스테로이드 노출 수정체 상피세포에서 중합효소연쇄반응 방법을 통한 유전자의 발현 변화

Genes Expressed in Steroid-exposed Lens Epithelial Cells as Revealed by Polymerase Chain Reaction

유웅선^{1,2} · 서진석¹ · 조용운¹ · 하영술³ · 정인영^{1,2} · 서성욱^{1,2} · 김성재^{1,2}

Woong-Sun Yoo, MD^{1,2}, Jin-Seok Seo, MD¹, Yong Wun Cho, MD¹, Young-Sool Hah, PhD³,
In Young Chung, MD, PhD^{1,2}, Seong Wook Seo, MD, PhD^{1,2}, Seong-Jae Kim, MD, PhD^{1,2}

경상대학교 의과대학 경상대학교병원 안과학교실¹, 경상대학교 건강과학연구원², 경상대학교병원 의생명연구소³

Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang National University College of Medicine¹, Jinju, Korea
Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University², Jinju, Korea
Biomedical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital³, Jinju, Korea

Purpose: We investigated the expression levels of 84 genes in dexamethasone-exposed human lens epithelial cells using polymerase chain reaction (PCR) array analysis.

Methods: The viability and motility of lens epithelial cells were examined after treatment with dexamethasone at 0.01, 0.1, and 1 mg/mL; Western blot was used to evaluate the expression levels of fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA), and E-cadherin. After 24, 48, and 72 hours of dexamethasone treatment at 0.1 mg/mL, the expression levels of 84 growth factors were analyzed using PCR array.

Results: Cell viability did not change significantly at dexamethasone levels of 0.01 or 0.1 mg/mL, but decreased markedly at 1 mg/mL; motility increased in a concentration-dependent manner at 0.01 and 0.1 mg/mL. Western blot showed that fibronectin levels increased significantly at all dexamethasone concentrations tested; the α -SMA level increased only at 0.01 mg/mL, and E-cadherin levels decreased significantly at all tested concentrations. PCR showed that the levels of FGF1, FGF2, IL-11, regulators of apoptosis (GDNF, IL-1 β , and NRG2), and regulators of cell differentiation (BMP5, FGF1, FGF2, and FGF5) decreased more than twofold, whereas the levels of FGF9 and FGF19 increased more than twofold.

Conclusions: PCR performed after exposure of lens epithelial cells to dexamethasone may identify the genes involved in the development of steroid-induced cataracts.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(5):472-481

Keywords: Cataract, Lens proteins, Polymerase chain reaction, Steroids

■ Received: 2019. 8. 16. ■ Revised: 2019. 11. 4.

■ Accepted: 2020. 4. 17.

■ Address reprint requests to Seong-Jae Kim, MD, PhD
Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Hospital, #79 Gangnam-ro, Jinju 52727, Korea
Tel: 82-55-750-8171, Fax: 82-55-750-4158
E-mail: Maya12kim@naver.com

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

백내장은 황반변성, 녹내장 등과 더불어 시력저하를 일으키는 안과 질환 중 하나로, 여전히 전 세계적으로 주요한 실명의 원인으로 알려져 있다.¹ 수술 도구나 기법의 발달로 백내장으로 인해 실명이 되는 환자는 감소하고 있으나, 인구의 고령화가 진행됨으로써 그에 따른 환자들의 비용 부담과 함께 사회 경제적 비용도 증가하는 것으로 보고되고 있다.² 백내장의 원인에는 선천적 요인 뿐만 아니라 후천적, 환경적 요인이 작용하며, 그 발생 위험인자로 고령, 당뇨,

Table 1. List of genes in PCR array

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01	Hs.112432	NM_000479	AMH	Anti-Mullerian hormone
A02	Hs.502182	NM_001709	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
A03	Hs.1274	NM_006129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
A04	Hs.158317	NM_014482	BMP10	Bone morphogenetic protein 10
A05	Hs.73853	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
A06	Hs.387411	NM_001201	BMP3	Bone morphogenetic protein 3
A07	Hs.68879	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
A08	Hs.296648	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5
A09	Hs.285671	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6
A10	Hs.473163	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
A11	Hs.664022	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b
A12	Hs.170310	NM_177405	CECR1	Cat eye syndrome chromosome region, candidate 1
B01	Hs.889	NM_001828	CLC	Charcot-Leyden crystal protein
B02	Hs.591402	NM_000757	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B03	Hs.1349	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
B04	Hs.2233	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
B05	Hs.45127	NM_006574	CSPG5	Chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)
B06	Hs.789	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B07	Hs.40499	NM_012242	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
B08	Hs.436186	NM_016442	ERAP1	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
B09	Hs.115263	NM_001432	EREG	Epiregulin
B10	Hs.483635	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
B11	Hs.655193	NM_004112	FGF11	Fibroblast growth factor 11
B12	Hs.6540	NM_004114	FGF13	Fibroblast growth factor 13
C01	Hs.508616	NM_004115	FGF14	Fibroblast growth factor 14
C02	Hs.248192	NM_003867	FGF17	Fibroblast growth factor 17
C03	Hs.249200	NM_005117	FGF19	Fibroblast growth factor 19
C04	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
C05	Hs.248087	NM_020637	FGF22	Fibroblast growth factor 22
C06	Hs.287370	NM_020638	FGF23	Fibroblast growth factor 23
C07	Hs.37055	NM_004464	FGF5	Fibroblast growth factor 5
C08	Hs.166015	NM_020996	FGF6	Fibroblast growth factor 6
C09	Hs.567268	NM_002009	FGF7	Fibroblast growth factor 7
C10	Hs.111	NM_002010	FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
C11	Hs.11392	NM_004469	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
C12	Hs.2171	NM_004962	GDF10	Growth differentiation factor 10
D01	Hs.643604	NM_005811	GDF11	Growth differentiation factor 11
D02	Hs.248114	NM_000514	GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
D03	Hs.466471	NM_000175	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase
D04	Hs.799	NM_001945	HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
D05	Hs.160562	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D06	Hs.523414	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
D07	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10
D08	Hs.467304	NM_000641	IL11	Interleukin 11
D09	Hs.674	NM_002187	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
D10	Hs.83077	NM_001562	IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
D11	Hs.1722	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha
D12	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
E01	Hs.89679	NM_000586	IL2	Interleukin 2
E02	Hs.694	NM_000588	IL3	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
E03	Hs.73917	NM_000589	IL4	Interleukin 4
E04	Hs.407506	NM_002191	INHHA	Inhibin, alpha

Table 1. Continued

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
E05	Hs.583348	NM_002192	INHBA	Inhibin, beta A
E06	Hs.1735	NM_002193	INHBB	Inhibin, beta B
E07	Hs.728907	NM_000214	JAG1	Jagged 1
E08	Hs.433445	NM_002226	JAG2	Jagged 2
E09	Hs.656214	NM_020997	LEFTY1	Left-right determination factor 1
E10	Hs.520187	NM_003240	LEFTY2	Left-right determination factor 2
E11	Hs.2250	NM_002309	LIF	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
E12	Hs.466766	NM_003573	LTBP4	Latent transforming growth factor beta binding protein 4
F01	Hs.82045	NM_002391	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
F02	Hs.41565	NM_005259	MSTN	Myostatin
F03	Hs.522615	NM_000266	NDP	Norrie disease (pseudoglioma)
F04	Hs.2561	NM_002506	NGF	Nerve growth factor (beta polypeptide)
F05	Hs.370414	NM_018055	NODAL	Nodal homolog (mouse)
F06	Hs.453951	NM_013957	NRG1	Neuregulin 1
F07	Hs.408515	NM_013982	NRG2	Neuregulin 2
F08	Hs.125119	NM_001010848	NRG3	Neuregulin 3
F09	Hs.234775	NM_004558	NRTN	Neurturin
F10	Hs.99171	NM_002527	NTF3	Neurotrophin 3
F11	Hs.128055	NM_182981	OSGIN1	Oxidative stress induced growth inhibitor 1
F12	Hs.570855	NM_016205	PDGFC	Platelet derived growth factor C
G01	Hs.252820	NM_002632	PGF	Placental growth factor
G02	Hs.248159	NM_004158	PSPN	Persephin
G03	Hs.371249	NM_002825	PTN	Pleiotrophin
G04	Hs.46440	NM_021094	SLCO1A2	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
G05	Hs.313	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
G06	Hs.385870	NM_003212	TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
G07	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
G08	Hs.1166	NM_000460	THPO	Thrombopoietin
G09	Hs.631558	NM_003283	TNNT1	Troponin T type 1 (skeletal, slow)
G10	Hs.592212	NM_001953	TYMP	Thymidine phosphorylase
G11	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
G12	Hs.435215	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C

스테로이드, 외상, 그리고 자외선 노출 등이 알려져 있다.³ 이 중에서 스테로이드 유발 백내장은 전신적으로나 점안 스테로이드를 투여 받은 환자에서 발생하는 백내장으로 정의되는데, 평균 수명의 연장과 더불어 자가 면역질환 등 장기적인 스테로이드 치료가 필요한 질환의 증가 등으로 인해 유병률이 점차 높아지는 백내장의 아형으로 보고되고 있다.⁴ 스테로이드 유발 백내장은 임상적으로 중심성 후낭 하혼탁의 형태로 나타나게 되는데, 이에 따라 조기에 시력 저하나 눈부심 등이 생기게 된다. 뿐만 아니라 수술 중에는 후낭파열이 생길 위험성이 높으며, 수술 후에는 후낭혼탁이 쉽게 발생하여 추가적인 비용을 발생시키게 된다.⁵⁻⁷ 이런 임상적인 중요성에도 불구하고 스테로이드 유발 백내장에 대한 기전이나 예방에 대한 연구는 당뇨병성 백내장이나 연령관련 백내장보다 적은 것이 현실이다. 본 연구에서는 수정체 상피세포를 이용하여 스테로이드가 수정체 상피세포에 미치는 영향을 확인하고 이를 polymerase chain re-

action (PCR) array 방법을 통해 유전자들의 발현 변화를 확인함으로써 스테로이드 유발 백내장의 병리 기전을 알아보고자 한다.

대상과 방법

세포 배양 및 처리

인간 수정체 상피(Human lens epithelial B3, HLE-B3) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. HLE-B3 세포를 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) 배지에서 배양하였다. 세포를 가습된 CO₂ 배양기에서 37°C로 유지시켰다. 대조군 세포는 텍사 메타손(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 처리하지 않았으며 처치군 세포는 3군(0.01, 0.1, 1 mg/mL)으로 나누

Figure 1. The effect of dexamethasone on cell viability in HLE-B3. The graphs showed significantly decreased cell viability of HLE-B3 in 1 mg/mL of dexamethasone for 24, 48, and 72 hours. CTL = control. * $p < 0.01$ compared with control cells, as evaluated using the student's t -test.

Figure 2. The effect of dexamethasone on wound healing assay in HLE-B3. (A) Representative phase-contrast pictures revealed migration of cells treated with various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1 mg/mL) of dexamethasone at 0 hours (immediately after culture inserts were removed) and 6 hours after the scratch. (B) The graphs showed closure rate were significantly increased in 0.01 and 0.1 mg/mL of dexamethasone, while closure rate was significantly decreased in 1 mg/mL of dexamethasone compared to control. Dex = dexamethasone. * $p < 0.001$ compared with control cells, as evaluated using the student's t -test.

어 24, 48, 72시간 동안 텍사메타손을 처리하였다.

세포 생존 분석

HLE-B3 세포를 well당 5×10^4 세포의 밀도로 24-well 배양 플레이트에 접종하고 24시간 동안 부착시켰다. 다음날, 세포를 24, 48, 72시간 동안 다양한 농도의 텍사메타손 (0, 0.01, 0.1 및 1 mg/mL)로 처리하였다. Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 세포 성장을 평가하였다. 10 μ L의 CCK-8 용액을 각 well에 첨가하고 95% 공기 및 5% CO₂의 가습 환경에서 37°C에서 1시간 동안 배양했다. 황색 formazan 염색량을 ELISA 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 이동성 분석

세포의 운동성은 wound healing assay chambers (ibidi GmbH, Munich, Germany)를 이용하여 측정하였다. FBS를

함유하는 DMEM에 현탁한 후, 4×10^4 개의 HLE-B3 세포를 각각의 well에 접종하고 24시간동안 배양 플레이트에 부착시켰다. 다음 날, wound assay chambers 제거하고 현미경 이미지를 얻었다. 그 후, 세포를 텍사메타손으로 6시간 동안 처리하고 위상차현미경을 사용하여 이미지화하였다. 이미지 분석은 Nikon NIS Elements (Nikon, Tokyo, Japan) 소프트웨어를 사용하였다.

Western blot assay

세포 추출물은 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 첨가된 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis 완충액 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 세포를 2분 동안 초음파 처리하고 4°C에서 10분 동안 12,000 g에서 원심 분리하여 불용성 세포 잔해를 제거하였다. 용해된 세포의 단백질 농도는 bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였

다. 총 50 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 겔 전기 영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼다. 각각의 blot에 fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology) 및 β -actin (Sigma-Aldrich)의 일차 항체를 배양하였다. 이후 이차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) 혹은 anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA)를 배양하였다. 각각의 신호는 Supersignal Chemiluminescent Substrate (Pierce)를 사용하여 시각화하였다. 이미지는 ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 획득하였고 농도 측정은 Image J (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하였다.

Real time (RT)-PCR array 분석

덱사메타손이 처리된 세포에서 84개의 인간 성장 인자 관련 유전자의 발현을 384개의 well (Qiagen, Valencia, CA, USA)에서 정량적 RT-PCR array를 사용하여 동시에 분석하였다(Table 1). 덱사메타손 0.1 mg/mL를 세포에 처리한 후 24, 48, 72시간 배양 후 RNeasy kit (Qiagen)를 사용하여

Table 2. List of over-expressed genes compared to control group

Treatment time (hours)	Symbol	Fold regulation	p-value*
24	CSPG5	1.9593	0.002
	FGF11	1.4945	0.018
	FIGF	2.7424	0.015
	GPI	1.2497	0.017
	IL12B	2.1265	0.022
	INHA	1.5887	0.038
	NODAL	1.8208	0.015
	SLCO1A2	2.0629	<0.001
48	CSPG5	2.3975	0.002
	FGF19	3.2913	0.035
	INHA	1.7735	0.010
	NODAL	2.0471	0.002
	NRTN	1.3215	0.026
72	BMP6	2.9498	0.011
	CSPG5	2.0076	0.004
	FGF9	4.9506	0.016

CSPG5 = chondroitin sulfate proteoglycan 5; FGF11 = fibroblast growth factor 11; FIGF = C-fos induced growth factor; GPI = glucose-6-phosphate isomerase; IL12B = interleukin 12B; INHA = inhibin, alpha; NODAL = nodal homolog; SLCO1A = solute carrier organic anion transporter family, member 1A2; NRTN = neurturin; BMP6 = bone morphogenetic protein 6.

*The p-values are calculated based on a student t-test of the replicate values for each gene in the control group and treatment groups.

Figure 3. The effect of dexamethasone on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HLE-B3. (A) Western blot of EMT marker revealed relative increase of fibronectin and α -smooth muscle actin (SMA) in dexamethasone treatment compared to control, while decrease of E-cadherin. (B) The graphs of densitometry showed mesenchymal markers (fibronectin, α -SMA) were increased and epithelial marker (E-cadherin) was decreased in dexamethasone group. CTL = control; Dex = dexamethasone. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$ versus control cells, as evaluated using the student's t -test.

Table 3. List of under-expressed genes compared to control group

Treatment time (hours)	Symbol	Fold Regulation	p-value*
24	BDNF	-2.2171	0.033
	BMP3	-1.4162	0.025
	BMP5	-14.1983	0.007
	DKK1	-2.2101	0.024
	FGF1	-5.3166	<0.001
	FGF2	-1.6152	0.034
	FGF5	-2.3940	0.001
	GDNF	-2.4611	0.009
	HBEGF	-4.7389	0.001
	IL11	-4.8919	0.001
	IL1B	-2.4053	0.004
	INHBA	-2.4999	0.001
	LIF	-3.0640	0.001
	NGF	-5.7235	0.001
	NRG1	-3.5381	<0.001
	NRG2	-2.0963	0.001
	PTN	-2.1381	0.003
48	BDNF	-2.6076	0.023
	BMP5	-24.348	0.005
	CSF2	-4.5479	0.015
	DKK1	-3.6360	0.003
	FGF1	-14.1946	<0.001
	FGF2	-1.8586	0.019
	FGF5	-3.1228	0.001
	GDNF	-4.2029	0.003
	GPI	-1.2300	0.042
	HBEGF	-7.2166	<0.001
	IL11	-5.8300	<0.001
	INHBA	-4.5339	<0.001
	LIF	-3.8573	<0.001
	NGF	-5.5075	0.001
	NRG1	-5.4341	<0.001
	NRG2	-1.8586	0.044
	NRTN	1.6124	0.026
	OSGIN1	-2.4951	0.030
	PGF	-2.1297	0.013
	PTN	-1.9103	0.006
	SLCO1A2	-1.7586	0.007
	TGFB1	-1.5063	0.012
	VEGFC	-1.3886	0.005

HLE-B3 세포에서 전체 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA에 오염된 Genomic DNA는 RNase-Free DNase set (Qiagen)을 이용하여 제거하였다. 총 RNA (5 µg)는 RT² First Strand Kit (Qiagen)을 사용하여 10 µL의 반응 부피의 cDNA로 변환하였다. 변환된 cDNA를 RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen) 및 증류수로 4,200 µL의 부피로 희석시켰다. 그 후, 10 µL의 cDNA를 인간 성장 인자 RT² Profiler PCR Array (Qiagen)의 각 primer 세트와 제조사의 프로토콜에 따라 결합시켰다. 증폭 반응은 ViiA7 Real-Time PCR System

Table 3. Continued

Treatment time (hours)	Symbol	Fold Regulation	p-value*
72	BDNF	-2.6342	0.022
	BMP1	-2.4719	0.022
	BMP3	-1.9116	0.017
	BMP5	-14.7667	0.007
	CSF2	-6.6266	0.011
	DKK1	-3.4652	0.003
	FGF1	-32.5026	<0.001
	FGF2	-2.6041	0.008
	FGF5	-4.2442	<0.001
	GDF11	-2.9371	0.032
	GDNF	-5.6102	0.003
	GPI	-2.6866	0.012
	HBEGF	-16.5348	<0.001
	IL11	-6.6797	<0.001
	IL1B	-3.0850	0.002
	INHBA	-5.4952	<0.001
	LIF	-4.7370	0.001
	NGF	-6.2932	0.001
	NRG1	-6.6517	<0.001
	OSGIN1	-3.3487	0.025
	PGF	-2.7404	0.020
	PTN	-2.8094	0.001
	TGFB1	-2.1278	0.024
	VEGFC	-1.3467	0.006

BDNF = brain-derived neurotrophic factor; BMP = bone morphogenetic protein; DKK = dickkopf homolog; FGF = fibroblast growth factor; GDNF = glial cell derived neurotrophic factor; HBEGF = heparin-binding EGF-like growth factor; IL = interleukin; INHBA = inhibin, beta A; LIF = leukemia inhibitory factor; NGF = nerve growth factor; NRG = neuregulin; PTN = pleiotrophin; CSF = colony stimulating factor; GPI = glucose-6-phosphate isomerase; NRTN = neurturin; OSGIN = oxidative stress induced growth inhibitor; PGF = placental growth factor; SLCO1A2 = solute carrier organic anion transporter family, member 1A2; TGFB1 = transforming growth factor, beta 1; VEGFC = vascular endothelial growth factor C.

*The p-values are calculated based on a student t-test of the replicate values for each gene in the control group and treatment groups.

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 자동화된 기준점 및 역치 주기 검출을 사용하였다. 성장 인자 관련 유전자의 상대적 발현은 4개의 내장된 housekeeping 유전자에 대해 정성화하였다. 각 그룹은 웹 기반 소프트웨어인 RT² Profiler PCR Array Data Analysis (SABiosciences Corp., Frederick, MD, USA)를 이용하여 비교하였으며, 이 소프트웨어에서 TargetScan 알고리즘과 miRBase의 miRNome의 검색을 통해 miRNA 조절 유전자 결과를 얻었다.

통계분석

정량화 가능한 결과는 최소 세 번의 독립적인 실험을 통

한 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism (version 6.0) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 사용하여 그래프를 작성하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

HLE-B3 세포 생존에 덱사메타손의 영향

각각 다른 농도의 덱사메타손(0.01, 0.1, 1 mg/mL)에 24, 48, 72시간 노출시킨 후 대조군과 비교하였을 때 0.01, 0.1 mg/mL의 농도에서는 세포 생존율이 감소 경향을 보였으나 이는 통계적인 의미가 없었으며, 1 mg/mL의 덱사메타손에 노출 시에는 24, 48, 그리고 72시간 모두에서 세포 생존이 유의하게 감소함을 보였다(Fig. 1).

HLE-B3 세포 창상 회복에 덱사메타손의 영향

덱사메타손을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 0.01, 0.1 mg/mL 농도의 덱사메타손에 6시간 노출 시 농도에 따른 세포 이동의 증가를 확인할 수 있었지만, 1 mg/mL 덱사메타손에 노출한 경우 대조군에 비해 세포의 이동의 감소가 의미 있게 나타났다(Fig. 2).

HLE-B3 세포의 상피-중간엽 이행에 덱사메타손의 영향

0.01과 0.1 mg/mL 농도의 덱사메타손에 24, 48, 72시간 노출시킨 후 epithelial-mesenchymal transition (EMT)에 관여하는 표지자들의 발현 변화를 확인해 본 결과, fibronectin은 덱사메타손 노출 후 48, 72시간의 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 것을 확인하였으며, α -SMA는 대조군에 비해 전반적으로 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로는 0.01 mg/mL의 농도로 24시간 처리한 군에서만 통계학적으로 의미 있는 증가를 보였다. 반면에 상피세포의 표지자인 E-cadherin의 mRNA의 발현은 모든 노출 시간과 농도에서 대조군에 비해 의미 있게 감소하는 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

PCR array 결과

PCR array에서 chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) 5가 덱사메타손 처리 후 24, 48, 72시간 모두에서 약 2배 (1.9593; 2.3975; 2.0076)로 발현 증가하였으며 24시간 노출 시 fibroblast growth factor (FGF) 11, C-fos induced growth factor (FIGF), glucose-6-phosphate isomerase (GPI), interleukin (IL) 12B, inhibin, alpha (INHA), nodal homolog

(NODAL), solute carrier (SLCO1A)2와 48시간 노출 시 FGF19, INHA, NODAL, neurturin (NRTN), 72시간 노출 시 bone morphogenetic protein (BMP) 6, FGF9이 의미 있게 증가하였다(Table 2). 반면에 brain-derived neurotrophic factor (BDNF), BMP5, dickkopf homolog (DKK) 1, FGF1, FGF2, FGF5, glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF), IL11, inhibin, beta A (INHBA), leukemia inhibitory factor (LIF), nerve growth factor (NGF), neuregulin (NRG) 1, pleiotrophin (PTN)은 모든 노출 시간에서 발현 감소를 보였으며, IL1B는 24, 72시간 덱사메타손 노출 시 감소하고 vascular endothelial growth factor C (VEGFC)는 48시간 덱사메타손에 노출 시 감소하는 소견을 보였다(Table 3). RT² Profiler PCR Array Data Analysis의 TargetScan 알고리즘과 miRBase의 miRNome의 검색을 통해 후보자 miRNA를 검색하여 표와 같은 결과를 얻었다(Table 4).

고 찰

본 연구에서 수정체 상피세포에서 스테로이드에 노출 시 EMT에 미치는 영향과 이를 PCR array를 이용하여 유전자들이 발현의 변화를 살펴보았다. 수정체 상피세포에 덱사메타손을 처리하면 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소하며, 세포의 이동과 상피-중간엽 이행 표지자의 발현 증가를 확인할 수 있었으며, PCR array에서 여러 성장인자들의 발현의 증가와 감소를 확인할 수 있었다.

장기간의 전신적 또는 국소 스테로이드의 사용은 백내장 발생을 증가시킨다고 알려져 있으며 특히 후낭하혼탁 백내

Table 4. Candidate miRNA regulating genes from RT² profiler data analysis software

miRNAs	Regulation	Target genes
miR-548k	Up	CSPG5
miR-302b-3p	Up	FGF19
miR-373-3p	Up	FGF19
miR-302a-3p	Up	FGF19
miR-520c-3p	Up	FGF19
miR-302c-3p	Up	FGF19
miR-302d-3p	Up	FGF19
miR-520d-3p	Up	FGF19
miR-520a-3p	Up	FGF19
miR-520b	Up	FGF19
miR-520e	Up	FGF19
miR-372-3p	Up	FGF19
miR-302e	Up	FGF19

RT = real time; CSPG5 = chondroitin sulfate proteoglycan 5; FGF19 = fibroblast growth factor 19.

장 발생에 연관성이 있다고 알려져 있다.^{4,5} 이전의 연구에서 국소 스테로이드를 점안 후 약 15-30분 후 전방수에서 스테로이드가 측정되는데, 0.1% mg/mL의 현탁액을 점안한 경우 91-120분에 최고 농도로 다다르며 이는 약 31 ng/mL 정도로 보고되고 점안 후 12시간까지 전방수에서 측정됨이 알려져 있다.⁸ 또한 전신적 스테로이드 사용 후 안구 조직 내로 이동되는 농도에 대한 동물 연구에서 전신으로 투여되는 스테로이드 양의 약 0.5-1%의 스테로이드가 안구 내에서 발견되는 것으로 알려져 있고 장기간 사용할수록 더 높은 양이 발견되는 것으로 보고되었다.⁹ 따라서, 류마티스 질환이나 흡입용 스테로이드를 사용하는 폐질환의 증가는 스테로이드 사용의 증가로 이어지고 이는 스테로이드 유발 백내장의 발생을 증가시키는 결과를 가져오게 된다.^{10,11} 따라서 평균 수명 증가에 따른 연령 증가는 연령에 따른 백내장과 더불어 스테로이드 유발 백내장 발생률의 증가가 예상된다. 하지만 이러한 임상적 중요성의 증가에도 스테로이드 유발 백내장의 발생 병리기전에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

스테로이드 유발 백내장의 발생 기전에 대해 수정체 글루티코르티코이드수용체의 역할에 대한 연구가 잘 알려져 있다.^{5,12-14} 사실 후낭하혼탁 형태로 발생하는 스테로이드 유발 백내장에서 원래 수정체상피세포가 존재하지 않는 후낭으로 세포가 이동할 수 있도록 이동성이 증가하여야 하며, 이후에 이동한 세포에서 상피-중간엽 이행이 발생하여 백내장이 생긴다고 한다.^{5,13,15} 본 연구에서도 수정체 상피세포에 독성을 유발하지 않는 스테로이드 농도(0.01, 0.1 mg/mL)에서 세포의 이동이 대조군에 비해 유의하게 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 스테로이드에 노출된 수정체 상피세포에서 EMT의 표지자인 fibronectin과 α -SMA를 유도하는 mRNA의 발현이 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였으며, 상피세포의 표지자인 E-cadherin의 mRNA의 발현은 의미 있게 감소함을 확인함으로써 스테로이드에 노출된 수정체 상피세포의 EMT 증가를 확인할 수 있었다.

상피-중간엽 이행과 관련된 성장인자들의 역할에 대해 많은 연구들이 있다. Jobling and Augusteyn⁴은 후낭하혼탁 백내장에서 처음으로 안구내 성장인자의 역할을 보고하였으며, 이들 중 수정체 상피세포의 증식과 섬유세포로의 분화에 관련된 성장인자로 FGF2, IGF1, EGF, TGF β , LEDGF, platelet derived growth factor (PDGF), BMP 등이 있다고 보고하고 있다.¹⁶⁻²⁷ 이번 연구에서 수정체 상피세포의 스테로이드 처리 후 PCR array를 통한 성장인자 분석 시 이미 알려진 성장인자 이외에도 BMP6, CSPG5, FGF9, FGF11, FGF19, FIGF, GPI, IL12B, INHA, NODAL, NRTN, SLC01A2가 대조군에 비해 의미 있게 증가하는 성장인자

로 나타났고, 반면에 BDNF, BMP5, DKK1, FGF1, FGF5, GDNF, HBEGF, IL11, INHBA, LIF, NGF, NRG1, PTN, VEGFC는 스테로이드를 처리한 수정체 상피세포에서 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

수정체 상피세포에 텍사메타손 처리 후 발현이 증가하는 성장인자들 중 특이한 것은 NGF나 CSPG와 같은 신경유래 성장인자들이 증가하거나 감소하는 등의 발현 변화가 관찰된 것이다. 우선 NGF는 텍사메타손 처리 후에 수정체 상피세포에서 발현이 감소하는 것으로 결과가 나왔다. NGF는 이전 연구에서 수정체상피세포에서 자체적으로 발현이 되며, 실험적으로 그 발현이 감소하는 것이 당에 의한 백내장 발생에 관여한다는 보고가 있는데,²⁸ 이는 이번 우리 연구와 일치하는 결과이다. 그리고 CSPG5는 발생 시기의 수정체 세포에서 발현이 되는데, 이때 장애가 발생 시 수정체의 형성에 문제를 일으키는 것으로 보고되었으며, FGF2와 연관되어 작용하는 것으로 알려져 있다.²⁹ CSPG5는 neuroglycan C라고도 불리며 망막색소상피세포와 신경세포에서 주로 발견되며, 쥐에서 망막변성에 관여하는 인자로 보고되었다.²⁹⁻³² 하지만 CSPG5의 신호전달 체계의 확립이 되어 있지 않으며, 수정체에 대한 역할의 보고는 없다. 따라서 CSPG5의 역할 규명은 수정체 상피세포의 상피-중간엽 이행에 대한 이해와 스테로이드 유발 백내장의 발생 기전에도 도움이 될 것으로 생각된다.

FGF는 수정체 상피세포의 증식과 섬유세포로의 분화를 촉진시키는 성장인자로 알려져 있으며,²⁷ PDGF가 Phosphoinositide 3-kinase와 Mitogen-Activated Protein Kinase 신호전달 체계를 통해 FGF의 수정체 상피세포에 대한 역할을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.³³ 본 연구에서 후보자 유전자로 선정된 FGF19은 아직까지 백내장 발생과 관련된 연구는 없으나 닭의 배아에서 눈 발생에 있어서 관여한다는 연구가 있으며,^{34,35} 제브라피시의 수정체의 발달에 FGF19이 관여하며,³⁶ FGF19-FGFR4 신호전달 과정을 통해 수정체 형성을 한다는 보고가 있어,³⁷ FGF19이 백내장 발생에도 관련이 있음을 추론해 볼 수 있겠다.

본 연구는 HLE-B3 세포를 이용한 연구로 일차세포가 아닌 세포계를 이용한 *in vitro* 실험이라는 제한점이 있으며, 이는 향후 *in vivo* 실험이나 수정체낭의 일차 배양을 통한 일차세포를 이용한 실험 등이 필요할 것으로 생각이 되며, 각각의 성장인자들의 역할과 신호전달체계에 대한 후속 연구가 필요하다. 결론적으로 수정체 상피세포에서 텍사메타손 노출은 세포 생존을 감소와 세포 이동과 관련된 인자들의 발현을 증가시키며, PCR array 방법은 스테로이드 유발 백내장에 관여하는 후보 물질을 발굴하고 이를 통해 스테로이드 유발 백내장의 억제 물질 발견 및 치료제 개발에 도

움이 될 것으로 판단이 된다.

REFERENCES

- Bourne RR, Stevens GA, White RA, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2013;1:e339-49.
- Brown GC, Brown MM, Menezes A, et al. Cataract surgery cost utility revisited in 2012: a new economic paradigm. *Ophthalmology* 2013;120:2367-76.
- West SK, Valmadrid CT. Epidemiology of risk factors for age-related cataract. *Surv Ophthalmol* 1995;39:323-34.
- Jobling AI, Augusteyn RC. What causes steroid cataracts? A review of steroid-induced posterior subcapsular cataracts. *Clin Exp Optom* 2002;85:61-75.
- James ER. The etiology of steroid cataract. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:403-20.
- Zaczek A, Zetterström C. Posterior capsule opacification after phacoemulsification in patients with diabetes mellitus. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:233-7.
- Praveen MR, Shah GD, Vasavada AR, et al. Posterior capsule opacification in eyes with steroid-induced cataracts: comparison of early results. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:88-96.
- Watson D, Noble MJ, Dutton GN, et al. Penetration of topically applied dexamethasone alcohol into human aqueous humor. *Arch Ophthalmol* 1988;106:686-7.
- Hyndiuk RA, Reagan MG. Radioactive depot-corticosteroid penetration into monkey ocular tissue. I. Retrobulbar and systemic administration. *Arch Ophthalmol* 1968;80:499-503.
- Best JH, Kong AM, Lenhart GM, et al. Association between glucocorticoid exposure and healthcare expenditures for potential glucocorticoid-related adverse events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2018;45:320-8.
- Nath T, Roy SS, Kumar H, et al. Prevalence of steroid-induced cataract and glaucoma in chronic obstructive pulmonary disease patients attending a tertiary care center in India. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2017;6:8-32.
- James ER, Robertson L, Ehlert E, et al. Presence of a transcriptionally active glucocorticoid receptor alpha in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5269-76.
- Lyu J, Kim JA, Chung SK, et al. Alteration of cadherin in dexamethasone-induced cataract organ-cultured rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2034-40.
- Gupta V, Wagner BJ. Expression of the functional glucocorticoid receptor in mouse and human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2041-6.
- Eshaghian J, Streeten BW. Human posterior subcapsular cataract. An ultrastructural study of the posteriorly migrating cells. *Arch Ophthalmol* 1980;98:134-43.
- Sue Menko A. Lens epithelial cell differentiation. *Exp Eye Res* 2002;75:485-90.
- Chamberlain CG, McAvoy JW. Induction of lens fibre differentiation by acidic and basic fibroblast growth factor (FGF). *Growth Factors* 1989;1:125-34.
- Ibaraki N, Lin LR, Reddy VN. Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2304-12.
- Reneker LW, Overbeek PA. Lens-specific expression of PDGF-A alters lens growth and development. *Dev Biol* 1996;180:554-65.
- Leenders WP, van Genesen ST, Schoenmakers JG, et al. Synergism between temporally distinct growth factors: bFGF, insulin, and lens cell differentiation. *Mech Dev* 1997;67:193-201.
- Klok E, Lubsen NH, Chamberlain CG, McAvoy JW. Induction and maintenance of differentiation of rat lens epithelium by FGF-2, insulin, and IGF-1. *Exp Eye Res* 1998;67:425-31.
- Bhuyan DK, Reddy PG, Bhuyan KC. Growth factor receptor gene and protein expressions in the human lens. *Mech Ageing Dev* 2000;113:205-18.
- Collison DJ, Duncan G. Regional differences in functional receptor distribution and calcium mobilization in the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2355-63.
- de Iongh RU, Gordon-Thomson C, Chamberlain CG, et al. TGFbeta receptor expression in lens: Implications for differentiation and cataractogenesis. *Exp Eye Res* 2001;72:649-59.
- de Iongh RU, Lovicu FJ, Overbeek PA, et al. Requirement for TGFbeta receptor signaling during terminal lens fiber differentiation. *Development* 2001;128:3995-4010.
- Le AC, Musil LS. FGF signaling in chick lens development. *Dev Biol* 2001;233:394-411.
- Lovicu FJ, McAvoy JW. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development* 2001;128:5075-84.
- Ghinelli E, Aloe L, Cortes M, et al. Nerve growth factor (NGF) and lenses: effects of NGF in an in vitro rat model of cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:845-51.
- Gato A, Martin C, Alonso MI, et al. Chondroitin sulphate proteoglycan is involved in lens vesicle morphogenesis in chick embryos. *Exp Eye Res* 2001;73:469-78.
- Inatani M, Tanihara H, Oohira A, et al. Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in retinal neural network formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4338-46.
- Escher P, Cottet S, Aono S, et al. Differential neuroglycan C expression during retinal degeneration in Rpe65^{-/-} mice. *Mol Vis* 2008;14:2126-35.
- Cottet S, Jüttner R, Voirol N, et al. Retinal pigment epithelium protein of 65 kDa gene-linked retinal degeneration is not modulated by chicken acidic leucine-rich epidermal growth factor-like domain containing brain protein/Neuroglycan C/ chondroitin sulfate proteoglycan 5. *Mol Vis* 2013;19:2312-20.
- Li H, Mao Y, Bouaziz M, et al. Lens differentiation is controlled by the balance between PDGF and FGF signaling. *PLoS Biol* 2019;17:e3000133.
- Kurose H, Bito T, Adachi T, et al. Expression of fibroblast growth factor 19 (Fgf19) during chicken embryogenesis and eye development, compared with Fgf15 expression in the mouse. *Gene Expr Patterns* 2004;4:687-93.
- Francisco-Morcillo J, Sánchez-Calderón H, Kawakami Y, et al. Expression of Fgf19 in the developing chick eye. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;156:104-9.
- Kurose H, Okamoto M, Shimizu M, et al. FGF19-FGFR4 signaling elaborates lens induction with the FGF8-L-Maf cascade in the chick embryo. *Dev Growth Differ* 2005;47:213-23.
- Nakayama Y, Miyake A, Nakagawa Y, et al. Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development. *Dev Biol* 2008;313:752-66.

= 국문초록 =

스테로이드 노출 수정체 상피세포에서 종합효소연쇄반응 방법을 통한 유전자의 발현 변화

목적: 수정체 상피세포에 덱사메타손을 처리한 후 polymerase chain reaction (PCR) array를 이용하여 84개 유전자들의 발현 변화를 조사하였다.

대상과 방법: 수정체 상피세포에 0.01, 0.1, 1 mg/mL 농도의 덱사메타손을 처리한 후 세포생존율과 이동성 변화를 조사하였으며, fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin 발현 확인을 위한 Western blot를 시행하였다. 그리고 0.1 mg/mL 농도의 덱사메타손을 24, 48, 72시간 처리한 후 84개 성장 인자의 발현 변화를 PCR array로 조사하였다.

결과: 덱사메타손 0.01과 0.1 mg/mL 농도에서 세포생존율의 의미있는 변화는 관찰되지 않았으며, 1 mg/mL 농도에서는 현저한 세포 독성을 나타내었다. 세포 이동성은 덱사메타손 0.01과 0.1 mg/mL 농도에서 농도 의존적으로 증가하였다. Western blot에서 fibronectin은 덱사메타손의 모든 농도, α -SMA는 0.01 mg/mL에서 의미 있게 증가하였으며, E-cadherin 은 모든 농도에서 의미 있는 감소를 나타내었다. PCR array에서 FGF1, FGF2, IL-11 등과 세포자멸사에 관여하는 인자인 GDNF, IL-1 β , NRG2, 그리고 세포 분화와 관련된 BMP5, FGF1, FGF2, FGF5는 2배 이상 감소하였고, FGF9, FGF19은 2배 이상 증가하였다. 발달 조절 인자인 BDNF, NGF, DKK1, NRG1, NRG2, LIF, INHBA는 2배 이상 감소하였고 CSPG5, FIGF, NODAL은 2배 이상 증가하였다.

결론: 수정체 상피세포에서 덱사메타손 노출시킨 후 실시한 PCR array를 통해 스테로이드 유발 백내장에 관여하는 후보 물질을 발굴하는 데에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2020;61(5):472-481〉

유웅선 / Woong-Sun Yoo

경상대학교 의과대학 경상대학교병원 안과학교실
Department of Ophthalmology, Gyeongsang
National University Hospital, Gyeongsang
National University College of Medicine