient로 생성된 superoxide의 양을 nmol/10⁶cell/h로 나타내었다.

일산화질소(nitric oxide, NO)와 endothelial NO synthase (eNOS) mRNA의 측정

섬유주세포에서 NO의 생성은 Griess assay를 이용하여 측정하였다.³¹ 약물에 노출시킨 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 분광광도계 (FLUOstar Optima, BMG Labtech)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. eNOS mRNA 발현은 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 측정하였다. 섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 2XGoTaq Green Master Mix (Promega,

Fitchburg, WI, USA)와 10 pmolL의 forward primer (ctg gct ttc cct tcc agt tc, 225 bp), reverse primer (cct tcc aga tta agg cgg ac, 225 bp)를 각각 혼합하여 DNA Engine cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. 이때 β -actin을 internal standard로 사용하였다.

통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였다. Unpaired *t*-test를 사용하여 유의성을 비교하였으며 유의수준은 5%로 정하였다.

결 과

NaHS와 H₂O₂가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

배양된 섬유주세포에 200 μ M H₂O₂에 단독으로 노출시킨 경우와 10, 50, 100 μ M NaHS와 200 μ M H₂O₂를 함께 노출시킨 경우 모두 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 섬유주세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다 (모두 $p > 0.05$) (Fig. 1). 이는 500 μ M 이하의 H₂O₂가 농도로 처리한 경우 섬유주세포의 생존에는 유의한 영향을 미치지 않는다는 기존의 연구와³² 일치하는 결과이며, 본 실험에 사용된 각 약물의 농도에서 측정된 아래 실험의 결과들은 세포의 생존 변화에 의한 것이 아님을 알 수 있다.

산화스트레스에 대해 NaHS가 세포노화의 정도에 영향

배양된 섬유주세포에 200 μ M H₂O₂에 단독으로 노출시

Figure 1. Effect of H₂O₂ (H) and NaHS (N) on the survival of cultured human trabecular meshwork cells. Exposing to 200 μ M H₂O₂ or co-exposing to 200 μ M H₂O₂ and 10, 50, 100 μ M NaHS did not affect the survival of trabecular meshwork cells compared to non-exposed controls (all $p > 0.05$).

킨 경우 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 유의하게 노화된 세포 숫자가 증가하였다($p=0.010$). 200 μ M H₂O₂에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 NaHS를 함께 노출시킨 경우 50, 100 μ M NaHS는 노화된 세포 숫자를 유의하게 감소시켰다($p=0.035$, $p=0.016$) (Fig. 2).

산화스트레스에 대해 NaHS가 ROS의 생성에 미치는 영향

배양된 섬유주세포에 200 μ M H₂O₂에 단독으로 노출시킨 경우 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 유의하게 ROS가 증가하였다($p=0.012$). 이에 비하여 10, 50, 100 μ M

Figure 2. Effect of H₂O₂ (H) and NaHS (N) on the senescence of cultured human trabecular meshwork cells. Exposing to 200 μ M H₂O₂ increased cellular senescence compared to non-exposed controls ($p = 0.010$). Compared to exposing to 200 μ M H₂O₂ alone, co-exposing to 200 μ M H₂O₂ and 50 or 200 μ M H₂O₂ and 100 μ M NaHS decreased cellular senescence significantly ($p = 0.035$, $p = 0.016$).

Figure 3. Effect of H₂O₂ (H) and NaHS (N) on the generation of reactive oxygen species (ROS) in cultured human trabecular meshwork cells. Exposing to 200 μ M H₂O₂ increased generation of ROS compared to non-exposed controls ($p = 0.012$). Compared to exposing to 200 μ M H₂O₂ alone, co-exposing to 200 μ M H₂O₂ and 50, 100 μ M NaHS decreased generation of ROS significantly ($p = 0.047$, $p = 0.036$).

NaHS와 200 μM H_2O_2 를 함께 노출시킨 경우 H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 50, 100 μM NaHS는 ROS의 생성을 유의하게 감소시켰다($p=0.047$, $p=0.036$) (Fig. 3).

배양된 섬유주세포에 200 μM H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 유의하게 superoxide의 생성이 증가되었다($p=0.034$). 이와 대조적으로 10, 50, 100 μM NaHS와 200 μM H_2O_2 를 함께 노출시킨 경우 H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 100 μM NaHS는 superoxide의 생성을 유의하게 감소시켰다($p=0.020$) (Fig. 4).

산화스트레스에 대해 NaHS가 NO생성과 eNOS mRNA의 발현에 미치는 영향

배양된 섬유주세포에 200 μM H_2O_2 에 단독으로 노출시

Figure 4. Effect of H_2O_2 (H) and NaHS (N) on the generation of superoxide in cultured human trabecular meshwork cells. Exposing to 200 μM H_2O_2 increased generation of superoxide compared to non-exposed controls (* $p = 0.034$). Compared to exposing to 200 μM H_2O_2 alone, co-exposing to 200 μM H_2O_2 and 100 μM NaHS decreased generation of superoxide significantly († $p = 0.020$).

Figure 5. Effect of H_2O_2 (H) and NaHS (N) on the production of nitric oxide (NO) in cultured human trabecular meshwork cells. Compared to exposing to 200 μM H_2O_2 alone, co-exposing to 200 μM H_2O_2 and 100 μM NaHS increased production of NO significantly (* $p = 0.018$).

킨 경우 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 배지에서서의 nitrite 생성 정도는 유의한 차이를 나타내지 않았으나($p=0.364$) (Fig. 5), H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 100 μM NaHS를 함께 노출시킨 경우에는 NO의 생성이 유의하게 증가하였다($p=0.018$). 200 μM H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우 약물에 노출시키지 않은 대조군에 비하여 eNOS mRNA의 발현에는 유의한 차이를 나타내지 않았으나($p=0.742$) (Fig. 6), H_2O_2 에 단독으로 노출시킨 경우에 비하여 100 μM NaHS를 함께 노출시킨 경우에는 eNOS mRNA의 발현이 유의하게 증가하였다($p=0.031$).

고 찰

H_2S 는 인체 내에서 신호전달분자로 작용하여 평활근 이완이나 염증 반응, 신경전달과 세포의 생존 등에 대한 다양한 작용을 나타낸다.³³ H_2S 는 안구 내에서 내인성 경로로 생성되며 홍채, 수정체, 포도막, 망막과 방수 같은 안구 내 여러 조직에서 H_2S 합성에 관여하는 효소들이 존재한다.^{9,34}

H_2S 는 안구 내 망막신경절세포와 성상세포에 대하여 세포보호작용을 나타내며,¹²⁻¹⁵ 그 기전으로 H_2S 의 항산화작용이 관여한다.^{7,34,35} 섬유주는 방수 내의 산화스트레스에 항상 노출되어 있는데¹⁷ 산화스트레스가 증가하게 되면 섬유주세포는 구조적, 기능적인 손상을 받게 될 뿐만 아니라^{36,37} 세포의 노화도 유발되는데^{19,20} 이는 개방각녹내장의 발병기전의 하나가 된다.²³ 따라서 H_2S 는 섬유주세포에서도 항산화작용에 의해 세포보호 효과와³² 섬유주세포의 노화를 억제하는 작용을 나타낼 가능성이 있다.

본 연구에서는 SA- β -galactosidase 염색을 이용하여 노화

Figure 6. Effect of H_2O_2 (H) and NaHS (N) on the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA in cultured human trabecular meshwork cells. Compared to exposing to 200 μM H_2O_2 alone, co-exposing to 200 μM H_2O_2 and 100 μM NaHS increased expression of eNOS mRNA NO significantly (* $p = 0.031$).

된 세포의 수를 측정하였는데 이는 특정 세포의 종류에 따라 활성을 나타낼 수도 있으나 혈관내피세포 또는 평활근 세포를 포함한 대부분의 인체 세포에서 세포노화의 정도를 나타내는 좋은 지표로 알려져 있다.^{26,27} 이에 따라 시행한 본 연구에서 H₂O₂ 단독으로 처리한 대조군에 비해 NaHS를 함께 투여한 경우 NaHS 농도의 증가에 따라 섬유주세포의 노화를 유의하게 감소시켰다. 한편 이전의 연구와 같이³² 본 연구에서 산화스트레스를 유도하기 위해 사용한 H₂O₂의 농도는 세포의 생존에는 유의한 영향을 미치지 않았으므로 이러한 결과는 세포의 생존 감소와는 무관하였다.

NaHS에 의한 세포노화의 억제 기전을 알아보기 위하여 ROS의 생성 정도를 조사하였는데 H₂O₂ 단독으로 처리한 대조군에 비해 NaHS를 함께 투여한 경우 산화스트레스를 유발하는 자유유리기인 ROS와 superoxide의 생성이 유의하게 억제되었다. 따라서 섬유주세포에서도 NaHS에 의한 노화억제의 기전으로 H₂O₂의 항산화작용이 관여할 가능성이 있다. 그러나 H₂O₂의 항산화작용은 ROS 이외에 glutathione을 비롯한 다른 기전에 의해 매개되어 나타날 수 있으므로^{38,39} 이에 관해서는 향후 보다 자세한 연구를 요한다.

세포 내에서 ROS는 주로 미토콘드리아에서 생성되는데 그중 세포호흡에 의해 미토콘드리아에서 생성되는 superoxide가 중요한 산화물질로 작용한다.⁴⁰ 혈관내피세포에서 H₂O₂는 NO의 생성을 저하시켜 superoxide와의 반응을 유발함으로써 peroxynitrite 같은 해로운 산화물질을 생성하여 세포 내 분자와 반응함으로써 정상적인 세포 대사를 저해하게 되는데⁴¹⁻⁴⁴ 이에 대해 H₂S는 NO의 생성을 증가시켜 세포 내 대사를 조절하는 NO의 기능을 유지하는 역할을 한다.⁴⁵ 섬유주세포에서 이러한 작용을 나타내는지 규명하기 위해 시행한 본 연구의 결과에서 H₂O₂에 단독으로 노출된 경우와 비교해 고농도의 NaHS는 NO과 eNOS mRNA의 발현을 증가시켰다. H₂S는 산화물질의 생성을 감소시키면서 NO의 기능을 유지시키는 작용을 나타낼 수 있으며, 이러한 NO의 생성 증가는 세포의 노화를 억제하는 작용을 나타내므로^{46,47} 섬유주세포에서 H₂S는 산화스트레스의 억제와 NO의 기능 유지에 의해 세포노화를 억제하는 작용을 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 결론적으로 H₂S는 산화스트레스에 대해 섬유주세포의 노화를 억제하는 작용을 나타내었으며 이는 반응성산소종의 발생을 감소키는 H₂S의 항산화작용에 의한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Chen CG, Xin H, Zhu YZ. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1709-16.

- 2) Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:169-87.
- 3) Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:770-82.
- 4) Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:783-93.
- 5) Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 2014;41:4-10.
- 6) Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct* 2010;28:95-106.
- 7) Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 2004;18:1165-7.
- 8) Zhang Y, Tang ZH, Ren Z, et al. Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases. *Mol Cell Biol* 2013;33:1104-13.
- 9) Kulkarni M, Njie-Mbye YF, Okpobiri I, et al. Endogenous production of hydrogen sulfide in isolated bovine eye. *Neurochem Res* 2011;36:1540-5.
- 10) Salvi A, Bankhele P, Jamil J, et al. Effect of hydrogen sulfide donors on intraocular pressure in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2016;6:371-5.
- 11) Robinson J, Okoro E, Ezue C, et al. Effects of hydrogen sulfide-releasing compounds on aqueous humor outflow facility in porcine ocular anterior segments, Ex Vivo. *J Ocul Pharmacol Ther* 2017;33:91-7.
- 12) Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1705-13.
- 13) Sakamoto K, Suzuki Y, Kurauchi Y, et al. Hydrogen sulfide attenuates NMDA-induced neuronal injury via its anti-oxidative activity in the rat retina. *Exp Eye Res* 2014;120:90-6.
- 14) Liu H, Anders F, Thanos S, et al. Hydrogen sulfide protects retinal ganglion cells against glaucomatous injury in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:5129-41.
- 15) Huang S, Huang P, Lina Z, et al. Hydrogen sulfide supplement attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 2018;168:33-48.
- 16) Kumar DM, Agarwal N. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence. *J Glaucoma* 2007;16:334-43.
- 17) Saccà SC, Izzotti A, Rossi P, Traverso C. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2007;84:389-99.
- 18) Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008;17:263-8.
- 19) Erusalimsky JD, Skene C. Mechanisms of endothelial senescence. *Exp Physiol* 2008;94:299-304.
- 20) Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. *Exp Gerontol* 2003;38:1149-60.
- 21) Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye (Lond)* 1987;1(Pt 2):204-10.
- 22) Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:612-37.
- 23) Liton PB, Challa P, Stinnett S, et al. Cellular senescence in the glaucomatous outflow pathway. *Exp Gerontol* 2005;40:745-8.
- 24) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.

- 25) Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3727-9.
- 26) Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vitro. *Proc Natl Acad Soc U S A* 1995;92:9363-7.
- 27) van der Loo B, Fenton MJ, Erusalimsky JD. Cytochemical detection of a senescence-associated β -galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Exp Cell Res* 1998;241:309-15.
- 28) Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-6.
- 29) Beauchamp C, Fridovich L. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-87.
- 30) Teufelhofer O, Weiss RM, Parzefall W, et al. Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide. *Toxicol Sci* 2003;76:376-93.
- 31) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biologic fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 32) Ammar DA, Hamweyah KM, Kahook MY. Antioxidants protect trabecular meshwork cells from hydrogen peroxide-induced cell death. *Transl Vis Sci Technol* 2012;1:4.
- 33) Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996;16:1066-71.
- 34) Sun WH, Liu F, Chen Y, Zhu YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:164-9.
- 35) Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:661-70.
- 36) 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.
- 37) Li G, Luna C, Liton PB, et al. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 2007;13:2282-8.
- 38) Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1-13.
- 39) Zhang Z, Huang H, Liu P, et al. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening KATP channels. *Can J Physiol Pharmacol* 2007;85:1248-53.
- 40) Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1-13.
- 41) Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, et al. Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2206-13.
- 42) MacKenzie A, Martin W. Loss of endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics. *Br J Pharmacol* 1998;124:719-28.
- 43) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
- 44) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- 45) Al-Magableh MR, Kemp-Harper BK, Ng HH, et al. Hydrogen sulfide protects endothelial nitric oxide function under conditions of acute oxidative stress in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2014;387:67-74.
- 46) Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000;87:540-2.
- 47) Scalera F, Borlak J, Beckmann B, et al. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1816-22.

= 국문초록 =

섬유주세포에서 황화수소가 산화스트레스와 세포노화에 미치는 영향

목적: 섬유주세포에서 황화수소(hydrogen sulfide, H₂S)가 산화스트레스와 세포노화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 섬유주세포를 200 μ M 과산화수소로 산화스트레스를 유발한 다음 황화수소(sodium hydrogen sulfide, NaHS) 0, 50, 100 μ M에 24시간 노출시킨 후 MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였고, 세포노화의 정도를 SA- β -galactosidase 염색을 시행하여 측정하였다. 반응성산소종과 superoxide의 생성 정도를 dichlorofluorescein assay와 modified cytochrome c assay로 각각 측정하였다. Griess assay와 RT-PCR로 일산화질소의 생성과 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA의 발현을 각각 측정하였다.

결과: 200 μ M 과산화수소는 세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않았다. 50, 100 μ M NaHS는 과산화질소에 노출된 대조군에 비하여 세포의 노화를 유의하게 감소시켰다. 과산화수소에 노출된 대조군에 비하여 50, 100 μ M NaHS는 반응성산소종의 생성을 감소시켰고 100 μ M NaHS는 superoxide의 생성을 저하시켰다. 100 μ M NaHS는 일산화질소의 생성과 eNOS mRNA의 발현을 각각 유의하게 증가시켰다.

결론: 과산화수소로 유발된 산화스트레스에 대해 NaHS는 자유유리기의 생성을 감소시키면서 세포의 노화를 억제하였다. 따라서 황화질소는 산화스트레스를 감소시켜 섬유주세포의 노화를 감소시키는 작용을 나타낼 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2020;61(4):400-406〉

박현진 / Hyeon Jin Park

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