



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위 논문

취망막신경절 세포주에서
포도씨추출물의 신경보호 효과

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

양 홍 석

취망막신경절 세포주에서
포도씨추출물의 신경보호 효과

지도교수 안 재 홍

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2011년 6월

아 주 대 학 교 대 학 원

의학과/의학전공

양 홍 석

양홍석의 의학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장 유 호 민 인

심사위원 안 재 홍 인

심사위원 주 일 로 인

심사위원 정 이 숙 인

심사위원 성 공 제 인

아주대학교 대학원

2011년 6월 23일

감사의 글

돌아보니 제가 아주대학교 병원 안과학교실에 들어오고 박사과정을 시작할지도 많은 시간이 흘렀습니다. 이제껏 의사의 길을 걸어오면서 많은 어려움이 있었지만 항상 신경 써주시고 도와주시는 여러 선생님들과 가족들의 도움으로 이 자리에 서있고 이렇게 박사과정을 끝내게 되었습니다. 그래서, 부족하지만 몇 자의 글로 그간의 감사를 전하고 싶어 이렇게 펜을 들었습니다.

먼저 본 논문을 쓰는데 도움을 주신 분들께 감사드립니다. 특히 논문의 계획단계에서부터 실험과 마무리까지 모든 것을 세심하게 도와주신 지도교수님이신 안 재홍 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고, 제가 안과전문의가 되고 아주대학교 안과에 남아 지금의 자리에 있을 수 있게 해주셨고 본 논문의 지도위원과 심사위원장까지 맡아 많은 관심을 가져주신 유 호민 선생님께 존경과 감사를 드립니다. 지도위원으로 담임반 후배의 부족한 논문에 조언을 아끼지 않으신 주 일로 선생님, 직접 실험을 진행하고 결과를 내는데 큰 도움을 주신 정 이숙선생님, 바쁘신 중에도 먼 곳까지 오셔서 심사해주신 성 공제 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

직접 이 논문의 실험에서 좋은 결과를 내주신 이 보경 선생님과 연구원이 영이씨, 실험의 이해를 도와준 이 기황, 논문 정리에 도움을 준 이 마빈, 김 의연, 항상 교실에서 학문적인 질문에 성의있게 답해주는 교실원들인 국 경훈, 정 승아, 송 지훈 선생님, 지금은 멀리 있지만 처음 교실원이 되었을 때 많은 도움을 준 장 윤희 선생님, 영문 초록 교정을 도와주신 반 선생님, 바쁜 중에도 나의 요구에 성의있게 도움을 주는 안과 전공의들, 김 효정간호사와 외래식구들, 김 영옥간호사와 수술방 식구들, 비서 은하씨에게 감사의 말을 전합니다.

언제나 좋은 말씀을 해주시는 선배 곽 정준, 문 상호, 이 선영, 안 재우 선생님, 항상 내가 성실하도록 인생의 조언을 아끼지 않는 좋은 친구 오 정훈,

임 선희, 김 영아, 박 소윤, 강 지윤, 곽 호진, 손 용훈, 박 규훈, 배 경진, 김 양호 외에 모든 친구들에게도 감사드립니다.

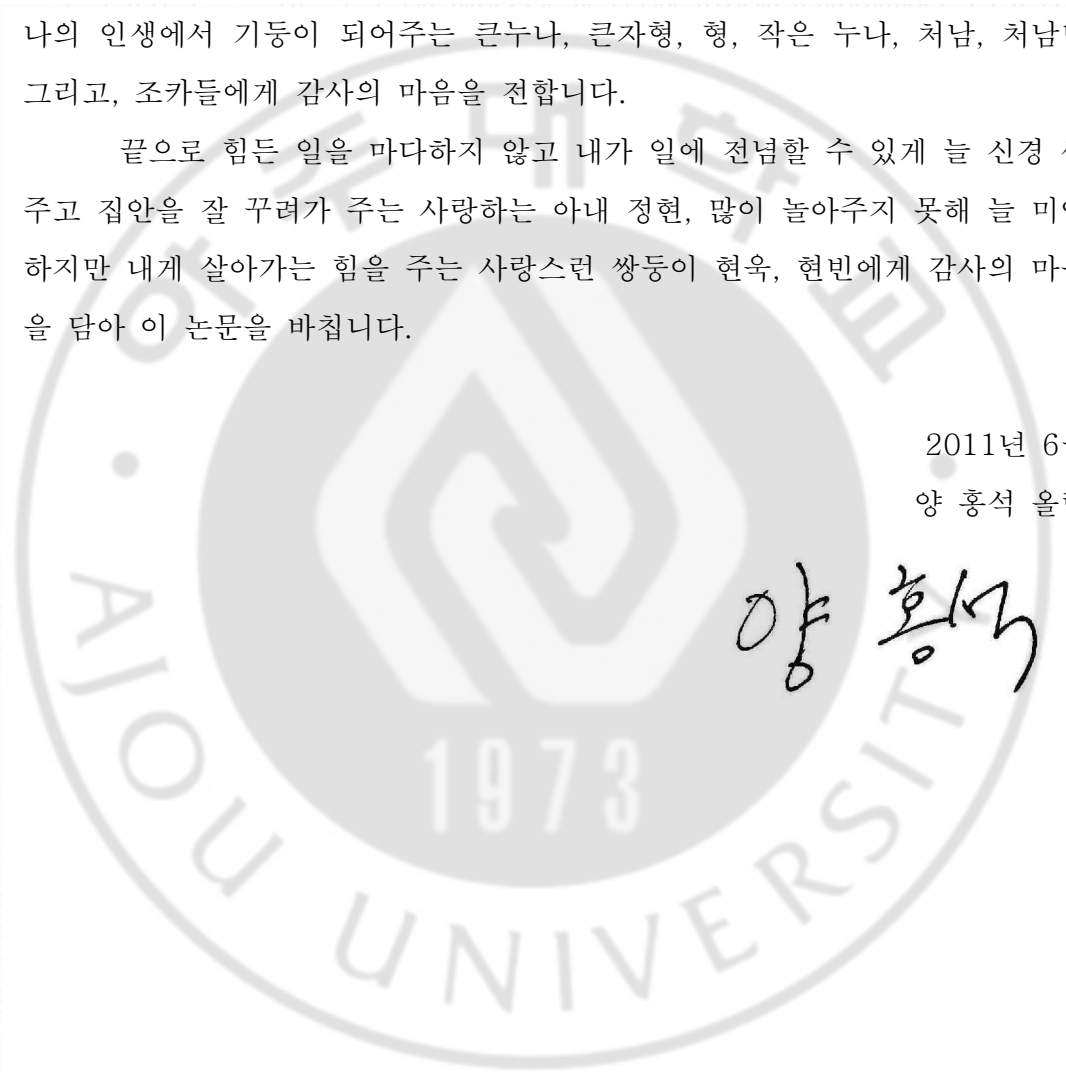
옆에 계시진 않지만 하늘에서 지켜봐 주시고 언제나 마음속에서 큰힘이 되어주시는 아버님과 늘 걱정해주시는 어머니, 늘 도움을 주시는 장인, 장모님, 나의 인생에서 기둥이 되어주는 큰누나, 큰자형, 형, 작은 누나, 처남, 처남댁 그리고, 조카들에게 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 힘든 일을 마다하지 않고 내가 일에 전념할 수 있게 늘 신경 써 주고 집안을 잘 꾸려가 주는 사랑하는 아내 정현, 많이 놀아주지 못해 늘 미안 하지만 내게 살아가는 힘을 주는 사랑스런 쌍둥이 현욱, 현빈에게 감사의 마음을 담아 이 논문을 바칩니다.

2011년 6월

양 홍석 올림

양 홍석



쥐망막신경절 세포주에서 포도씨추출물의 신경보호 효과

강력한 항산화물질로 알려져 있는 포도씨추출물 (grape seed extract, GSE) 의 신경보호효과를 이용하여 녹내장에서 신경보호치료의 가능성을 알아보기 위해서 변형된 쥐망막신경절 세포주 (transformed rat retinal ganglion cell line, RGC-5)의 산화스트레스에 의한 세포사멸에서 포도씨추출물이 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

이를 위해 staurosporine 1 μ M 처치로 얻은 staurosporine 분화 쥐망막신경절 세포주 (staurosporine differentiated RGC-5, ssdRGC-5)를 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 포도씨추출물과 2 시간 배양한 후 γ -glutamylcysteine 합성효소 길항제인 L-buthionine-(S,R)-sulfoximine 과 glutamate 혼합물(BSO+Glutamate)에 24 시간 동안 노출시켜 산화스트레스를 유발하였다.

LIVE/DEAD viability assay 로 세포사멸을 확인하고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (Annexin-V)/propidium iodide (PI) 염색법을 이용하여 세포사멸의 유형을 분석하였다. 그리고 가능한 세포사의 기전을 관찰하기 위해 caspase-3 활성과 활성산소의 형성수준을 확인하였다.

SsdRGC-5 세포를 BSO+Glutamate 에 노출시키면 LIVE/DEAD viability assay 에서 BSO+Glutamate 처리를 하지 않은 대조군 ($9.6 \pm 1.2\%$)에 비해 유의한 dead cell 분획의 증가 ($22.4 \pm 1.1\%$)가 확인되었다 ($p < 0.05$). ssdRGC-5 에 포도씨추출물을 첨가 배양한 후 BSO+Glutamate 에 의한 산화스트레스에

노출시키면 100 ng/ml 과 1000 ng/ml 농도에서 세포사멸을 BSO+Glutamate 처리만 시행한 대조군에 비해 유의하게 억제하는 효과가 나타났고 ($p < 0.05$) 포도씨추출물 100 ng/ml 의 농도에서 최고의 효과 ($15.1 \pm 1.7\%$)를 보였다. 이러한 포도씨추출물의 보호효과는 trolox 100 μ M 이나 z-DEVD-fmk 1 μ M 의 효과 ($15.4 \pm 2.5\%$, $14.4 \pm 1.2\%$)와 유사한 정도임을 확인할 수 있었다. 그리고, BSO+Glutamate 에 의한 세포사멸에서는 BSO+Glutamate 로 처리하지 않고 배양한 대조군에 비해 Annexin-V (+) 세포는 유의하게 증가 (1.7 배)한데 비해 Annexin-V (-)/PI (+) 세포는 증가하지 않아 BSO+Glutamate 노출에 의한 세포사멸은 세포괴사 (necrosis) 보다는 세포자멸사 (apoptosis)로 나타나는 것임을 알 수 있었다.

SsdRGC-5 세포의 BSO+Glutamate 에 의한 산화스트레스에서 BSO+Glutamate 처리를 하지 않은 대조군 (100%)에 비해 caspase-3 의 활성화증가 ($175.2 \pm 6.1\%$) 와 활성산소 생성증가 ($272.1 \pm 26.1\%$)가 나타나고 이때 포도씨추출물은 caspase-3 활성화와 세포내 활성산소 생성을 동시에 억제 ($130.9 \pm 2.5\%$, $178 \pm 24.8\%$) 하여 산화스트레스에 의한 세포사멸로부터 ssdRGC-5 세포를 보호하였다. 이런 효과는 trolox 100 μ M 의 caspase-3 활성화 억제효과 ($133.8 \pm 4.6\%$)나 세포내 활성산소 생성 억제효과 ($181.7 \pm 17.8\%$)와 유사한 결과였다.

결론적으로 ssdRGC-5 세포를 BSO+Glutamate 에 노출시키면 caspase-3 활성화를 동반한 세포자멸사가 유발되고 이때 포도씨추출물은 ssdRGC-5 세포에서 산화스트레스에 의한 세포자멸사를 억제하는 신경보호효과를 보였으며 이는 포도씨추출물이 녹내장 치료에 있어서 신경보호약물로서 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

핵심어 : 포도씨추출물, 망막신경절세포, 산화스트레스, 신경보호효과, 녹내장

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림차례	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
A. 포도씨추출물 (grape seed extract,GSE)	4
B. ssdRGC-5 세포의 배양	4
C. ssdRGC-5 세포에서 포도씨추출물에 의한 세포독성 관찰	5
D. 산화스트레스유발과 포도씨추출물의 효과 관찰	5
E. 세포사멸관찰	6
F. Caspase-3 활성측정	7
G. 세포내 활성산소 측정	8
H. 통계적 분석	8
III. 결과	9
A. ssdRGC-5 세포에서 포도씨추출물에 의한 세포독성	9
B. ssdRGC-5 세포의 BSO+ Glutamate 에 의한 세포사멸에대한 포도씨추출물의 효과	11
C. ssdRGC-5 세포의 BSO+ Glutamate 에 의한 caspase-3 활성화에대한 포도씨추출물의 효과	13

D. ssdRGC-5 세포의 BSO+ Glutamate 에 의한 세포내 활성산소 축적에 대한 포도씨추출물의 효과	15
IV. 고찰	17
V. 결론	22
참고문헌	24
ABSTRACT	27



그림 차례

Fig. 1. Toxicity of high concentration GSE

in ssdRGC-5 cells. 10

Fig. 2. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced cell death

in ssdRGC-5 cells. 12

Fig. 3. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced caspase-3 activation

in ssdRGC-5 cells. 14

Fig. 4. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced ROS accumulation

in ssdRGC-5 cells. 16

I. 서론

녹내장은 전세계적으로 주요한 실명의 원인 중 하나이며 세계보건기구 (WHO) 통계에 의하면 전세계적으로 5 백만이상, 세계실명의 13.5%가 녹내장에 의한 것으로 실명을 일으키는 안질환 중 3 위에 해당하며 특히 심각한 장애를 유발하는 양안실명의 원인 중 2 위에 해당한다 (Thylefors et al., 1995). 녹내장은 시신경 유두의 특징적인 구조적 변화와 점진적인 시야손상이 동반되어 나타나는 시신경병증으로 망막신경절세포의 세포자멸사와 시신경축삭의 소실에 의해 생기는 질환이며 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 실명을 유발할 수 있다. 월발성 개방각녹내장에서는 안압이 주된 위험요인으로 알려져 있지만 glutamate level 의 증가, nitric oxide (NO)의 대사에서 생기는 변화, 혈관의 변화 그리고, 활성산소에 의한 산화스트레스 등의 동반 요소도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Izzotti et al., 2006).

산소의 단계적 환원의 과정에서 생성되는 활성산소는 정상적인 대사과정에서도 나타날 수 있지만 과량이 존재할 경우 미토콘드리아에 심각한 손상을 유발할 수 있고 이런 활성산소가 세포의 항산화 능력을 넘어서서 존재하게 되어 세포에 지속적인 위협을 가하게 되는 상태를 산화스트레스라고 한다. 이런 산화 스트레스는 노화와 관련된 퇴행성 변화 뿐 아니라 녹내장을 포함하는 다양한 신경퇴행성 질환에서 세포자멸사에 중요한 기전으로 알려져 왔다 (Tezel, 2006).

이전의 연구에서 free radical 과 산화스트레스의 증가는 녹내장 동물모델이나 녹내장 환자에서 공통적으로 보고되어왔으며 (Izzotti et al., 2006), 항산화물이

녹내장환자에서 신경세포자멸사의 진행을 막거나 개선할 수 있으리라고 생각되어 왔다 (Tezel, 2006). 최근 연구에서 항산화물로 잘 알려진 은행잎추출물 (Ginkgo biloba extract) 투약이 녹내장 환자에서 기존의 시야손상을 호전시켰다고 보고하였고 (Quaranta et al., 2003), Hirooka 등은 안압상승을 이용한 쥐실험 모델에서 은행잎추출물의 신경보호효과를 보고하였다 (Hirooka et al., 2004). 이는 녹내장에서 항산화물이 치료효과를 가질 수 있다는 가능성을 제시하는 것이다.

Vitis vinefera 에서 얻은 포도씨추출물은 건강과 만성 질환에서의 유익한 효과로 건강보조식품으로 널리 이용되고 있고 (Moini et al., 2000) 일부에서는 강한 항산화효과로 산화스트레스 모델에서 치료적인 효과를 얻기도 했다 (Vigna et al., 2003). 포도씨추출물은 주로 proanthocyanidins 으로 된 polyphenols 이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 포도씨추출물에서 proanthocyanidins 의 주된 구성물질은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin 3-O-gallate, 그리고 그것들의 소중합체와 중합체를 포함하고 있으며 이들의 모세혈관 벽을 튼튼하게 하고 free radical 을 포착하며 활성산소 생성을 억제하는 효과와 관련된 약리작용을 이용하여 순환기질환 중 모세혈관저항 감소나 만성적인 말초순환장애 혹은 망막의 미세혈관질환등에서 이미 사용되고 있다 (Gabetta et al., 2000).

귀중추신경계의 저산소손상에서 포도씨추출물은 free radical 에 의한 지질과산화물 감소시켜 산화스트레스에 저항하는 신경보호 효과를 보였고 (Feng et al., 2005) 식물 polyphenols 로 알려진 aloë-emodin 은 망막신경절세포의 N-methyl-D-Aspartate (NMDA)유발 세포사를 억제하는 항세포자멸사 효과로 녹내장의 신경보호치료를 위한 가능성 있는 약물로 제안되기도 했다 (Lin et al., 2007). 이런 연구들을 볼 때 포도씨추출물도 녹내장환자에서 신경보호역할을 할 수 있는 가능성이 있다.

하지만 망막신경절세포의 산화스트레스에 의한 세포자멸사에서 포도씨추출물의 유용성에 대해서는 아직 거의 연구되지 않았다. 그래서, 저자는 staurosporine 분화 쥐망막신경절 세포주 (staurosporine differentiated RGC-5, ssdRGC-5)에서 산화스트레스로 유발된 세포사멸 (Krishnamoorthy et al., 2001)에 대하여 포도씨추출물이 미치는 영향을 관찰하고 포도씨추출물의 항산화특성이 포도씨추출물의 신경보호효과와 관련이 있는지를 알아보고자 하였다.



II. 재료 및 방법

A. 포도씨추출물 (grape seed extract, GSE)

포도씨추출물은 분말상태로 한림제약 (Seoul, Korea)에서 제공 받았고 주된 성분과 추출방법에 대해서는 이전에 보고되었다 (Gabetta et al., 2000). 포도씨추출물의 추출방식은 논문에서와 같이 에탄올을 이용한 추출방법이 이용되었고 분말상태로 제공되어 실험 전 정확한 농도에 맞게 1 ng/ml 에서 100 µg/ml 까지 10 배씩 농도를 증가시키면서 증류수에 녹여서 준비하였다.

B. ssdRGC-5 세포의 배양

RGC-5 세포는 애벗클락교수 (Prof. Abbot Clark, North Texas eye Research institute, Fort worth, TX)로부터 제공받은 것으로 생후 1 일된 쥐의 망막세포를 분리한 뒤 φ 2 EIA virus 를 이용하여 transformation 시킨 것이다 (Vickers, 1997).

RGC-5 세포는 37°C 5% CO₂ 가 함유된 가습환경에서 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA)과 항생제가 포함된 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) 에서 보존되었으며 매실험마다 ssdRGC-5 세포를 얻기 위해 1 µM staurosporine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 에 6 시간동안 노출시킨 후 24 시간 동안 배양액에서 회복시켜 ssdRGC-5 세포를 착상시켰다.

C. ssdRGC-5 세포에서 포도씨추출물에 의한 세포독성 관찰

SsdRGC-5 세포에서 포도씨추출물의 세포독성을 확인하기 위해서 포도씨추출물 1 ng/ml 에서 100 µg/ml 까지 농도를 10 배씩 증가시키면서 각 농도의 포도씨추출물에 준비된 ssdRGC-5 세포를 24 시간 동안 노출시킨 후 포도씨추출물에 의한 세포사멸을 FITC-Annexin V and PI analysis 통해 분석하였다.

D. 산화스트레스 유발과 포도씨추출물의 효과 관찰

산화스트레스를 유발하는 방법으로 사용된 γ -glutamylcysteine 합성효소 길항제인 L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)는 reduced glutathione (GSH)를 고갈시키고 glutamate 와 함께 줄 때 RGC-5 세포에서 지속적인 세포사를 유발할 수 있다 (Maher and Hanneken, 2005b). 본 실험에서는 ssdRGC-5 세포에 0.5mM BSO 와 5mM Glutamate 혼합액 (BSO+Glutamate)를 배양액에 넣고 24 시간동안 세포를 배양하는 방법으로 산화스트레스를 유발하였다. 이때 유발되는 세포사멸 정도를 대조군으로 하였다.

포도씨추출물의 보호효과를 확인하기 위해 산화스트레스를 유발하기 전 앞선 실험에서 세포독성이 없는 것으로 확인된 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 의 포도씨추출물, trolox (Tocris, Ballwin, MO) 100 µM 그리고, caspase-3 길항제 (z-DEVD-fmk, Biomol, Plymouth meeting, PA) 1 µM 을 ssdRGC-5 세포와 함께 배양하였다. 포도씨추출물의 농도는 앞선 실험을 통해 포도씨추출물 자체독성이 없으면서 보호효과가 나타나는 농도로 정하였다. 표준항산화제인 수용성 비타민 E 유사물질인 Trolox 와 DEVD-fmk 농도는 기존의 보고 (Park et al., 2009)에서 가장

세포 보호 효과가 좋았다고 알려진 농도를 기준으로 정하였고 이를 포도씨추출물의 항산화 효과와 caspase-3 활성 억제효과를 보는 기준으로 이용하였다.

산화스트레스에 의한 세포사멸의 정도와 신경보호효과를 확인하기 위해 LIVE/DEAD viability assay 와 caspase-3 활성측정, 그리고 세포내 활성산소 측정을 시행하였고 BSO+Glutamate 에 의한 산화스트레스에서 세포자멸사와 세포괴사를 구분하기 위해 FITC-Annexin V and PI analysis 를 시행하였다.

E. 세포사멸관찰

세포사멸의 정도를 정량하는 LIVE/DEAD viability assay 는 제조사의 설명에 따라 calcein AM 과 ethidium homodimer-1 (EthD-1)이 포함된 LIVE/DEAD viability assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 평가하였다. LIVE/DEAD viability assay 는 배양된 ssdRGC-5 세포를 24-well plate 에 well 당 2×10^4 세포 밀도로 접종하고 24 시간 동안 BSO+Glutamate 에 노출시킨 후 $2 \mu\text{M}$ calcein AM 과 $4 \mu\text{M}$ EthD-1 의 혼합물과 함께 30 분간 37°C 에서 배양하는데 이때 calcein AM 은 살아있는 세포에 흡입되어 cytosolic esterase 로 변환되어 녹색형광 ($494 \text{ nm}/517 \text{ nm}$)을 띠는 물질로 변환되고 EthD-1 은 손상된 세포막을 통과하여 핵산에 부착된 후 적색형광을 나타내게 된다. 이를 형광현미경 (Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하였고 살아있는 세포와 죽은 세포의 수는 두개의 well 에서 적어도 6 군데의 무작위 선택된 영역에서 평가되었다.

세포자멸사와 세포괴사를 확인하기 위해 시행한 FITC-Annexin V and PI analysis 는 제조사의 설명에 따라 Annexin-V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmigen,

San Diego, CA)를 이용하여 FITC-conjugated annexin V (Annexin-V) 와 propidium iodide (PI)로 세포를 염색하여 정량하는 방법이다. 24 시간동안 BSO+Glutamate 에 노출된 ssdRGC-5 세포를 3 μ L Annexin-V 와 5 μ L PI 용액을 추가한 100 μ L binding buffer 에 재부유한 후 실온에서 암전상태로 30 분간 유지하고 400 μ L of binding buffer 를 추가하여 Fluorescence-Activated Cell Sorter analysis (FACS) Calibur flow cytometer (Facsantage, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 를 이용하여 염색된 세포들을 정량하였다.

F. Caspase-3 활성측정

Caspase-3 의 활성은 기존 보고에 기술 (Park et al., 2009)되었듯이 caspase-3 의 비색기질 (colorimetric substrate)인 Ac-DEVD-p-NA (Biomol, Plymouth meeting, PA)가 효소촉매 작용으로 분해되어 나오는 조각을 이용하여 측정하였다. BSO+Glutamate 에 노출된 ssdRGC-5 세포를 차가운 phosphate buffered saline (PBS)에 한차례 세척한 뒤 1 시간동안 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.32 M Sucrose, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 10 μ M leupeptin)에서 처리하여 lysate 를 추출하였다. 추출한 lysate 를 4°C, 10,000 \times g 로 원심분리하여 얻은 200 μ g cytosolic extract (protein)를 reaction buffer (100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 10 μ M leupeptin)에 녹인 후 200 μ M Ac-DEVD-p-NA 가 포함된 용액 100 μ l 로 만들었다. 이 표본을 2 시간 동안 37 °C 에서 배양한 후 405nm microtiter plate reader (Molecular Devices, Palo Aldo, CA)를 이용하여 효소 촉매작용으로 방출되는 p-nitroamillide 를 시간대별로 분석하였다.

G. 세포내 활성산소 측정

세포내 활성산소의 양은 비형광색소인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA) 을 이용하여 형광정량법으로 측정하였다 (Park et al., 2009). 비형광색소인 DCF-DA 는 세포내로 쉽게 침투하여 세포내 활성산소와 상호반응하여 형광색소인 2',7'-dichlorofluorescein 으로 가수분해되고 이를 이용하여 세포내 활성산소양을 정량한다.

10 μ M 의 DCF-DA 와 20% Pluronic F-127 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 BSO+Glutamate 에 노출된 ssdRGC-5 세포와 함께 30 분간 배양하고 다시 HEPES controlled salt solution (HCSS buffer)로 세척하였다. 세척 후 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 시간대별로 촬영하고 DCF-DA 의 정도를 AxioVision™ image analysis software program 을 이용하여 정량화하였다.

H. 통계적 분석

모든 데이터는 mean \pm SEM 으로 적어도 3 회 이상 동일 실험을 반복하여 표시하였고 비교는 Student's *t* tests 를 이용하여 *p*-value <0.05 를 유의한 것으로 보았다.

III. 결 과

A. ssdRGC-5 세포에서 포도씨추출물에 의한 세포독성

포도씨추출물이 가진 ssdRGC-5 세포에 대한 세포자멸사나 세포괴사 유발유무를 확인하기 위해 포도씨추출물을 1 nM 에서 100 μ M 까지 농도를 10 배씩 증가시켜 준비한 뒤 RGC-5 세포를 staurosporine 으로 처리하여 ssdRGC-5 세포로 분화시키고 24 시간 동안 각 농도의 포도씨추출물에 노출시킨 후 FITC-Annexin V and PI analysis 를 통해 분석한 결과 그림 1A 에서 보이는 것처럼 포도씨추출물 농도에 따라 Annexin-V (+) 염색세포의 수가 증가하는 소견을 보이고 특히 100 μ g/ml 농도에서는 Annexin-V (+) 염색세포의 수가 $206.3 \pm 34.7\%$ 로 대조군 (100%)에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. 그림 1B 에서 보면 Annexin-V (-)/PI (+) 염색세포의 수도 농도에 따라 증가하여 100 μ g/ml 농도에서는 Annexin-V (-)/PI (+) 염색세포의 수가 $173.1 \pm 24.7\%$ 로 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다.

Annexin-V (+) 염색세포는 세포자멸사의 결과이며 Annexin-V (-)/PI (+) 염색은 세포괴사의 결과임을 고려할 때 1 μ g/ml 이하 농도의 포도씨추출물은 세포자멸사나 세포괴사를 유발하지 않지만 10 μ g/ml 이상의 농도에서는 세포자멸사와 세포괴사를 모두 유발하는 것을 확인할 수 있었고 10 μ g/ml 이상의 농도에서는 포도씨추출물의 독성이 나타난다는 사실을 알 수 있었다.

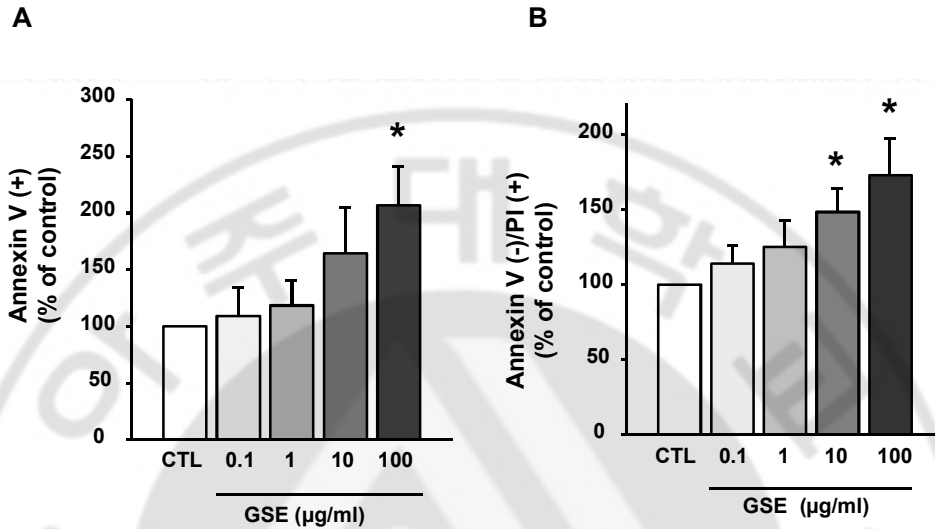


Fig. 1. Toxicity of high concentration GSE in ssdRGC-5 cells. (GSE: grape seed extract, CTL: control) ssdRGC-5 cells were incubated with GSE (0.1 ~ 100 µg/ml) for 24 h and the cell death was observed in FACS. The percentage of the different population is indicated. Quantitative percentages of Annexin-V (+) cells (**A**) or Annexin-V (-)/ PI (+) cells (**B**). The data represent the mean \pm SEM values from at least three independent experiments. * p <0.05 vs. control (CTL)

B. *ssdRGC-5* 세포에서 BSO+Glutamate 에 의한 세포사멸에 대한 포도씨추출물의 효과

그림 2A 에서 보이는 바와 같이 RGC-5 세포를 staurosporine 으로 처리하여 신경돌기를 가진 신경세포와 유사한 세포로 분화되는 것을 확인하였다. 이렇게 얻은 *ssdRGC-5* 세포에 BSO+glutamate 로 산화스트레스를 유발하면 그림 2A 와 2B 에서 보이는 바와 같이 EthD-1 양성 세포 (적색, 죽은 세포)의 수 ($22.4 \pm 1.1\%$)가 대조군 ($9.6 \pm 1.2\%$)에 비해 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

BSO+Glutamate 처리 전 포도씨추출물 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml 을 각각 첨가하여 배양한 후 BSO+Glutamate 에 의한 산화스트레스를 유발하면 포도씨추출물을 주지 않은 군에 비해 죽은 세포의 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 포도씨추출물 100 ng/ml 의 농도에서 최고의 효과 ($15.1 \pm 1.7\%$)를 보였고 이런 포도씨추출물의 보호효과는 trolox 100 μ M 과 DEVD-fmk 1 μ M 의 효과 ($15.4 \pm 2.5\%$, $14.4 \pm 1.2\%$)와 유사한 정도임을 확인할 수 있었다 (그림 2B).

BSO+Glutamate 에 의한 세포사멸을 FITC-Annexin V and PI analysis 를 이용하여 분석한 결과 그림 2C 와 2D 에서 보이듯이 Annexin-V (+) 염색세포의 비율이 대조군에 비해 최고 1.7 배까지 유의하게 증가하였고 반면 Annexin-V (-)/PI (+) 염색세포는 유의한 증가를 보이지 않아 BSO+Glutamate 에 의한 세포사멸은 세포괴사 (necrosis)보다는 세포자멸사 (apoptosis)에 주로 관련된다는 것을 확인하였다.

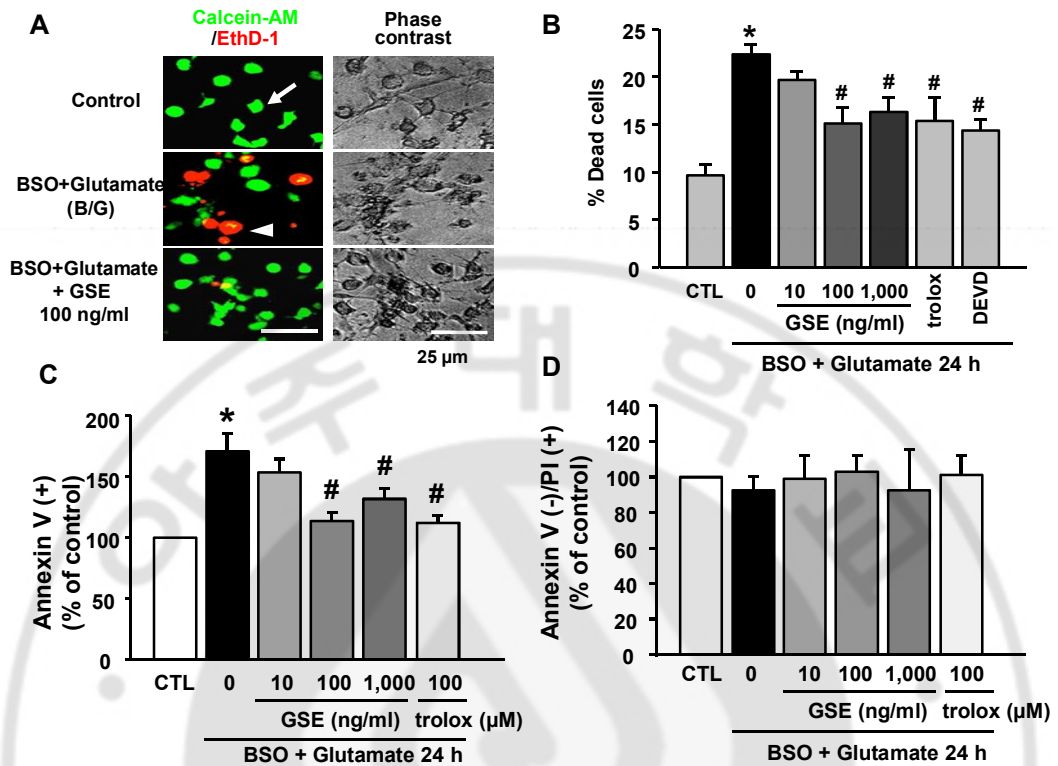


Fig. 2. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced cell death in ssdRGC-5 cells. (BSO: buthionine sulfoximine, CTL: control, GSE: grape seed extract) ssdRGC-5 cells were incubated with or without GSE (10 ~ 1,000 ng/ml) for 2 h prior to addition of 0.5 mM BSO plus 5 mM glutamate, and incubated for 24 h. Trolox (100 μ M) or DEVD-fmk (1 μ M) was used for comparison of the protective potency. **(A)** Live and dead cells were stained with calcein-AM (green; arrow) and EthD-1 (red; arrow head), respectively. Scale bar, 25 μ m. **(B)** The number of dead cells was counted and the percentage of total cells was analyzed. Percentages of apoptotic cells (Annexin-V (+)) **(C)** and necrotic cells (Annexin-V (-) / PI (+)) **(D)** were analyzed. * p <0.05 vs. untreated control (CTL), # p <0.05 vs. BSO+Glutamate only without GSE pre-treatment

C. ssdRGC-5 세포에서 BSO+Glutamate 에 의한 caspase-3 활성화에 대한

포도씨추출물의 효과

포도씨추출물의 세포보호효과의 기전을 알아보기 위해 산화 스트레스에 의한 세포자멸사의 기전 중 하나로 알려져 있는 caspase-3 활성화와 포도씨추출물의 활성억제를 분석하였다. Caspase-3 활성화는 효소 촉매작용으로 방출되는 p-nitroamillide로부터 분석되었고 BSO+Glutamate 처리 후 시간대별로 caspase-3 활성화를 측정해본 결과 20 시간에 최고 ($180.6 \pm 4.6\%$)에 도달하였다 (그림 3A). 그래서, 포도씨추출물의 효과를 평가하기 위한 다음 실험 동안 BSO+Glutamate 노출 시간을 20 시간으로 고정하였다.

그림 3B 에서 보면 BSO+Glutamate 에 의한 caspase-3 의 활성화 ($175.2 \pm 6.1\%$) 가 대조군 (100%)에 비해 증가된 모습을 보였고 이때 포도씨추출물 100 ng/ml 과 1000 ng/ml 전처치의 경우는 각각 $128.1 \pm 6.8\%$ 와 $130.9 \pm 2.5\%$ 로 caspase-3 활성화를 유의하게 억제시켰다. caspase-3 활성화 억제에서 포도씨추출물은 100 μM trolox ($133.8 \pm 4.6\%$) 와 비슷한 정도의 효과를 보였고 DEVD-fmk 1 μM 이 가장 강력한 caspase-3 활성억제 효과 ($82.1 \pm 6.5\%$)를 보였다.

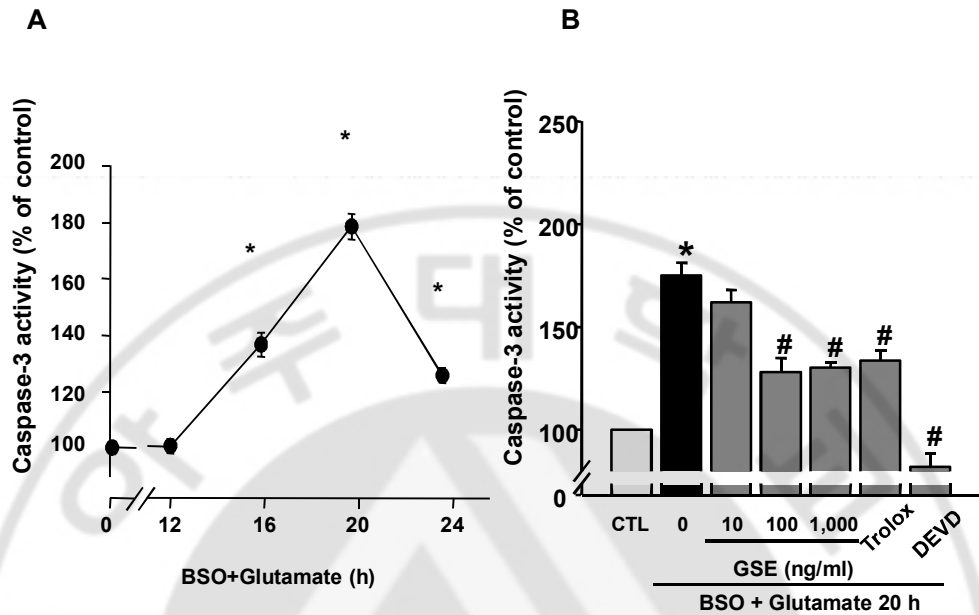


Fig. 3. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced caspase-3 activation in ssdRGC-5 cells. (BSO: buthionine sulfoximine, CTL: control, GSE: grape seed extract) ssdRGC-5 cells were incubated for 2h in the presence or absence of GSE (10 ~ 1,000 ng/ml), trolox (100 μ M) and DEVD-fmk (1 μ M) as described in Fig. 2, and exposed to 0.5 mM BSO plus 5 mM glutamate for 20 h. **(A)** The time course of caspase-3 activity during exposure to BSO+glutamate (~ 24 h). **(B)** Percentage of caspase-3 activity was analyzed compared to the control. Data represent the mean \pm SEM values from at least 5 independent experiments. * p <0.05 vs. untreated control (CTL), # p <0.05 vs. BSO+Glutamate only without GSE pre-treatment

D. ssdRGC-5 세포에서 BSO+Glutamate 에 의한 세포내 활성산소 축적에 대한

포도씨추출물의 효과

포도씨추출물의 세포보호효과의 기전을 알아보기 위해 산화 스트레스에서 생기는 활성산소의 양을 측정하기 위해 그림 4A 에서와 같이 DCF-DA 형광색소를 이용하면 세포내 활성산소가 관찰되었고 이를 시간대별로 측정하면 BSO+Glutamate 노출 20 시간 후에 세포내 활성산소 축적이 대조군과 비교하여 최고 2.7 배까지 증가함을 확인하였다 (그림 4B). 따라서 caspase-3 활성억제와 마찬가지로 포도씨추출물의 효과를 평가하기 위한 다음 실험 동안 BSO+Glutamate 노출시간을 20 시간으로 고정하였다.

그림 4C 에서 보듯이 BSO+Glutamate 에 의한 세포내 활성산소 축적 ($272.1 \pm 26.1\%$)은 포도씨추출물의 농도에 비례하여 저하되고 최고치는 1000 ng/ml 농도 포도씨추출물에서 나타났다 ($178 \pm 24.8\%$). 이는 100 μ M trolox 에 의한 효과 ($181.7 \pm 17.8\%$) 와 유사하였다.

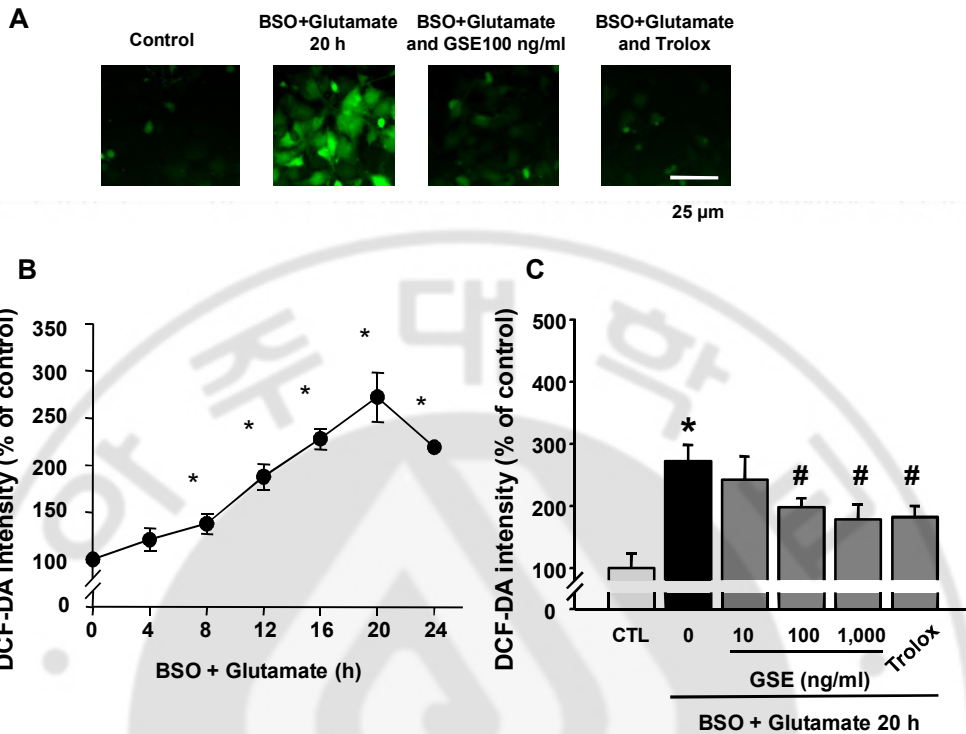


Fig. 4. Effect of GSE on BSO+Glutamate induced ROS accumulation in ssdRGC-5 cells. (BSO: buthionine sulfoximine, CTL: control, GSE: grape seed extract, DCF-DA: dichlorofluorescein diacetate) ssdRGC-5 cells were incubated with or without GSE (10 ~ 1,000 ng/ml) and trolox (100 μ M) for 2 h, as described in Fig. 2, and exposed to 0.5mM BSO plus 5mM Glutamate were added to the media and incubated for 20 h. **(A)** The amount of intracellular ROS was evaluated using fluorescent dye DCF-DA (green). Scale bar, 25 μ m. **(B)** The time course of DCF-DA intensity during exposure to BSO+Glutamate (~ 24 h). **(C)** Intensity of DCF was quantified. Data represent the mean \pm SEM values from at least 4 experiments. * p <0.05 vs. untreated control (CTL), # p <0.05 vs. BSO+Glutamate only without GSE pre-treatment

IV. 고찰

녹내장은 만성적이고 진행성인 망막신경절세포 사멸, 특징적인 시야감소, 시신경유두의 전형적인 변화를 특징으로 하는 질환이다. 망막신경절세포에는 에너지생산에 관여하는 풍부한 미토콘드리아를 가지고 있고 여기서 생산된 에너지를 이용하여 신경 신호의 전달과 신경계를 유지한다. 하지만 녹내장성 변화가 시작되면 미토콘드리아의 기능이 저하되고 정상상태에서는 충분히 감당할 수 있는 빛, glutamate, nitric oxide, prostaglandins 과 같은 외부자극에 의해서 쉽게 손상될 수 있는 상태가 되어 외부자극이 지속되면 세포사멸사가 진행된다고 한다 (Osborne, 2010).

근래 여러 연구들을 통해서 산화스트레스가 세포사멸사에 흔한 매개체로서 역할을 한다고 알려지고 있다. 세포사멸사 과정에서 일어나는 기본적인 단계로서 몇 가지 생화학적 변화가 있는데 미토콘드리아의 막전위 상실과 caspase 활성화가 여기에 속한다. 본 연구에서도 산화스트레스를 이용하여 세포사멸사를 유발하고자 하였고 Annexin-V (+) 세포의 비율이 대조군에 비해 유의하게 증가하면서 Annexin-V (-)/PI (+) 세포는 유의한 증가를 보이지 않아 BSO+ Glutamate 에 의한 신경세포사는 세포괴사보다는 세포사멸사임을 확인할 수 있었다 (그림 2C, 그림 2D).

Glutamate 는 중추신경계에서 기본적인 신경흥분전달물질의 하나이지만 glutamate-gated membrane channel 이 과하게 활성화될 경우 중추신경계 신경세포에 심각한 손상을 줄 수 있다. 망막신경절세포에도 이런 glutamate-gated membrane channel 이 있어서 세포실험이나 동물실험에서 glutamate 에 의한 흥분세포독성이

망막신경절세포에도 나타난다고 보고되었고 이런 glutamate-gated membrane channel 의 과도한 활성화에 의한 신경손상은 녹내장을 포함한 신경질환의 기전 중 하나로 알려져 있다 (Hare and Wheeler, 2009).

변형된 쥐망막신경절세포주인 RGC-5 는 기본적인 망막신경절세포의 세포 표지자인 Thy-1 과 Brn-3C 표현, glutamate 흥분세포독성에 대한 민감성, neurotrophin withdrawal 과 같은 특성을 다수 포함하여 시험관내 녹내장 모형으로 이용되어져 왔다 (Krishnamoorthy et al., 2001).

하지만 너무 쉽게 증식되고 형태적인 특성이 섬유아세포의 모양과 유사한 점이 많아 신경세포의 모델로는 적합하지 않다는 지적이 있어왔다. 그런데 RGC-5 세포를 단백질 인산화효소 길항제인 staurosporine 으로 처리하면 신경세포와 유사하게 비유사분열성이며 신경 돌기를 가지고 세포자멸사 전단계의 세포로 분화되는 것 (Frassetto et al., 2006; Lieven et al., 2007)이 알려져 최근연구에서는 ssdRGC-5 세포가 시험관내 녹내장 모형에서 많이 사용되고 있다 (Iizuka et al., 2008; Ganapathy et al., 2010). 그래서, 본 연구에서도 ssdRGC-5 세포를 이용하여 녹내장의 모델을 만들었다.

SsdRGC-5 세포를 얻기 위해 본 연구에서는 Yoko 등의 연구(Iizuka et al., 2008)에서 설명된 방법으로 RGC-5 세포를 staurosporine 으로 처리하였고 이런 방법으로 신경세포와 유사한 세포로 분화되는 것을 확인하였다 (그림 2A, phase contrast images).

저자는 포도씨추출물 자체의 독성을 확인하기 위해 1 ng/ml 의 농도에서 농도를 10 배씩 증가시키며 24 시간동안 함께 배양한 후 FITC-Annexin V and PI analysis 를 통해 분석한 결과 포도씨추출물 1 µg/ml 이하의 농도에서는 세포사멸의 증가가 없으나 10 µg/ml 이상의 농도에서는 Annexin-V (+)염색세포의

수와 Annexin-V (-)/PI (+) 염색세포의 수가 함께 증가하는 소견을 보이고 특히 100 µg/ml 이상의 농도에서는 V 염색세포의 수와 Annexin-V (-)/PI (+) 염색세포의 수가 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 이때 Annexin-V (+)염색세포는 세포자멸사의 결과이며 Annexin-V (-)/PI (+) 염색은 세포괴사의 결과임을 고려할 때 고농도의 포도씨추출물은 세포자멸사와 세포괴사를 모두 유발하는 것을 알 수 있었다. 따라서 1 µg/ml 이하의 농도에서는 포도씨추출물의 독성이 없다는 사실을 확인할 수 있었다 (그림 1).

본 연구에서 포도씨추출물은 ssdRGC-5 세포에서 caspase-3 활성을 감소시켜 BSO+Glutamate 에 의한 세포자멸사를 억제할 수 있었다. DEVD-fmk 가 포도씨추출물이나 trolox 에 비해 더 많은 caspase-3 활성 억제를 보여주었고 이는 심지어 대조군보다도 낮은 수치였지만 (그림 3) 세포자멸사에서는 포도씨추출물이 DEVD-fmk 와 유사한 효과를 보였다 (그림 2B). 이로 미루어 보건데 포도씨추출물이 DEVD-fmk 에 비해 caspase-3 활성억제에서는 약하지만 이런 단점을 보완하거나 또는 산화스트레스로부터 망막신경절세포를 보호하는 다른 기전을 가지고 있을 것이라는 추측이 가능하다.

Vitis vinifera 에서 얻은 포도씨추출물은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin 3-O-gallate 를 포함하는 Proanthocyanidins 이 주요 성분으로 되어있다. Proanthocyanidins 은 polyhydroxyflavan-3-ol 의 구성단위가 탄소결합에 의해 연결된 것을 기본 구조 요소로 하는 중합화합물이다. 이들은 자연계 식물들에서 광범위하게 존재하고 있지만 특히 *Vitis vinifera* 에서 얻은 포도씨추출물의 주된 성분이다 (Gabetta et al., 2000).

Proanthocyanidins 과 같은 항산화 물질들은 이미 여러 연구를 통해서 그 유의한 효과가 알려져 있다. Li 등 (Li et al., 2004)은 포도씨추출물이 항산화효과와

활성산소 제거효과로 알츠하이머병과 같은 뇌신경질환에서 나타나는 β -amyloid 에 의한 신경세포자멸사에 대항하는 신경보호효과를 보인다고 하였다. Maher 와 Hanneken (Maher and Hanneken, 2005a)은 flavonoids 가 산화스트레스로부터 신경절세포를 보호할 수 있는지를 관찰하여 catechin 과 epigallocatechin gallate 은 BSO+Glutamate 에 의한 산화스트레스로부터 신경절세포를 보호하지 못했지만 epicatechin 은 보호효과를 보이는 것으로 보고 하였다. Zhang 과 Osborne (Zhang and Osborne, 2006)은 강력한 항산화물질인 녹차에서 얻은 epigallocatechin gallate 를 이용한 동물실험에서 한번의 안내 주입으로 trolox 보다 강력하게 nitric oxide 나 sodium nitroprusside 의 지질과산화화를 약화시켜 망막에서 생기는 산화스트레스에 의한 퇴행성 손상을 억제함으로써 연령관련 황반변성이나 녹내장의 치료제로서 가능성을 보였다.

본 연구에서도 포도씨추출물이 BSO+glutamate 에 의한 산화스트레스에서 생기는 세포자멸사를 억제하는 신경세포 보호효과를 보였다. 어떤 성분이 ssdRGC-5 세포에서 산화스트레스에 의한 세포자멸사에 효과적으로 저항하는지는 명확하지 않으나 포도씨추출물의 보호효과 역시 caspase-3 억제나 활성산소 감소효과를 나타낼 때 항산화물질과 관련된 것으로 보인다 (그림 3, 그림 4). 세포사멸억제 효과와 같이 Caspase-3 활성 감소효과도 100 ng/ml 에서 가장 효과적인 것으로 나타났으나 (그림 3) 활성산소 감소효과는 농도에 비례하여 나타나는 것으로 나타났다 (그림 4).

Maher 와 Hanneken 의 연구에서는 RGC-5 에서 BSO+Glutamate 에 의한 세포자멸사가 caspase-3 의 활성화를 동반하지 않고 DNA fragmentation 의 증가만 동반되었다고 보고하였다(Maher and Hanneken, 2005b) .그러나, 본 연구에서는 ssdRGC-5 세포에서 caspase-3 활성화를 동반하는 세포자멸사 과정이 진행되는

것을 확인할 수 있었다 (그림 3). 이는 이전의 연구 결과와 다른 점이며 staurosporine 분화가 여러가지 신경세포의 특성을 회복시켜 주는 것과 같이 세포자멸사에서도 RGC-5 세포의 특성을 일부 변화시켰을 가능성이 있음을 의미한다.

신경보호약물을 이용한 녹내장의 진행을 막고 시력을 보호하려는 치료는 현재도 활발히 연구되고 있는 분야이며 주로 혈류 개선이나 항산화약물이 중심이 되고 있다. 이런 약물들 중 본 연구에서는 포도씨추출물이 ssdRGC-5 세포에서 BSO 와 glutamate 혼합물에 의해 유발된 산화스트레스에서 caspase-3 활성을 억제하고 활성산소를 감소시키며 산화스트레스에 의한 세포자멸사에 저항하여 ssdRGC-5 세포를 보호한다는 것을 확인하였다. 이는 포도씨추출물이 녹내장환자의 치료에서 새로운 약제가 될 수 있는 가능성을 보인 것이고 새로운 약제의 좋은 후보군이 될 수 있음 보여준다고 할 수 있다. 향후 포도씨 추출물에서 위와 같은 효과를 보이는 정확한 구성성분을 찾고 동물모델이나 실제 환자에서 그 결과를 확인하는 추가적인 연구가 필요하리라 판단된다.

V. 결 론

1. 포도씨추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에는 독성이 없었으나 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 ssdRGC-5 세포를 배양하면 세포사멸이 나타나고 이를 FTTC-Annexin V and PI analysis 를 통해 분석하면 세포자멸사와 세포괴사 모두를 동반한다.
2. ssdRGC-5 세포를 BSO+glutamate 에 노출시키면 RGC-5 를 이용한 기존 연구에서와 달리 caspase-3 활성화를 동반한 세포사멸이 유발되는데 이는 FTTC-Annexin V and PI analysis 를 통해 세포괴사 (necrosis) 가 아닌 세포자멸사 (apoptosis) 임을 알 수 있다.
3. ssdRGC-5 세포를 BSO+Glutamate 에 노출시키기 전 포도씨추출물을 첨가하여 배양하면 세포자멸사를 억제하는 효과를 보였고 이 효과는 100 ng/ml 의 농도에서 최고로 나타났다. 이는 100 μM trolox 나 1 μM DEVD-fmk 와 유사한 정도의 효과였다.
4. 포도씨추출물은 ssdRGC-5 세포를 BSO+Glutamate 에 노출시킬 때 나타나는 caspase-3 활성을 억제하였다.
5. 포도씨추출물은 ssdRGC-5 세포를 BSO+Glutamate 에 노출시킬 때 나타나는 활성산소의 축적을 억제하였다.

본 연구의 결과 포도씨추출물이 녹내장환자의 치료에 있어서 신경보호
약물로서 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있고 추후
포도씨추출물에서 위와 같은 효과를 보이는 정확한 구성성분을 찾는 연구와
동물모델이나 실제 환자에서 그 결과를 확인하는 연구가 추가적으로 필요하리라
판단된다.



참고문헌

1. Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH: Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull* 66: 120-127, 2005
2. Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones MV, Agarwal N, Levin LA: Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 427-438, 2006
3. Gabetta B, Fuzzati N, Griffini A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T, Peterlongo F: Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* 71: 162-175, 2000
4. Ganapathy PS, Dun Y, Ha Y, Duplantier J, Allen JB, Farooq A, Bozard BR, Smith SB: Sensitivity of staurosporine-induced differentiated RGC-5 cells to homocysteine. *Curr Eye Res* 35: 80-90, 2010
5. Hare WA, Wheeler L: Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 2940-2948, 2009
6. Hirooka K, Tokuda M, Miyamoto O, Itano T, Baba T, Shiraga F: The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Curr Eye Res* 28: 153-157, 2004
7. Iizuka Y, Hong S, Kim CY, Kim SK, Seong GJ: Agmatine pretreatment protects retinal ganglion cells (RGC-5 cell line) from oxidative stress in vitro. *Biocell* 32: 245-250, 2008
8. Izzotti A, Bagnis A, Sacca SC: The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 612: 105-114, 2006

9. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF, Agarwal N: Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 86: 1-12, 2001
10. Li MH, Jang JH, Sun B, Surh YJ: Protective effects of oligomers of grape seed polyphenols against beta-amyloid-induced oxidative cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1030: 317-329, 2004
11. Lieven CJ, Millet LE, Hoegger MJ, Levin LA: Induction of axon and dendrite formation during early RGC-5 cell differentiation. *Exp Eye Res* 85: 678-683, 2007
12. Lin HJ, Lai CC, Lee Chao PD, Fan SS, Tsai Y, Huang SY, Wan L, Tsai FJ: Aloe-emodin metabolites protected N-methyl-d-aspartate-treated retinal ganglion cells by Cu-Zn superoxide dismutase. *J Ocul Pharmacol Ther* 23: 152-171, 2007
13. Maher P, Hanneken A: Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4796-4803, 2005a
14. Maher P, Hanneken A: The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 749-757, 2005b
15. Moini H, Rimbach G, Packer L: Molecular aspects of procyanidin biological activity: disease preventative and therapeutic potentials. *Drug Metabol Drug Interact* 17: 237-259, 2000
16. Osborne NN: Mitochondria: Their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res* 90: 750-757, 2010
17. Park S, Kim MY, Lee DH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Park SW, Ko EY, Oh SR, Jung YS: Methanolic extract of onion (*Allium cepa*) attenuates ischemia/hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes via antioxidant effect. *Eur J Nutr* 48: 235-242, 2009

18. Quaranta L, Bettelli S, Uva MG, Semeraro F, Turano R, Gandolfo E: Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. *Ophthalmology* 110: 359-362; discussion 362-354, 2003
19. Tezel G: Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 25: 490-513, 2006
20. Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY: Global data on blindness. *Bull World Health Organ* 73: 115-121, 1995
21. Vickers JC: The cellular mechanism underlying neuronal degeneration in glaucoma: parallels with Alzheimer's disease. *Aust N Z J Ophthalmol* 25: 105-109, 1997
22. Vigna GB, Costantini F, Aldini G, Carini M, Catapano A, Schena F, Tangerini A, Zanca R, Bombardelli E, Morazzoni P, Mezzetti A, Fellin R, Maffei Facino R: Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metabolism* 52: 1250-1257, 2003
23. Zhang B, Osborne NN: Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate. *Brain Res* 1124: 176-187, 2006

Neuroprotective Effect of Grape Seed Extract in Rat Retinal

Ganglion Cell Line

Hongseok Yang

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Jaehong Ahn)

Purpose : Grape seed extract (GSE) is known to be a potent antioxidant. We examined the effect of GSE on oxidative stress-induced cell death in a transformed rat retinal ganglion cell line, RGC-5.

Materials and methods: Staurosporine differentiated RGC-5 (ssdRGC-5) cells, obtained by treatment of RGC-5 cells with 1 μ M staurosporine, were incubated with GSE for 2h and then exposed to buthionine sulfoximine plus glutamate (BSO+Glutamate) for 24 h. Cell death was detected by LIVE/DEAD viability assay and types of cell death were evaluated using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V(Annexin-V)/ propidium iodide (PI) staining methods. To investigate the possible underlying mechanism of cell death, we determined caspase-3 activity and the level of reactive oxygen species (ROS) formation.

Results: Treatment of ssdRGC-5 cells with BSO+Glutamate induced cell death ($22.4 \pm 1.1\%$) and GSE rescued ssdRGC-5 cells from oxidative stress-induced cell death ($15.1 \pm 1.7\%$) shown by LIVE/DEAD viability assay. These protective effect of GSE was similar

with the effect of trolox 100 μ M and z-DEVD-fmk 1 μ M (15.4 \pm 2.5%, 14.4 \pm 1.2%).

The proportion of Annexin-V (+) cells increased significantly, up to about 1.7-fold, compared to the control, while Annexin-V (-)/PI (+) cells did not show a significant increase, indicating that BSO+Glutamate induced neuronal cell death was mainly related to apoptosis rather than necrosis.

BSO+Glutamate induced apoptosis accompanied with increasing caspase-3 activity (175.2 \pm 6.1%) and intracellular ROS (272.1 \pm 26.1%) and incubation with GSE inhibited both caspase-3 activation (130.9 \pm 2.5%) and intracellular ROS production (178 \pm 24.8%). These effect of GSE was similar with effect of 100 μ M trolox in inhibition both caspase-3 activation (133.8 \pm 4.6%) and, intracellular ROS production (181.7 \pm 17.8%).

Conclusion: GSE showed a neuroprotective effect against oxidative stress-induced apoptotic death in ssdRGC-5 cells. This finding suggests that GSE could be a possible candidate for a therapeutic agent in glaucoma treatment.

Key Words : Grape Seed Extract, Retinal Ganglion Cell, Oxidative Stress, Neuroprotective effect , Glaucoma