

면역조직화학적 방법을 이용한 흰쥐의 호모시스테인 수준과 망막 손상의 관련성 연구

이인선* · 이화영** · 장남수*[§]

이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과, 아시아식품영양연구소,*
이화여자대학교 의과대학 해부학교실**

Effects of Hyperhomocysteinemia on the Immunohistochemical Reactivity for Vimentin in the Retinal Glial Cell

Lee, Insun* · Lee, Hwayoung** · Chang, Namsu*[§]

Department of Food and Nutritional Sciences, Asia Food and Nutrition Research Center,*
Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Department of Anatomy,** Ewha Medical Research Center, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

It has been suggested that the elevated plasma homocysteine may lead to retinal dysfunction. We investigated the effects of plasma levels of homocysteine and folate on the retinal glial cells' injuries. Male Sprague-Dawley rats were raised either on a control diet or on an experimental diet containing 3.0 g/kg homocystine without folic acid for 10 weeks. Plasma homocysteine concentrations were measured by a HPLC-fluorescence detection method. Plasma folate and vitamin B₁₂ levels were analyzed by a radioimmunoassay. The response of Müller cells which are the principal glial cells of the retina was immunohistochemically examined using an antibody for vimentin, a cytoskeletal protein belonging to the family of intermediate filament. At 2 weeks, the homocystine diet induced a twofold increase in plasma homocysteine, and a concomitant increase in the expression of vimentin in the Müller cells' processes spanning from the inner to outer membranes of the retina indicating arterial degeneration. At 10 weeks, the homocystine diet induced a fourfold increase in plasma homocysteine, but vimentin immunoreactivity in the retinas was similar in both groups. In conclusion, increased plasma homocysteine levels have influence on morphological and functional changes of Müller cells in the retina. (*Korean J Nutrition* 38(2) : 96~103, 2005)

KEY WORDS : homocysteine, folate, retina, Müller cell, vimentin.

서 론

고호모시스테인혈증은 뇌졸중,¹⁾ 심근경색증,²⁾ 말초동맥폐쇄증³⁾과 같은 죽상경화증질환⁴⁾의 독립인자로서, 체내에 산화적 손상을 일으키고 내피조직의 병변을 발생시킨다고 알려져 있다.⁵⁾ 혈중 호모시스테인 농도는 제 2형 당뇨병에게서 나타나는 관상동맥질환에도 연관되어 있는 것으로 보인다.^{6,7)} 혈중 호모시스테인은 내피세포에서 nitric oxide (NO)의 생성을 감소시키고,^{8,9)} 티올기 (-SH)와 결합 후 자동산화되어 반응성 산화물질 (reactive oxygen speices, ROS)

를 생성시키는 기전을 통해서 혈관질환을 야기시킨다.¹⁰⁾ 호모시스테인은 DNA methylation을 방해하고,¹¹⁾ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 활성 및 p53유발 등의 기전을 통해 신경퇴행성질환들의 병리기전에 참여할 가능성이 있다.¹²⁾

안구조직 중 망막은 비교적 높은 산소 요구량과 지속적인 빛자극으로 인하여 산화손상에 매우 취약한 상태에 있으며, 망막의 세포막에는 docosahexaenoic acid (DHA) 등 탄소수가 22개 이상인 고불포화지방산이 많이 분포되어 있다.¹³⁾ 망막은 색소층, 막대원뿔층, 바깥경계층, 바깥핵층, 바깥얼기층, 속핵층, 속얼기층, 신경절세포층, 신경섬유층, 속경계층인 10개의 층으로 이루어져 있으며,¹⁴⁾ 이 중 속핵층에는 망막의 중요한 버팀기능 및 에너지 대사기능을 담당하고 있는 Müller cell (부챗살아교 세포)의 핵이 존재하고 있

접수일 : 2005년 1월 7일

채택일 : 2005년 3월 16일

[§]To whom correspondence should be addressed.

다. Glial cells (신경절세포)의 일부인 Müller cell은 세포체와 축삭 및 혈관 주위를 지지하고 K⁺와 H⁺ 등의 세포의 이온조절 및 glutamate와 GABA 등 신경물질 전달자 역할을 한다.¹⁵⁾ Vimentin 단백질은 글리코젠 저장고인 Müller cell의 대표적인 구성단백질이며, 망막 손상시에 발현이 증가하여 Müller cell의 시냅스 전달 및 활성화에 관계하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

혈중 호모시스테인 수준의 증가는 망막정맥폐쇄증의 망막혈관폐쇄질환을 유발하는 위험인자로 인식되고 있다.¹⁷⁾ 혈중 호모시스테인 농도는 제 2형 당뇨병의 망막병증 유발율과도 유의적으로 연관되어 있는 것으로 보이며,¹⁸⁾ 노화에 따른 시력감소의 가장 흔한 원인으로 알려진 노인성 황반변성에도 영향을 준다고 보고되고 있다.¹⁹⁾

혈중 호모시스테인 수준을 억제하는데 관여하는 가장 중요한 영양소인 엽산²⁰⁾은 체내에서 tetrahydrofolate로 환원된 다음, 단일 탄소기와 결합하여 단일탄소 전이반응의 조효소로 작용하며 purine과 thymidylate의 생합성에 필수적인 요소로서, DNA 복제와 세포의 증식, 분화, 성장과정에 영향을 준다.²¹⁾ 엽산은 거대적아구성 빈혈, 동맥경화증 및 신경학적 질병에 영향을 미치며,²²⁾ 태아뿐만 아니라, 성인의 중추신경계 손상에 대한 회복과 보존에 긍정적인 효과를 나타내는 영양소로 알려져 있다.²³⁾

혈중 호모시스테인 수준 증가가 심혈관, 뇌혈관 질환 등의 발생기전에 관여하고 있음을 밝히는 실험연구는 일반적이지만, 호모시스테인 증가와 망막 질환에 대한 실험연구는 미비한 실정이다. 본 연구는 혈중 호모시스테인 수준이 증가된 흰쥐를 대상으로, 호모시스테인의 증가가 망막에서 베타티프 기능, 이온전달 및 신경물질 전달의 기능을 지니고 있는 Müller cell에 어떠한 영향을 미치는지 면역조직화학방법을 이용하여 관찰하였다.

연구방법

1. 실험동물의 사육 및 식이 구성

본 실험에서는 생후 8주된 Sprague Dawley종 수컷쥐 30마리 (initial body weight: 279.5 ± 2.0 g, (주) Orient)를 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)

에 의하여 대조군 (C) 및 호모시스테인 식이군 (H)의 2군으로 나누었다. 실험동물들은 1주일간 고형배합사료 [(주) Orient]로 적응시킨 후, 실험식이를 공급하였다. 실험에 사용된 식이의 조성은 Table 1과 같았다. 식이는 American Institute of Nutrition (AIN)-93Maintenance²⁴⁾의 조성을 바탕으로 호모시스테인 함유식이의 경우 호모시스테인을 3 g/kg diet으로 첨가하였고, 엽산 함량의 수준은 0 g/kg diet수준으로 제조하였다. 본 연구에서 Fig. 1에 제시한 바와 같이 실험동물을 대조군 및 3 g/kg diet 호모시스테인이 함유된 식이군으로 나누어서, 10주동안 사육하였다. 실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육장의 환경은 온도 23 ± 1°C, 습도 50 ± 5%로 조정하였고, 12시간 명암주기를 유지하였다. 매일 일정한 시각에 식이량을 측정하였으며, 체중은 1주일에 한번씩 측정하였다.

2. 실험동물의 희생 및 시료, 조직 채취

Fig. 1에서 제시한 바와 같이 실험동물을 0주, 2주, 10주로 총 3회에 걸쳐 각 군에 따라 6마리씩 희생하였다. 실험동물을 희생시키기 전 12시간동안을 절식시킨 후 동일한 시간대 (오전 9~11시)에 에틸 에테르로 마취시켜 개복한

Table 1. Experimental diet composition¹⁾

Ingredients	C H	
	(g/kg)	
Cornstarch	466.8	463.8
Casein	140	140
Dextrinized cornstarch	155	155
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Fiber	50	50
Mineral mix ²⁾	35	35
L-cystine	1.8	1.8
Choline chloride	1.4	1.4
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008
Vitamin mix without folic acid ³⁾	10	10
Folic acid	0.002	0
Homocystine	0	3

¹⁾ C: control diet, H: homocystine (3.0 g/kg diet) without folic acid diet

²⁾ AIN-93 mineral mixture

³⁾ AIN-93 vitamin mixture without folic acid

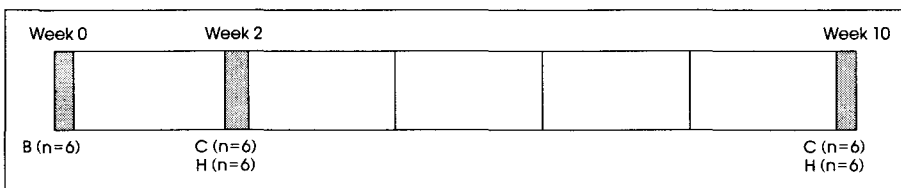


Fig. 1. Study design. The letters represent the experimental diet groups. B: Baseline, C: Control diet, H: Homocystine (3.0 g/kg diet) without folic acid diet.

후 10 ml 주사기를 사용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 ethylene diamine tetra acetate (EDTA)가 들어있는 원심분리관에 담아 1750 × g에서 15분간 원심분리 (Union 55R, Hanil Science Industrial Co.)하여 혈장을 분리한 후, 분석 직전까지 -70°C에 보관하였다. 심장에서 혈액을 채취한 후, 심장에 0.05 ml/L phosphate buffered saline (PBS)를 이용해서 관류시키고 이어서 4% paraformaldehyde (in 0.1 M PBS)로 다시 관류고정시켰다. 양쪽의 안구를 적출하여 동일 고정액에 후고정시킨 후, 10, 20, 30% sucrose 용액에 차례로 침지시켰다. 안구를 Optimal Cutting Temperature (OCT) compound에 포매하여 동결시킨 후 동결절편기 (Leica LM-3050, Bensheim, Germany)로 10 μm 두께의 동결절편을 실시하여 슬라이드에 부착시킨 후, 절단된 조직절편 슬라이드는 슬라이드 상자에 차례로 넣어 -70°C에 보관하였다.

3. 생화학적인 분석

1) 혈장 호모시스테인 농도 분석

혈장 호모시스테인 농도는 Araki와 Sako의 방법²⁵⁾을 이용하여 HPLC (Waters 2690, USA)로 분석하였다. 혈장 100 μl에 10% tri-n-butylphosphine 용액 10 μl를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액 100 μl를 가하고 4°C, 3,000 × g에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 상청액에 1.55 M NaOH 20 μl, 4 mM EDTA를 함유하는 0.125 M borate buffer (pH 9.5) 250 μl, ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole 4-sulfonic acid (SBD-F) 용액 100 μl를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시키고 0.45 μm filter (HV type, Whatman)로 여과시킨 후 automatic injector (Waters Co., MA, USA)로 20 μl씩 column에 주입하여 Xterra™ RP₁₈ column을 이용하여 excitation wave length (λ_{ex}) 385 nm, emission wave length (λ_{em}) 515 nm의 fluorescence detector (Waters 474, Waters Co., MA, USA)로 분석하였다.

2) 혈장 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도 분석

혈장 엽산 및 비타민 B₁₂ 수준은 ¹²⁵I-folic acid와 ⁵⁷Co-vitamin B₁₂ dualcount solid phase no boil (SPNB) radioassay kit (Diagnostic products Co., Los Angeles, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 200 μl의 혈장에 dithiothreitol과 tracer를 혼합한 working solution을 첨가한 후 NaOH/KCN을 넣고 반응을 중지시키고 binder를 넣고 원심분리 후 상청액을 버린 다음 dual γ-counter (Cobra II,

Table 2. Daily food intake and weight gain¹⁾

Groups ²⁾	C	H
Food intake (g/day)		
At week 2	28.6 ± 1.0	27.7 ± 0.6
At week 10	26.9 ± 0.8	26.3 ± 1.0
Weight gain (g/week)		
At week 2	31.2 ± 1.9	32.8 ± 1.2
At week 10	23.3 ± 1.5	22.3 ± 1.4

¹⁾ Values are means ± standard error (n = 6)

²⁾ C: control diet, H: homocystine (3.0 g/kg diet) without folic acid diet

auto-gamma, Perkin Elmer Inc., MA, USA)로 분석하였다.

3) 망막조직의 vimentin 단백질 발현 분석

망막조직의 vimentin 단백질 발현 분석은 avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 방법을 이용하여 면역조직화학방법으로 이루어졌다. 냉동 보관되었던 조직을 인접 절편으로 꺼낸 후 37°C warmer에 1시간동안 incubation한 후, 0.02 M PBS (pH 7.2) 용액에 20분간 담구어 OCT compound를 제거하고, 각각을 습윤상자에 배열한 후, 0.3% 과산화수소에 10분동안 처리하였다. 그 후 PBS용액으로 다시 세척한 후 각각의 조직 slide를 10% normal goat serum (Vector Laboratories, CA, USA)으로 90분동안 blocking을 시켰다. 1차항체인 mouse-anti-vimentin (BioGenex, CA, USA, 1 : 500)을 얹고 12시간동안 4°C에서 반응시켰다. 그 후 조직 slide를 PBS용액으로 15분간 3회 세척하고 2차항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, CA, USA, 1 : 500)와 실온에서 1시간동안 반응시키고 다시 PBS용액으로 세척하였다. 그 후 3차항체인 avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, CA, USA, 1 : 1000)와 실온에서 1시간동안 반응시키고 역시 3회 세척하였다. 그 후 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 녹인 PBS용액에 0.005% 과산화수소를 섞어서 이 용액을 각각의 slide에 동일한 시간으로 반응시킨 후, 각각의 slide를 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 permount로 봉입하여 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다. 망막조직에 대한 형광현미경 (Carl Zeiss, Axiovert 200, Germany) 관찰시 2차항체는 biotin-SP-conjugated affininpure goat anti-mouse IgG (H + L) (Southern Biotech., AL, USA, 1 : 500), 3차항체는 streptavidin conjugated alexa 488 (Molecular Probes, OR, USA, 1 : 500)을 이용하였다.

4. 통계분석

모든 자료는 SPSS 프로그램 (version 11.0)으로 통계 처리하여 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 동일한 사육기간내에서 대조군과 호모시스테인 식이군의 식이 섭취량, 체중 증가량, 혈장 호모시스테인, 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도를 Student's t-test로 분석하였다. 동일한 식이군내에서 2주, 10주의 사육기간에 대한 혈장 호모시스테인, 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도는 Student's t-test를 실시하였다.

연구결과

1. 실험동물의 식이 섭취량 및 체중 증가량

실험 동물의 체중 증가량 및 식이 섭취량은 Table 2와 같았다. 동일한 사육기간내에서 대조군과 호모시스테인 식이군의 일일 평균 식이 섭취량 및 실험기간동안의 체중 증가량

Table 3. Concentrations of plasma homocysteine, folate and Vitamin B₁₂¹⁾

Groups ²⁾	C		H	
Homocysteine (μmol/L)				
At week 2	7.9 ± 0.4		14.6 ± 0.4	0.4*** ³⁾
At week 10	6.7 ± 0.5		25.9 ± 0.5	1.0***† ⁴⁾
Folate (nmol/L)				
At week 2	119.3 ± 3.2		23.3 ± 3.2	1.4***
At week 10	117.4 ± 6.0		18.1 ± 6.0	2.3***
Vitamin B ₁₂ (pmol/L)				
At week 2	2645.4 ± 106.2		2902.2 ± 150.9	
At week 10	2853.0 ± 116.1		2624.4 ± 152.4	

¹⁾ Values are means ± standard error (n = 6)
²⁾ C: control diet, H: homocysteine (3.0 g/kg diet) without folic acid diet
³⁾ ***: Significantly different from control rats, p < 0.001
⁴⁾ †: Significantly different between H group at 2 wk and H group at 10 wk, p < 0.001

을 관찰한 결과 식이 종류에 따라 p < 0.05수준에서 유의적인 차이가 없었다.

2. 혈장 호모시스테인, 혈장 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도

실험 동물의 혈장 호모시스테인, 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도는 Table 3에 제시한 바와 같다. 실험 시작 후 2주시, 호모시스테인 식이군의 혈장 호모시스테인 수준은 대조군에 비해서 유의적으로 2배 증가하였으며 (14.6 ± 0.4 μmol/L vs 7.9 ± 0.4 μmol/L, p < 0.001), 실험시작 10주 후에는 호모시스테인 식이군의 호모시스테인 수준이 유의적으로 4배 높았다 (25.9 ± 1.0 μmol/L vs 6.7 ± 0.5 μmol/L, p < 0.001). 동일한 호모시스테인 식이군에서 10주 호모시스테인 식이군의 혈장 호모시스테인 수준이 2주 호모시스테인 식이군보다 유의적으로 2배 높았다 (p < 0.001).

실험 시작 후 2주시, 호모시스테인 식이군의 혈장 엽산 수준은 대조군에 비해서 80% 유의적으로 감소하였으며 (23.3 ± 1.4 nmol/L vs 119.3 ± 3.2 nmol/L, p < 0.001), 실험시작 10주 후에는 호모시스테인 식이군의 엽산 수준이 85% 유의적으로 낮았다 (18.1 ± 2.3 nmol/L vs 117.4 ± 6.0 nmol/L, p < 0.001).

혈장 비타민 B₁₂ 농도는 호모시스테인 섭취 유무와 관련없이 기간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

3. 망막조직에서의 vimentin 발현정도

망막조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 대조군과 비교하여, 2주 호모시스테인 식이군에서 vimentin에 대한 발현이 증가하였다 (Fig. 2). 신경절세포층을 비롯하여, 속열기층, 속핵층, 바깥열기층, 바깥핵층부분에 분포되어 있는 Müller cells의 돌기들 (arrowhead)에서 vimentin 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 vimentin 단백질 발현은 Müller cells의 핵이 분포되어 있는 속핵층 (arrow)에서도 약하

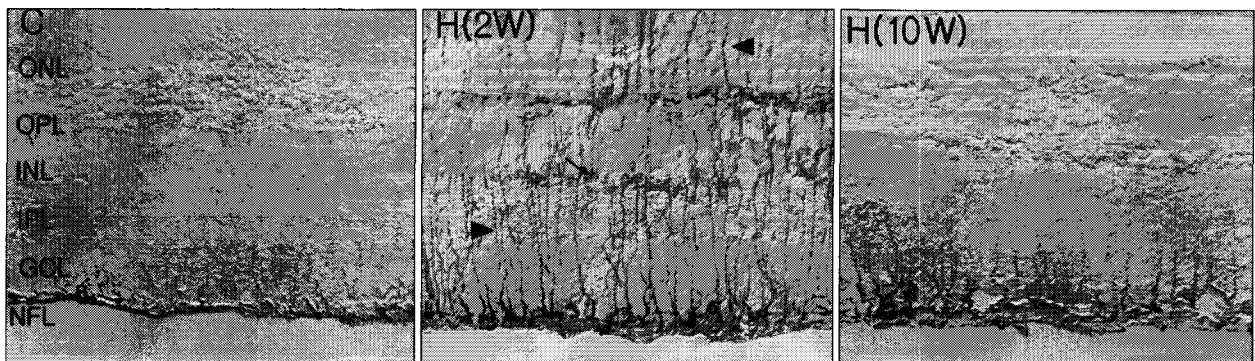


Fig. 2. Light microscopic images of rat retinas from control (C) and homocysteine (H) groups that were immunostained for vimentin. In H group (2W), immunoreactivity of vimentin was increased. Positive immunoreactivity in Müller cells of retina (arrow) and in Müller cell processes that extend from the inner limiting membrane to the outer limiting membrane (arrowhead) (Fig H (2W)). Vimentin immunostaining in retinas of (C) 2 week control diet, (H (2W)) 2 week homocysteine without folic acid diet and (H (10W)) 10 week homocysteine without folic acid diet. NFL indicates nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. Original magnification × 400.

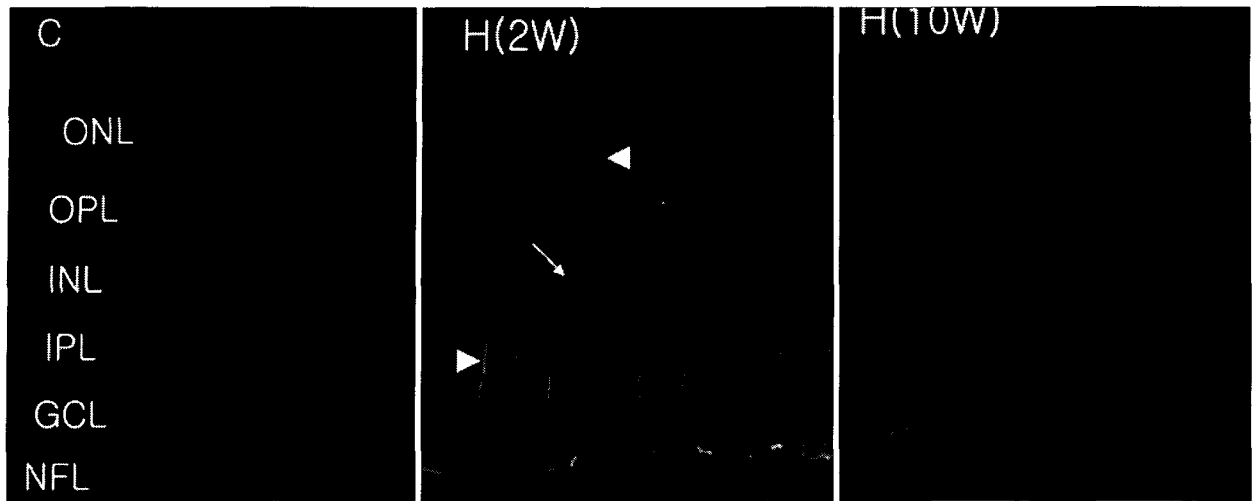


Fig. 3. Fluorescence microscopic images of rat retinas from control (C) and homocystine (H) groups that were immunostained for vimentin. In H group (2W), immunoreactivity of vimentin was increased. Positive immunoreactivity in Müller cells of retina (arrow) and in Müller cell processes that extend from the inner limiting membrane to the outer limiting membrane (arrowhead) (Fig H (2W)). Vimentin immunostaining in retinas of (C) 2 week control diet, (H (2W)) 2 week homocystine without folic acid diet and (H (10W)) 10 week homocystine without folic acid diet. NFL indicates nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer ONL, outer nuclear layer. Original magnification $\times 400$.

게 나타났다.

이에 반해서, 10주 호모시스틴 식이군에서는 신경절세포층과 속열기층에서 vimentin 단백질 발현이 나타났지만, 2주 호모시스틴 식이군에 비해서 발현 정도는 약했다.

망막조직을 형광현미경으로 관찰한 결과, vimentin 단백질 발현양상은 광학현미경의 실험결과와 유사하였다 (Fig. 3).

고 찰

본 연구는 8주령의 Sprague Dawley종을 대상으로 호모시스틴 식이를 먹인 후, 혈중 호모시스테인 및 엽산 수준 변화를 분석하였다. 이러한 혈중수준의 변화가 산소 공급이 가장 풍부하며 산화적 손상 및 여러 질환에 쉽게 노출되어 있는 망막²⁶⁾에 미치는 영향을 번역조직화학적 연구를 통해서 관찰하였다.

실험시작 2주 및 10주의 호모시스틴 식이군의 혈장 호모시스테인 수준은 동일한 기간내의 대조군에 비하여 유의적으로 높았다 ($p < 0.001$). 반면에 2주 및 10주 호모시스틴 식이군의 엽산 농도는 동일한 기간내의 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다 ($p < 0.001$). 혈장 호모시스테인 농도는 동일한 식이군내에서 사육기간에 따라 유의적인 차이를 나타내었다. 동일한 호모시스틴 식이군내에서 10주 호모시스틴 식이군의 호모시스테인 농도가 2주군보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.001$). 번역조직화학적 연구결과에서, 대조군에 비교하여 2주 호모시스틴 식이군의 망막 Müller cell의 돌기들에서 vimentin 단백질 발현이 증가하였다. 뿐만 아니라,

Müller cell의 핵이 있는 속핵층부위에서도 발현이 약하게 나타났다. 혈중 호모시스테인의 증가로 인해서, ROS 및 저산소증현상이 증가하여서, 망막에 손상을 주어 Müller cell에서 vimentin 단백질의 발현이 증가됨을 추측할 수 있었다.

안구는 맨 바깥층인 안구섬유층, 중간층인 안구혈관층, 그리고 맨 안쪽 신경조직층인 안구속층의 3겹의 막으로 이루어져 있으며, 안구속층은 망막이라고 부르며, 빛감각을 수용하는 망막시각부분과 섬모체, 홍채의 표면을 둘러싸는 망막비시각부분으로 구분되어, 시각기능에 중요한 역할을 하는 신경조직이다.²⁷⁾ 망막은 영양 및 산소공급의 방해로 인해서, 망막착색증,²⁸⁾ 황반변성,²⁹⁾ 당뇨병성망막증¹⁵⁾ 등과 같은 구조적 손상에 쉽게 노출되어 있는 조직이다. 이와 같은 망막병증은 산소유발성 자유기 (oxygen-derived free radicals)의 과도한 생성과 관련된 산화손상에 의해 나타난다.³⁰⁾

호모시스테인의 증가는 혈중에서 자동산화, disulfide와의 결합 및 thiolactone과의 결합 등의 과정을 통해서 반응성 산화물질 (reactive oxygen species, ROS)을 증가시킨다. 혈중 호모시스테인이 증가함에 따라, 혈중에 ROS 중의 하나인 ONOO가 과도하게 유발되며, 상대적으로 혈관확장제 역할을 하는 NO 수준은 감소된다.³¹⁾ 혈중 호모시스테인의 증가는 또다른 내피 조직의 혈관확장제인 ADP, acetylcholine을 감소시키고,³²⁾ haem oxygenase-1 (HO-1)의 활성을 감소시켜서,³³⁾ ROS를 더욱 유발시킨다. ROS의 증가로 인해, 단백질, DNA 및 지질과 같은 세포내 주요구성성분이 산화되고 세포손상이 누적되어 퇴행성 질환이 야기된다. 망막의 경우에는 blood retinal barrier (BRB)가 파괴

되어,³⁴⁾ 신경절세포에 흐르는 혈류량이 감소되고, 결국 내피 조직의 저산소증 현상이 나타난다.³⁵⁾ 저산소증에 의해 BRB의 연접부위가 손상을 받으면 혈액 순환이 원활히 이루어지지 않아 망막의 왕성한 신진대사에 필요한 양분과 산소등의 공급이 어려워지므로 망막의 기능 및 구조에 변화가 일어난다.

Vimentin은 망막의 중간잔섬유 (intermediate filament) 구성단백질이며, 망막에서 골격구성성분 및 에너지 대사기능을 담당하고 있는 Müller cell에 존재한다. Ugarte 등³⁶⁾은 산화적 손상을 일으키는 ROS증가가 망막의 Müller cell의 활성을 증가시키며, Lewis 등³⁷⁾은 망막에 저산소증을 유발하는 망막분리가 Müller cell의 vimentin 단백질 발현을 증가시킨다고 보고하였다. Sawle 등³⁸⁾은 호모시스테인의 증가로 인해서 혈중에 저산소증이 유발됨을 밝혔으며, Vine³⁸⁾은 호모시스테인 증가에 따른 망막 허혈 (retinal ischemia)의 현상이 나타남을 밝혔다. Pianka 등³⁹⁾은 비동맥성앞허혈성 시신경병증 (nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy)과 중심망막동맥폐쇄증 (central retinal artery occlusion)의 안구질환이 있는 환자의 경우 혈중 호모시스테인 수준이 높다고 보고하였다. 본 연구에서 2주동안 호모시스틴 식이로 인해 유발된 혈중 호모시스테인 증가는 망막에 ROS의 증가 및 저산소증 등의 증상을 유발시켜 Müller cell 및 Müller cell돌기에서 vimentin 단백질에 대한 발현을 증가시킨 것으로 사료된다.

호모시스틴 식이를 10주간 먹인 쥐의 경우 혈중 호모시스테인 농도는 증가하였지만 망막의 vimentin 발현 정도는 대조군에 비해서 차이가 없었다. Müller cell 및 Müller cell 돌기에서 vimentin 발현이 2주 호모시스틴 식이군에서 증가하다가 10주 호모시스틴 식이군에서 대조군 수준으로 감소한 이유는 호모시스테인증가에 따른 ROS증가 및 허혈현상에 대한 Müller cell의 일시적인 보상작용이 있었을 것으로 추측된다. Winkler 등⁴⁰⁾은 Müller cell이 허혈과 같은 직접적인 손상과 주변의 망막신경세포가 손상되는 간접적인 변화에 대해 잘 견뎌낼 수 있도록 기전을 지니고 있다고 밝혔으며, Mizuno 등⁴¹⁾은 *in vivo* 실험에서 허혈상태의 Müller cell은 생존하기 위해서, glycolysis를 통해 ATP를 충분히 생산할 수 있을 만큼 glycogen 저장 능력이 유지된다고 보고한 바 있다. Müller cell은 glycogen의 주요 저장고이며, 젖산탈수효소와 glucose transporter-1 (GLUT-1)이 풍부하여 신경세포에 영양물질을 공급하는 기능을 가진 세포이다.⁴²⁾ Müller cell은 신경망막의 주된 교세포로 세포체와 축삭 그리고 혈관 주위를 지지하고 K⁺와 H⁺ 등의 세포외 이온조절, glutamate와 GABA등 신경물질의 전달자역할을 하

며, 여러세포에 대한 성장과 기능을 조절하는 많은 성장인자의 형성과 저장에 관여하는 기능을 지니고 있다.¹⁸⁾ 안구세포가 산소스트레스에 장기적으로 노출되었을 때의 보상기전과 관련된 연구결과는 미흡하나, Chan 등⁴³⁾의 실험에서 정상 쥐와 고혈압 쥐를 대상으로 2, 6, 12주 기간별로 망막에서 산소 결핍시 혈관 형성을 유발하는 인자인 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현정도를 측정하였다. 이 실험에서 고혈압 쥐는 기간에 따라 혈압은 유의적으로 상승했으며, 정상 쥐와 비교하여서 유의적으로 높았지만, 망막에서 VEGF의 발현 정도는 2, 6주에서 색소층과 속핵층에서 유의적으로 증가했으나, 12주에서는 감소한다는 결과가 나왔다. VEGF의 발현이 증가하다가 감소하는 현상은 대사적으로 망막에 산소 및 영양분이 공급되어 보상작용의 역할을 지니고 있음을 알 수 있으며, 본 연구에서 10주 호모시스틴 군의 망막에서 vimentin 발현이 약화되는 현상과 관련있음을 추측할 수 있었다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 혈중 호모시스테인 수준의 증가는 망막의 Müller cell 활성에 영향을 준다. 실험 시작 2주 동안의 호모시스틴 식이로 인해서 증가된 혈중호모시스테인 수준은 Müller cell에 상처를 주며 이에 따라 망막에서 버팀기능, 이온전달 및 신경물질 전달의 기능을 지니고 있는 Müller cell의 활성이 증가됨을 vimentin 단백질을 이용하여 확인할 수 있었다. 하지만 10주시에는 vimentin 발현이 감소되었는데, 이것은 Müller cell이 호모시스테인 증가의 급성독성에 대해서 자체적인 보상기전이 있을 것으로 추측된다.

본 연구에서 혈중 호모시스테인 수준에 따른 망막의 변화를 관찰하였고, 본 연구의 동물실험 결과는 임상연구에서 대사적으로 안구질환이 있는 환자들을 대상으로 원인물질을 규명하는 연구를 할 때 의의가 있을 것으로 추측된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 호모시스틴 식이로 인하여 변화된 혈중 호모시스테인 수준이 망막에 미치는 영향을 면역조직화학방법을 이용하여 관찰하였다. 호모시스틴 식이로 인해서 동물 모델의 혈중 호모시스테인이 증가하고 엽산의 수준은 감소되었다. 실험 시작 2주시에 호모시스틴 식이로 인하여 유발된 혈중 호모시스테인 수준 상승은 망막의 아교세포인 Müller cell와 Müller cell 돌기들에서 vimentin 단백질 발현을 증가시켰고, 10주 호모시스틴 군에서는 발현이 감소됨을 관찰하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 동맥경화증, 허혈성 심장질환, 순환계 질환 등의 독립인자인 혈중 호모시스테인

인 증가는 망막에서 에너지 대사기능을 담당하고 있고, 버텨 기능, 이온전달 및 신경물질 전달의 기능을 지니고 있는 Müller cell 활성화에 영향을 주는 것으로 사료된다. 호모시스테인 대사가 망막의 다른 세포들에 미치는 영향에 관한 체계적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 274: 1049-1057, 1995
- 2) Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 95: 1119-1121, 1997
- 3) Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki KI, Shintani S, Akita T, Shimada T, Imaizumi T. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2579-2585, 2000
- 4) Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia, an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324: 1149-1155, 1991
- 5) Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 25: 409-417, 2003
- 6) Becker A, Kostense PJ, Bos G, Heine RJ, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CDA. Hyperhomocysteinemia is associated with coronary events in type 2 diabetes. *J Internal Medicine* 253: 293-300, 2003
- 7) Buysschaert M, Wallemacq PE, Dramais AS, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: 1816-1822, 2000
- 8) Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocystine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 91: 308-318, 1993
- 9) Upchurch JR, Welch GN, Ramdev N, Fabian A, Keaney JF, Loscalzo J. The effect of homocysteine on endothelial cell nitric oxide production. *FASEB J* 9: A876, 1995
- 10) Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 26(3): 227-232, 2000
- 11) Manson JB. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon methyl metabolism. *J Nutr* 133: 941S-947S, 2003
- 12) Pak KJ, Chan SL, Mattson MP. Homocysteine and folate deficiency sensitize oligodendrocytes to the cell death-promoting effects of a presenilin-1 mutation and amyloid beta-peptide. *Neuromolecular Med* 3(2): 119-128, 2003
- 13) Koo BS. Circulatory disturbances and vascular disorders of the retina. *J Korean Ophthalmol Soc* 11: 55-62, 1970
- 14) Grozdanic SD, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM. Functional characterization of retina and optic nerve after acute ocular ischemia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2597-2605, 2003
- 15) Newman E, Reichenbach A. The Müller cell, a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307-312, 1996
- 16) Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230: 263-290, 2003
- 17) Brown BA, Marx JL, Ward TP, Hollifield RD, Dick JS, Brozetti JJ, Howard RS, Thach AB. Homocysteine: A risk factor for retinal venous occlusive disease. *Ophthalmology* 109: 287-290, 2002
- 18) Looker HC, Fagot-Campagna A, Gunter EW, Pfeiffer CM, Venkat Narayan KM, Knowler WC, Hanson RL. Homocysteine as a risk factor for nephropathy and retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 766-772, 2003
- 19) Axer-Siegel R, Bourla D, Ehrlich R, Dotan G, Benjamini Y, Gavendo S, Weinberger D, Sela BA. Association of neovascular age-related macular degeneration and hyperhomocysteinemia. *Am J Ophthalmol* 137(1): 84-89, 2004
- 20) Perry DJ. Hyperhomocysteinemia. *Baillieres Clin Haematol* 12: 451-477, 1999
- 21) Kim YI. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. *Environ Mol Mutagen* 44: 10-25, 2004
- 22) Bailey LB, Gregory JF. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129(5): 919-922, 1999
- 23) Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Pate Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol* 56: 221-227, 2004
- 24) Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127(5 Suppl): 838S-841S, 1997
- 25) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422: 43-52, 1987
- 26) Feeney L, Berman ER. Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals. *Invest Ophthalmol* 15: 789-792, 1976
- 27) Lewis GP, Fisher SK. Müller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1542-1545, 2000
- 28) Hollyfield JG, Frederick JM, Tabor GA, Ulshafer RS. Metabolic studies on retinal tissue from a donor with a dominantly inherited chorioretinal degeneration resembling sectoral retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 91(2): 191-196, 1984
- 29) Eagle RC. Mechanisms of maculopathy. *Ophthalmology* 91(6): 613-625, 1984
- 30) Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and oxygen radical disease in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154: 544-548, 2000
- 31) Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: The pleiotropic effects of folate supplementation. *J Nutr* 3(1): 4, 2004
- 32) Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 19: 217-246, 1999
- 33) Sawle P, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. *FEBS Letters* 508: 403-406, 2001

- 34) Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occluding content: vascular endothelial growth factor decreases occlusion in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* 47: 1953-1959, 1998
- 35) Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44: 1973-1988, 2001
- 36) Ugarte M, Osborne NN. The localization of endogenous zinc and the *in vitro* effect of exogenous zinc on the GABA immunoreactivity and formation of reactive oxygen species in the retina. *Gen Pharmacol* 30(3) : 297-303, 1998
- 37) Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res* 49: 93-111, 1989
- 38) Vine AK. Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for central retinal vein occlusion. *Trans Am Ophthalmol Soc* 98: 493-503, 2000
- 39) Pianka P, Almog Y, Man O, Goldstein M, Sela BA, Loewenstein A. Hyperhomocysteinemia in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy, central retinal artery occlusion, and central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 107(8) : 1588-1592, 2000
- 40) Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Puro DG. Energy metabolism in human retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3183-3190, 2000
- 41) Mizuno K, Sato K. Reassessment of histochemistry of retinal glycogen. *Exp Eye Res* 21: 489-497, 1975
- 42) Kumagai A, Glasgow BJ, Pardridge WM. GLUT-1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2887-2894, 1994
- 43) Chan WY, Cheng RSY, Yew DT. Postnatal changes of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the retinae of normal and hypertensive rats. *Life Science* 66: 1615-1625, 2000