고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP 발현과 염증인자들에 대한 두릅의 효과

Effect of Aralia Elata on the Expression of Hyperosmolarity-induced TonEBP Protein and Inflammatory Mediators in Corneal Epithelial Cells

김성재^{1,2} · 박미화¹ · 유웅선^{1,2} · 홍은경³ · 최미영^{2,4} · 최완성^{2,4}

Seong-Jae Kim, MD, PhD^{1,2}, Mi Hwa Park, MD¹, Woong-Sun Yoo, MD^{1,2}, Eun-Kyung Hong, PhD³,
Mee Young Choi, MS^{2,4}, Wan Sung Choi, PhD^{2,4}

경상대학교 의과대학 경상대학교병원 안과학교실¹, 경상대학교 건강과학연구원², 주식회사 메드빌³,
경상대학교 의과대학 해부학교실 융합의과학과⁴

Department of Ophthalmology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang National University College of Medicine¹, Jinju, Korea
Gyeongsang Institute of Health Science, Gyeongsang National University², Jinju, Korea

Medvill Co., Ltd.³, Seoul, Korea

Department of Anatomy and Convergence Medical Science, Gyeongsang National University College of Medicine⁴, Jinju, Korea

Purpose: To investigate the effect of *Aralia elata* (AE) on hyperosmolar stress-induced tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP) expression and changes in the levels of proinflammatory cytokines in immortalized human corneal epithelial cells (hCECs).

Methods: Immortalized hCECs were cultured with either 5 or 10 µg/mL AE for 24 hours, and the medium then changed to a hyperosmotic medium (500 mOsm/L). After hyperosmolar treatment, cell viability and wound-healing assays were performed, and cell proteins subjected to Western blot analysis, immunocytochemistry for TonEBP and NF-κB, and tests measuring changes in the levels of oxidative stress markers and inflammatory mediators.

Results: AE pretreatment ameliorated hyperosmolarity-induced cell death and the delay in wound-healing in a dose-dependent manner. AE inhibited TonEBP and phospho-NF-κB p65 subunit upregulation. AE significantly decreased the expression levels of Bax, 4-HNE, and IL-1β; but increased those of Bcl-2, Bcl-xl, and Gpx.

Conclusions: AE increased cell viability and wound-healing, and inhibited the hyperosmolar stress-induced upregulation of TonEBP and NF-κB. AE may be useful for treatment of patients with certain ocular surface diseases.

J Korean Ophthalmol Soc 2021;62(2):164-172

Keywords: Aralia elata, Corneal epithelium, Hypertonic stress Inflammation, Tonicity response enhancer-binding protein

■ Received: 2020. 8. 20. ■ Revised: 2020. 9. 8.

■ Accepted: 2021. 1. 29.

■ Address reprint requests to **Wan-Sung Choi, PhD**
Department of Anatomy and Convergence Medical Science,
Gyeongsang National University School of Medicine, #15
Jinju-daero 816beon-gil, Jinju 52727, Korea
Tel: 82-55-772-8031, Fax: 82-55-772-8039
E-mail: choiws@gnu.ac.kr

* This work was supported by National Research Foundation:
(Grant Number MAFRA [117082-03]).

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

안구건조증은 안과 의사들이 임상에서 가장 흔히 접하는 질환이며, 안구 불편감이나 시야 흐림 등으로 환자들의 일상 생활에 지장을 줄 뿐만 아니라, 각막궤양이나 각막혼탁, 시력손상, 그리고 실명 등의 심각한 합병증도 유발할 수 있다.¹ 더불어, 많은 의료 비용이 지출됨으로써 환자 개인뿐만 아니라 사회경제적으로도 문제가 되는 질환이다.² 대부분의 안구건조증은 안구표면의 항상성이 파괴되고, 눈물내 삼투압이 증가하며, 그 결과 사이토카인들의 생성 증가하

여 염증을 초래하게 된다.³⁻⁵ 따라서 안구건조증 치료를 위해서는 저장성이나 등장성의 인공누액을 사용하여 안구건조증의 증상을 감소시키거나, 항염증 효과가 있는 안약을 임상적으로 사용하고 있다.⁶

Tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP)는 Nuclear factor of activated T cells (NFAT5)라고도 불리는 전사인자로서, 세포가 고삼투압에 노출될 때 세포내 용질들을 증가시켜 세포 부피를 유지함으로써 세포사를 막아주는 역할을 하며, 눈에서는 각막상피세포가 고삼투압에 노출되었을 때도 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다.^{7,8} 최근에는 TonEBP가 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 등의 염증 인자들의 활성을 통해 오히려 염증을 유발시킬 수 있다는 보고도 있다.⁹ 두릅은 우리나라를 비롯한 동아시아 지역에 재배되는 작물로, 그 추출물은 NF- κ B 등의 염증 인자들의 활성을 억제하고 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰ 저자들도 이전 연구에서 두릅이 TonEBP의 활성을 억제함으로써 항염증 효과를 보이고, 실험적으로 당뇨망막병증의 진행을 억제한다는 것을 보고한 바가 있다.^{11,12} 따라서 저자들은 배양된 각막상피세포를 이용하여 고삼투압에 노출 후 세포생존성이나 창상 회복 정도, 그리고 TonEBP나 NF- κ B 등의 염증 인자들의 발현에 두릅이 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

대상과 방법

각막상피세포 배양과 고삼투압 노출

인간각막상피세포(human corneal epithelial cells [HCECs], American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 이용하여 25에서 30세대 사이의 세포를 이용하였다. Keratinocyte-SFM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)에 human corneal growth supplement (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), 100 units/mL penicillin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 및 100 μ g/mg streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)을 첨가한 세포배양액을 1-2일 간격으로 교체하였다. 6-well 배양접시에 HCECs를 1×10^5 /mL로 배양한 후 24시간 뒤에 NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 다양한 농도의 삼투압(350, 400, 450, 500, 550 mOsm/L) 용액을 만들어 각각 처리한 다음, 24시간까지 배양한 후 세포의 모양을 현미경으로 관찰하였다.

농도별 두릅추출물 처리

두릅은 이전 연구에 기술한 바와 같이 추출되었으며,

Medvill Co. Ltd. (Seoul, Korea)에서 제공받아 실험을 진행하였다.¹³ 추출 방법을 간단히 설명하면, 두릅(*Aralia elata*)을 채취한 후, 그 피질을 작은 조각(400 g)으로 잘게 썰고 증류수(400 mL)에 24시간 동안 담근다. 여기서 만들어진 여과액을 1시간 동안 압력(15lb/in.²)을 가하고 증기로 포화시킨 다음, 응고된 단백질을 포함하는 침전물은 원심분리로 제거하였다. 그 후 상층액을 동결 건조하게 되면 이를 두릅 추출물(*Aralia extract*)이라고 한다. 이것은 수분을 약 7% 포함하고 있는 가루 형태이며, 세포 실험 등을 위해서는 phosphate-buffered saline (PBS)에 용해시켜 처리한다. 앞에서 확인한 결과를 바탕으로, 삼투압의 농도는 500 mOsm/L로 정하고, 두릅의 농도는 세포생존의 저해를 일으키지 않는 두 농도(5, 10 μ g/mL)를 정하여, 두릅과 삼투압을 동시 처리하고 24시간 뒤 확인하는 방법과 두릅을 전처리한 후 24시간 뒤에 삼투압 용액을 처리하고 세포생존성을 확인하였다.

세포생존성의 측정(Cell viability assay)

고삼투압 용액과 두릅의 농도별 세포생존성을 측정하기 위하여 세포 부유액을 세포수 측정기를 이용하여 측정한다. 다음, 1×10^5 /mL로 24 well의 배양접시에 세포 부유액 500 μ L를 넣고 24시간 동안 배양한다. 이후 고삼투압 용액(350, 400, 450, 500, 550 mOsm/L)과 두릅(5, 10, 50, 100, 200 μ g/mL)을 각각의 농도별로 처리하고, 24시간 동안 다시 배양한 뒤 고삼투압 용액과 두릅을 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 200 μ L를 첨가하였다. 이때부터는 빛을 차단해주고 4시간 동안 37°C 양기에서 배양한 다음, MTT 용액을 조심스럽게 제거하고, 200 μ L의 DMSO를 첨가하여 shaker (Orbital shaker, FINEPCR, Gunpo, Korea)를 이용하여 3단계의 속도로 15-20분간 흔들어 준 뒤, 용액 100 μ L씩 96-well plate에 옮겨 담아 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

창상 회복 정도 검사(Wound healing assay)

먼저 창상 회복 정도 검사는 카세트(cat. No 80209 ibidi GmbH, Gräfelting, Germany)를 사용하여 진행하였다. 실험 방법은 우선, 6 well의 배양 접시에 그룹별(n=4)로 각각 카세트를 2개씩 붙인 다음, 각 카세트에 2.5×10^4 /100 μ L의 세포부유액을 투여하고, 카세트 주위는 배지로 채워준다. 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양 후, 카세트를 제거하고 두릅을 농도별로 먼저 전처리한다. 이후 고삼투압 용액을 처리한 다음 시간별로 현미경을 이용하여 촬영하였다.

각막상피세포에서 고삼투압 노출 후 TonEBP 발현과 세포자멸사, 산화스트레스 및 염증사이토카인의 발현 변화 세포 부유액을 세포수 측정기를 이용하여 측정한다. 다음, $1 \times 10^5/\text{mL}$ 로 6 well의 배양접시에 각각 세포 부유액 2 mL를 넣고 24시간 동안 배양한다. 두 그룹을 농도별로 전처리한 후, 24시간 뒤 고삼투압 용액을 처리한다. 다음, 24시간 동안 배양하고 PBS를 이용하여 세척한다. 원심분리($3,000 \text{ rpm} \times 3 \text{ minutes}$)를 실시하여 세포를 모으고, 세포 용해 용액을 각각 약 20 μL 를 넣고 피펫으로 세포를 용해시킨다. 튜브가 튕겨 얼음에 들어가면서 용해시키고 20분 동안 얼음에 보관한다. 다음, 초음파를 이용하여 30초씩 세포 용해를 시

키고 얼음에 1분 두는 것을 3회 반복한다. 다시 얼음에 20분 동안 넣어둔 후, 원심분리($12,000 \text{ rpm} \times 4^\circ\text{C}$)를 30분 동안 실시하여 상층액을 얻고, 정량하여 실험을 진행한다. 만들어진 겔에 시료를 넣고 전기 영동을 진행한 다음, nitrocellulose 종이에 전달한다. Blot을 3% BSA로 blocking을 한 다음 실험하고자 하는 1차 항체를 넣고 4°C overnight 배양을 한 다음, 2차 항체를 붙인 후 enhanced chemiluminescence 용액을 이용하여 발현을 확인하였다. 여기에 사용된 항체는 다음과 같다. 1차 항체로는 TonEBP (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA; 1:1,000), phospho-NF- κ B p65 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA,

Figure 1. Changes of cell morphology according to hyperosmolar stress concentrations. Scale bar length 100 μm . CTL = control.

Figure 2. Changes of cell viability after exposure of hyperosmolar stress (A) and treatment of *Aralia elata* (B). CTL = control. * $p < 0.001$ (vs. CTL).

USA; 1:1,000), Bax (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA; 1:1,000), Bcl-xl (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA; 1:1,000), 4-hydroxynonenal (4-HNE, Abcam, England; 1:1,000), glutathione peroxidase (GPx; mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA; 1:1,000), interleukin (IL)-1 β (Cell

Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA; 1:1,000), 그리고 β -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1:10,000)이었다. 2차 항체는 TonEBP와 GPx는 goat anti-mouse 항체 (Thermo Scientific/Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하고, NF- κ B p65, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, 4-Hydroxynonenal

Figure 3. Comparison of differences in cell viability between simultaneous (A) and pre- (B) treatment of *Aralia elata* on human corneal epithelial cells after exposure of hyperosmolar stress (HS) (500 mOsm). CTL = control; A5 = *Aralia elata* 5 μ g/mL; A10 = *Aralia elata* 10 μ g/mL. * p < 0.001 (vs. CTL); † p < 0.001 (vs. HS).

Figure 4. Differences in wound healing according to the concentrations of *Aralia elata* pretreatment (A, B). CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsm); A5 = *Aralia elata* 5 μ g/mL; A10 = *Aralia elata* 10 μ g/mL. * p < 0.001 (vs. CTL); † p < 0.001 (vs. HS).

(4-HNE), 그리고 IL-1 β 는 goat anti-rabbit 항체(Thermo Scientific/Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하였다.

세포면역형광염색(Fluorescence immunocytochemistry)

배양한 세포를 고삼투압 용액으로 처리하고 PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 고정한다. PBS로 다시 세척한 후 0.1% Triton X-100/PBS 용액에서 10분 동안 배양한 다음 다시 세척을 시행한다. TonEBP (mouse monoclonal, 1:100) 1차 항체를 이용하여 처리한 다음, 4°C에서 overnight 배양한다. PBS를 이용하여 세척한 다음, goat-anti-mouse IgGs conjugated Alexa (1:1,000) 2차 항체를 처리하고 촬영하였다.

통계적 분석

통계적 분석은 GraphPad Prism software ver. 5.02 (GraphPad PRISM Software Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

결 과

고삼투압 노출에 따른 세포의 변화

배양된 각막상피세포에 350에서 550 mOsm/L까지 농도

의 NaCl을 처리하고, 24시간 배양을 실시한 후 세포 모양의 변화를 관찰하였다. 500 mOsm/L 농도에서 세포의 모양은 원형으로 변하고 탈락하는 세포가 증가하였으며, 550 mOsm/L 농도에서는 그 세포 수가 두드러지게 증가한 것을 확인하였다(Fig. 1). MTT로 측정한 세포생존의 변화에서는 500 mOsm/L 농도에서 대조군에 비해 47.9% 이하($p < 0.001$)로 유의하게 감소하였으며 550 mOsm/L에서는 26.0% 이하($p < 0.001$)로 감소하였다. 따라서 이후 실험에서 고삼투압 처리 농도를 500 mOsm/L로 정하여 처리하였다(Fig. 2A).

두릅 처리 농도에 따른 세포생존성의 변화

각막상피세포에 두릅을 농도별로 처리하여 독성 농도를 확인하였다. 5와 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 각막상피세포의 생존율에는 변화가 없었지만, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 통계적으로 유의하지는 않지만 대조군에 비해 약 93.5% 정도로 세포수가 감소하기 시작했고($p = 0.43$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 15% 이하로 통계적으로 유의하게($p < 0.001$) 감소하는 것을 확인하였다(Fig 2B). 따라서 이후 실험에서 두릅의 처리 농도를 세포 생존을 낮추지 않는 농도인 5 $\mu\text{g/mL}$ 과 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 정하였다. 고삼투압에 노출 후 두릅이 각막상피세포의 생존성에 미치는 효과를 확인하기 위해 5 $\mu\text{g/mL}$ 과 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 동시 처리한 군과 24시간 전에 전처리한 군의 세포생존성을 비교하였다. 그 결과 동시 처리군에서는 세포생존성

Figure 5. Western blot analysis (A) and graphs of expression changes of tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP) (B), p-NF- κ B p65 (C), apoptosis markers (Bax [D], Bcl-2 [E], and Bcl-xl [F]), oxidative stress markers (4-hydroxynonenal [4-HNE, G], glutathione peroxidase [GPx, H]), and inflammatory cytokine (interleukin [IL]-1 β [I]). CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsm); A5 = Aralia elata 5 $\mu\text{g/mL}$; A10 = Aralia elata 10 $\mu\text{g/mL}$. * $p < 0.001$ (vs. CTL), † $p < 0.001$ (vs. HS).

에 미치는 효과가 없었지만, 전리 군에서는 5와 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도 모두에서 통계적으로 유의하게 향상되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이후의 실험에서는 두릅을 투여한 군은 24시간 이전에 전처리한 각막상피세포를 이용하였다.

창상 회복에 두릅의 효과

고삼투압에 노출된 각막상피세포는 거의 세포이동이 없었던 반면, 5 $\mu\text{g/mL}$ 과 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 두릅을 24시간 전에 전처리한 군에서 농도 의존적으로 세포이동이 유의하게 증가한 것을 확인하였다(Fig. 4).

각막상피세포의 고삼투압 노출에 따른 TonEBP 발현 및 세포사멸사와 염증에 미치는 두릅의 영향

각막상피세포에 고삼투압 스트레스가 주어졌을 때 TonEBP의 변화를 확인한 결과, TonEBP의 발현이 증가하였으며, TonEBP의 아래 신경전달체계에 속하는 p-NF- κB p65의 발현 또한 증가하는 것을 확인하였다. 각막상피세포에 두릅을 전처리한 경우에는 농도 의존적으로 이 두 물질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 각막상피세포를 고삼투압에 노출 시 Bax의 발현은 증가하고, Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 감소함으로써 세포자멸사가 증가하는 것을 확인하였

Figure 6. Fluorescence immunocytochemistry for tonicity response enhancer-binding protein (TonEBP), terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in human corneal epithelial cells. Cells were treated with *Aralia elata* (AE; 5 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively) before exposure to hyperosmotic media (500 mOsm) for 24 hours. TonEBP and TUNEL were co-stained and pretreatment of AE ameliorates the hyperosmolarity-induced cell death and up-regulation of expression and nuclear translocation of TonEBP. Scale bar length 100 μm . CTL = control; HS = hyperosmolar stress (500 mOsm); A5 = *Aralia elata* 5 $\mu\text{g/mL}$; A10 = *Aralia elata* 10 $\mu\text{g/mL}$.

으며, 두름을 전처리한 군에서는 Bax의 발현이 감소하고, Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 5A, D-F). 두름이 산화스트레스에 미치는 영향을 분석하기 위해서 산화스트레스 표지인자인 4-HNE와 항산화 효소인 GPx의 발현을 살펴본 결과, 고삼투압에 노출된 후 증가한 4-HNE는 두름 전처리를 한 군에서는 통계적으로 유의하게 감소한 반면, GPx는 고삼투압에서 감소하였다가 두름을 전처리하게 되면 회복하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A, G, H). 뿐만 아니라 염증 사이토카인의 일종인 IL-1 β 의 발현에서도 고삼투압 환경에 노출되면 증가하지만, 두름을 전처리하게 되면 그 발현 양이 감소함을 확인할 수 있었다.

마지막으로, TonEBP의 발현과 세포사와의 관련성을 확인하기 위해 형광세포염색을 실시하였으며, 그 결과 고삼투압에 노출되게 되면 세포질에 있던 TonEBP가 핵내로의 이동이 증가하며, TUNEL과 같이 TonEBP가 염색이 일치하여, 세포사가 일어나는 과정에 TonEBP가 관여함을 확인할 수 있었으며, 이러한 변화는 두름을 전처리한 군에서는 감소하는 것이 확인되었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구에서 두름은 배양된 각막상피세포가 고삼투압 환경에 노출 시 TonEBP의 발현과 핵내로의 이동을 억제하고 NF- κ B의 활성은 감소시킴으로써, 세포생존성과 이동성을 증가시킬 뿐만 아니라, 산화스트레스나 염증 인자들의 활성을 줄여주는 효과가 있음을 확인하였다. 최근의 TFOS DEWSII에서는 안구건조증은 눈물층의 항상성이 손상되는 질환으로 눈물의 고삼투성 변화가 안구 표면 염증 등을 악화시키는 인자로 설명하고 있다.¹⁴ 여러 임상 연구에서 안구건조증이 심할수록 눈물의 삼투압 절대치가 높으며, 두 눈 간이나 방문시마다 눈물의 삼투압 측정값들의 변이가 높아진다고 한다.¹⁵ 정상적으로 TearLab® (TearLab Corp., Escondido, CA, USA)을 이용하여 측정한 눈물의 삼투압은 302.2 ± 8.3 mOsm/L이고, 안구건조증에서 315 mOsm/L까지 증가하지만 400 mOsm/L 이상 측정되는 경우는 드문 것으로 알려져 있다.^{16,17} 하지만 눈물피보다는 각막표면의 삼투압은 더 높을 것으로 생각이 되며, 심한 안구건조증의 경우 국소적으로 900 mOsm/L까지 상승할 수 있다는 보고도 있다.^{3,18} 또한 다른 연구들에서도 *in vitro* 모델로서 각막상피세포에 약 500 mOsm/L의 고삼투용액을 처리하여 실험을 진행한 보고들이 있다.^{19,20} 각막상피세포를 고삼투압 환경에 노출시키게 되면 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2), p38 kinase, c-Jun N-terminal kinase 1/2 (JNK 1/2) 등의 신호전달체계가 활성화되고, tumor necrosis

factor- α (TNF- α), IL-1 β , NF- κ B, IL-6, 그리고 IL-8 등의 염증 사이토카인 등이 증가한다.²¹ 본 연구에서도 500 mOsm의 고삼투압 환경에 각막상피세포가 노출되면, 세포생존성이 50% 이하로 감소하고, Bax의 발현은 증가하면서 Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 감소하여 세포자멸사가 증가하는 것이 확인되었다. 그리고 산화스트레스 표지인자인 4-HNE는 증가하고 항산화효소인 GPx의 발현은 감소하였고, 염증 사이토카인의 일종인 IL-1 β 의 발현은 증가하였다. 실험적으로 안구건조증에서 발생한 고삼투압 환경이 삼투압 변화에 민감한 TonEBP의 발현을 증가시킨다는 보고가 있으며, TonEBP가 안구 표면이나 눈물샘의 염증에 관여한다는 연구도 있다.^{8,22} 따라서 안구표면을 이루는 세포나 조직에서 고삼투압 환경에 노출 시 발현이 증가하는 TonEBP를 억제할 수 있다면, 안구표면염증을 줄이고 안구건조증 발생을 악화시키는 악순환의 고리를 끊을 수 있을 것이다.

본 연구에서 고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP의 발현이 늘어나고, 핵내로의 이동 또한 증가하는 것을 확인하였다. 형광세포염색에서 TonEBP의 발현이 TUNEL 양성인 세포에서 동시에 염색되는 것을 볼 때(Fig. 6), TonEBP가 고삼투압에 의해 유래된 각막상피세포 자멸사와 관련이 있음을 간접적으로 보여준다. 사실 TonEBP는 약 20년 전에 신장 수질에서 고삼투압 환경에 적응하기 위한 세포들의 전사인자로서 처음 발견되었으며, 고삼투압에 노출 시 세포 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.²³ TonEBP의 활성은 myo-inositol, betaine, taurine, 그리고 sorbitol과 같은 주요한 용질들의 세포내 농도를 증가시킴으로써, 고삼투압 환경에서 세포를 보호하는 역할을 하였다.²⁴ 하지만 이러한 용질들 자체의 세포 내 증가나 이에 작용하는 aldose reductase와 같은 효소들의 증가가 오히려 세포독성을 일으킬 수 있다는 보고가 있다.⁹ 최근에는 TonEBP의 활성이 고혈압이나 당뇨병성 신증과 같은 당뇨병병증의 발생이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환, 그리고 간암 등의 종양 질환의 발생 기전에 관여한다는 보고들도 있다.^{9,25,26} 동물을 이용한 기능적인 연구에서도 TonEBP heterozygotes 쥐에서는 자가면역질환을 유도하게 되면 증상이 약하게 발현되고, 당뇨병성 신증이나 인슐린 저항성도 적게 생기며, 간암의 유병률도 낮아지는 것이 확인되었다.^{9,25,26} 또한 p38 MAPK의 활성화에 TonEBP가 관여함으로써, NF- κ B의 활성화에 영향을 주어 염증을 유발하거나 세포사를 일으키는 것도 잘 알려져 있다.²⁷ 두름이 이러한 TonEBP의 발현을 억제하여 NF- κ B의 활성을 낮춤으로써 당뇨병망막증에서 신경보호 효과가 있다는 보고가 있다.¹¹ 따라서, 본 실험 결과와 같이 두름이 각막상피세포가 고삼투압에 노출되었을 때 증가한 TonEBP의 발현을 억제할 수

있다면, 안구표면의 염증이나 세포사를 억제함으로써 안구 표면질환의 치료제로써 활용될 수 있는 근거가 될 것으로 생각이 된다.

두릅은 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등 동아시아에서 당뇨 조절 효과가 있어 전통적으로 약물로 이용되기도 하였다.¹³ 실제, 실험적으로 당뇨 유발 쥐에서 혈당을 감소한다는 보고가 있으며, 당뇨망막증의 진행을 억제한다는 연구도 있다.^{11,12,28} 본 실험에 사용된 두릅의 경우에는 high-performance liquid chromatography를 이용하여 분석한 결과 항산화 작용과 항염증 작용이 있는 3,4-dehydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, 그리고 caffeic acid 등을 함유하고 있어, 세포보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다.^{13,28} 그리고, 두릅은 aldose reductase 등의 효소 활성을 저하시킴으로써 당노백내장 발생을 억제할 수 있고, TNF- α 나 NF- κ B 등 염증유발 인자들의 활성을 농도의존적으로 감소시키는 효과도 보고되고 있다.^{13,28} 실험적으로 유발된 당뇨망막병증에서 망막신경절세포사에 두릅이 TonEBP의 발현을 줄이고 NF- κ B 등의 염증인자들을 감소시킴으로써 신경보호 효과가 있다는 연구도 있다.^{11,12} 본 연구의 결과에서도 두릅은 TonEBP와 활성화된 NF- κ B인 p-NF- κ B p65의 발현을 감소시키고, Bax의 발현의 감소와 Bcl-2와 Bcl-xl 발현의 증가 등의 효과로 세포자멸사를 줄여주는 효과가 있었다. 그리고, 4-HNE나 IL-1 β 는 감소시키면서, GPx의 발현은 증가시키는 등의 항산화 효과와 항염증 효과가 있음을 보여주었다. 결국, 두릅은 안구건조증에서 고삼투압의 환경에 각막상피세포가 노출된다면 TonEBP와 NF- κ B의 발현을 감소시키고, 항산화와 항염증 효과를 보여 세포보호작용을 함으로써 안구건조증 치료 약물로 사용될 수 있을 것이다.

하지만, 두릅의 고삼투압에 노출된 각막상피세포의 보호 기전을 정확하게 판단하기 위해서는 두릅에 포함된 3,4-dehydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 등의 단일 화합물과의 효과를 비교해 보아야 할 것이다. 그리고 안구건조증 동물 모델 등을 이용하여 전신적으로나 안약 점안제로 두릅을 투여하여 실제 안구건조증 완화 효과가 있는지 확인하는 실험도 필요하다. 결론적으로 두릅은 각막상피세포가 고삼투압 환경에 노출되었을 때, TonEBP와 NF- κ B의 발현을 감소시키고 항염증과 항산화 효과를 보여 세포보호작용이 있으며, 추후 안표면의 염증성 질환의 치료제 또는 예방제로 사용될 수 있는 가능성이 있겠다.

REFERENCES

- 1) Farrand KF, Fridman M, Stillman IO, Schaumberg DA. Prevalence of diagnosed dry eye disease in the United States among adults aged 18 years and older. *Am J Ophthalmol* 2017;182:90-8.
- 2) Pflugfelder SC. Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease. *Am J Manag Care* 2008;14(3 Suppl):S102-6.
- 3) Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf* 2017;15:438-510.
- 4) Guzmán M, Miglio M, Keitelman I, et al. Transient tear hyperosmolarity disrupts the neuroimmune homeostasis of the ocular surface and facilitates dry eye onset. *Immunology* 2020;161:148-61.
- 5) Pan Z, Wang Z, Yang H, et al. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:485-93.
- 6) Jones L, Downie LE, Korb D, et al. TFOS DEWS II management and therapy report. *Ocul Surf* 2017;15:575-628.
- 7) Halterman JA, Kwon HM, Wamhoff BR. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302:C1-8.
- 8) Sawazaki R, Ishihara T, Usui S, et al. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:2547-56.
- 9) Lee N, Kim D, Kim WU. Role of NFAT5 in the immune system and pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol* 2019;19:270.
- 10) Zhou P, Xie W, Luo Y, et al. Protective effect of total saponins of *Aralia elata* (Miq.) on endothelial cell injury induced by TNF- α , via modulation of the PI3/Akt and NF- κ B signaling pathways. *Int J Mol Sci* 2018;21:36.
- 11) Kim SJ, Yoo WS, Kim H, et al. *Aralia elata* prevents neuronal death by downregulating tonicity response element binding protein in diabetic retinopathy. *Ophthalmol Res* 2015;54:82-95.
- 12) Kim SJ, Kim MJ, Choi MY, et al. *Aralia elata* inhibits neurodegeneration by downregulating O-GlcNAcylation of NF- κ B in diabetic mice. *Int J Ophthalmol* 2017;10:1203-11.
- 13) Chung YS, Choi YH, Lee SJ, et al. Water extract of *Aralia elata* prevents cataractogenesis in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2005;101:49-54.
- 14) Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf* 2017;15:276-83.
- 15) Pflugfelder SC, de Paiva CS. The pathophysiology of dry eye disease: what we know and future directions for research. *Ophthalmology* 2017;124:S4-13.
- 16) Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6125-30.
- 17) Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2011;151:792-8.e1.
- 18) Begley CG, Himebaugh N, Renner D, et al. Tear breakup dynamics: a technique for quantifying tear instability. *Optom Vis Sci* 2006;83:15-21.
- 19) Park B, Lee IS, Hyun SW, et al. The protective effect of polygonum cuspidatum aqueous extract in a dry eye model. *Nutrients* 2018;10:1550.
- 20) Kim YH, Yang IJ, Nguyen LTH, et al. Effect of diquafosol on hyperosmotic stress-induced tumor necrosis factor- α and interleukin-6 expression in human corneal epithelial cells. *Korean J Ophthalmol* 2020;34:1-10.
- 21) Zivandeh N, Yildiz E, Özer B, et al. Androgen suppresses hyperosmolarity-induced inflammatory mediators in human corneal epi-

- thelial cells. *Cornea* 2020;39:886-91.
- 22) Kim H, Yoo WS, Jung JH, et al. Alpha-lipoic acid ameliorates radiation-induced lacrimal gland injury through NFAT5-dependent signaling. *Int J Mol Sci* 2019;20:5691.
- 23) Woo SK, Nahm O, Kwon HM. How salt regulates genes: function of a Rel-like transcription factor TonEBP. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:269-71.
- 24) Lee SD, Choi S, Lim SW, et al. TonEBP stimulates multiple cellular pathways for adaptation to hypertonic stress: organic osmolyte-dependent and-independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F707-15.
- 25) Choi SY, Lee-Kwon W, Kwon HM. The evolving role of TonEBP as an immunometabolic stress protein. *Nat Rev Nephrol* 2020;16:352-64.
- 26) Lee JH, Suh JH, Choi SY, et al. Tonicity-responsive enhancer-binding protein promotes hepatocellular carcinogenesis, recurrence and metastasis. *Gut* 2019;68:347-58.
- 27) Roth I, Leroy V, Kwon HM, et al. Osmoprotective transcription factor NFAT5/TonEBP modulates nuclear factor-kappaB activity. *Mol Biol Cell* 2010;21:3459-74.
- 28) Kim YS, Kim M, Choi MY, et al. *Aralia elata* (Miq) seem extract decreases O-GlcNAc transferase expression and retinal cell death in diabetic mice. *J Med Food* 2017;20:989-1001.

= 국문초록 =

고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP 발현과 염증인자들에 대한 두릅의 효과

목적: 고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 TonEBP의 발현과 염증인자들의 변화에 두릅이 미치는 영향에 대해서 알아보려고 하였다.

대상과 방법: 배양된 각막상피세포에 5와 10 µg/mL의 두릅을 24시간 동안 전처리한 후 고삼투압(500 mOsm/L)에 노출시켜, 세포생존성과 창상 회복 정도를 확인하였으며, TonEBP와 NF-κB 등의 발현 변화와 함께, 산화스트레스 인자들과 염증유발 인자들의 변화를 확인하였다.

결과: 고삼투압에 노출된 각막상피세포에서 감소되었던 세포생존성과 창상 회복 속도는 두릅을 전처리하면 농도 의존적으로 회복되었고, TonEBP와 NF-κB의 발현 증가는 억제되었다. 두릅은 Bax의 발현을 감소시키고, Bcl-2와 Bcl-xl 발현은 증가시켰다. 산화스트레스 인자인 4-HNE는 감소시키고 항산화효소인 Gpx는 증가시켰으며, IL-1β의 발현은 감소시켰다.

결론: 두릅은 배양된 각막상피세포가 고삼투압 환경에 노출 시 TonEBP의 발현과 NF-κB의 활성을 감소시킴으로써, 세포생존성과 이동성을 증가시킬 뿐만 아니라, 산화스트레스나 염증 인자들의 활성을 줄여주는 효과가 있어 안구표면질환 등의 치료제로 활용될 수 있을 것이다.

〈대한안과학회지 2021;62(2):164-172〉

김성재 / Seong-Jae Kim

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