

안와섬유모세포의 지방세포 분화에 대한 혼합 갱글리오사이드의 영향

최윤희^{1,2} · 조은형³ · 국경훈^{2,3}

이화여자대학교 의과대학 생리학교실¹, 아주대학교 의과대학 만성염증질환연구센터², 아주대학교 의과대학 안과학교실³

목적: 갑상샘병증의 병리기전 중 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화에 대한 갱글리오사이드의 역할의 가능성을 밝히고자 하였다.
대상과 방법: 갑상샘병증이 없으며 비염증성 안와 질환을 이유로 시행된 안와 수술 시 얻은 안와 지방 조직으로부터 정상 안와섬유모세포를 일차배양하여, 갱글리오사이드의 여러 아형이 혼합되어 있는 상용화된 혼합 갱글리오사이드를 처리한 후 세포의 형태 변화를 관찰하였다. 지방세포 분화 여부를 밝히기 위하여 oil red-O 염색 및 지방세포 분화와 관련된 유전자에 대한 RT-PCR을 시행하였다.
결과: 안와섬유모세포에 혼합 갱글리오사이드를 처리한 결과, 농도에 비례하여 세포의 형태 변화가 관찰되었으며, 피부섬유모세포와 지방전세포는 이러한 형태 변화가 관찰되지 않았다. 혼합 갱글리오사이드 처리 결과, 일부 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화가 관찰되었으며, 지방세포 분화 연관 유전자의 mRNA의 증가가 관찰되었다.
결론: 본 연구 결과들로부터, 갱글리오사이드가 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화와 관련한 갑상샘병증의 병리 기전에 관여할 가능성을 제시한다.
(대한안과학회지 2011;52(3):338-344)

그레이브스씨 병은 자가면역질환의 일종으로, 갑상샘자극호르몬 수용체에 대한 자가항체의 생성으로 인하여 갑상샘에 대한 자극으로 갑상샘호르몬의 과다분비를 초래하며, 이에 따르는 갑상샘비대가 동반될 수 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 갑상샘의 병적 변화 및 갑상샘호르몬 과다에 따르는 증상 이외에도, 일부 환자에서는 갑상샘 이외의 국소 결체조직에도 영향을 미쳐 대표적으로는 갑상샘병증과 피부병증이 동반되는 경우가 있다. 이러한 결체조직에의 병적인 변화는 갑상샘 기능의 변화 자체에 따른 직접적 결과라기 보다는 자가면역의 과정에서 기인된 것으로 생각되고 있다.¹ 갑상샘병증의 임상적 증상과 소견은 제한된 안와 공간내에서 지방 결체조직과 외안근의 부피가 증가됨으로부터 기인한 결과로 설명될 수 있으며,² 이러한 변화는 안와전산화 단층촬영을 통하여 관찰될 수 있다.³ 외안근의 병리학적 소견은 근섬유 자체는 정상 소견이나 부종에 의

하여 근섬유 간의 간격이 넓어져 있으며,⁴ 글리코사아미노글리칸 중 하나인 하이알루로난이 부종이 관찰되는 근섬유 사이의 결체조직에 과도하게 침착되어 있다.⁵ 이러한 하이알루로난의 과도한 침착은 안와 내 지방조직에서도 관찰되며 지방조직 자체의 확장과 동반하여 외안근 내의 변화보다 더 뚜렷하다.⁶ 그러므로 친수성인 하이알루로난의 침착으로 기인된 부종과 안와 지방조직의 팽창으로 인한 안와조직의 부피증가가 안구돌출을 포함한 그레이브스 눈병증의 주요 병적 변화이며 동반되는 증상과 소견의 주요 원인이 되는 것으로 생각되고 있으나, 이러한 과정에 연관된 자세한 기전에 대하여는 현재까지 밝혀진 바가 많지 않다.

인체 내의 결체조직에 광범위하게 분포되어 있는 섬유모세포는, 이전에는 비 활동성이며 세포의 기질을 분비하는 구조적 기능만을 가지는 세포로 생각되었다. 그러나 여러 연구들로부터 섬유모세포는 여러 가지 분자 수준의 신호에 반응하고 또한 이를 생성하여 염증과 연관한 골수 기원 세포들의 기능을 조절할 수 있는 능력이 있는 세포임이 보고되어,^{7,8} 현재는 질병의 병태생리학적 기전에서의 그 중심 역할에 대한 관심이 증가되고 있다. 안와섬유모세포는 다른 부위와 마찬가지로 안와 내 결체조직에 풍부하게 분포되어 있으며 구조적 역할을 담당하는 세포로 알려져 있다. 그러나 여러 보고들에 의하면 안와섬유모세포는 다른 부위의 섬유모세포와는 다른 특성을 보여, 염증성 신호에 대해서 과도한 반응을 나타내고,⁹ 하이알루로난의 분비능이 높으

■ 접수 일: 2010년 9월 2일 ■ 심사통과일: 2010년 9월 26일
■ 게재허가일: 2011년 1월 17일

■ 책임저자: 국 경 훈
경기도 수원시 영통구 원천동 산5
아주대학교병원 안과
Tel: 031-219-5260, Fax: 031-219-5259
E-mail: drkook@ajou.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2009년 대한안과학회 제101회 학술대회에서 구연으로 발표되었음.

* 이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008-331-E00023).

며,¹⁰ 지방세포로 분화할 수 있는 특성이 있다.¹¹ 그러므로 갑상샘눈병증의 병리학적 변화를 고려하여 볼 때, 안와섬유모세포가 병의 발생 이전에 주요 역할을 할 것임이 예상되고 있다.

갱글리오사이드는 아실기를 함유한 세라마이드 골격 (acylated ceramide core)에 다양한 수의 시알산(sialic acid)이 결합된 스피핑고당지질(glycosphingolipids)로,¹² 결합된 시알산의 수와 위치에 따라 세부 종류로 나뉘며 각각 명명되고 (monosialoganglioside (GM); disialoganglioside (GD); trisialoganglioside (GT); quadrisialoganglioside (GQ), 이러한 시알산의 결합을 통한 각각의 갱글리오사이드의 합성에는 시알릴트랜스퍼라아제(sialyltransferases)가 관여하는 것으로 알려져 있다.^{13,14} 갱글리오사이드는 모든 척추동물의 조직의 세포막에 광범위하게 분포되어 있으며,¹⁵ 세포의 분화,¹⁶ 증식,¹⁷ 그리고 신호전달에 관여한다.¹⁸ 갑상샘에서는 갱글리오사이드가 갑상샘자극호르몬수용체의 구조적이며 기능적으로 중요한 요소이며, 생리적 상태에서 본 수용체에 대한 결합과 갑상샘세포의 기능에 영향을 준다.¹⁹⁻²² 또한, 그레이브스씨 병 환자의 갑상샘 조직에서 특정 갱글리오사이드 아형의 발현이 증가되어 갱글리오사이드의 조성이 변화되며, 이러한 갱글리오사이드의 합성에 관여되는 시알릴트랜스퍼라아제의 활성이 증가되어 있음이 보고된 바 있다.^{23,24} 그러므로 갑상샘눈병증의 발생 이전에서도 갱글리오사이드의 증가가 역할을 할 것임으로 예상하여 볼 수 있으나, 이에 대하여는 연구된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는, 안와섬유모세포에 갱글리오사이드를 세포수준에서 처리함으로써, 갱글리오사이드의 증가가 안와섬유모세포에 미치는 영향을 관찰하여 갑상샘눈병증의 병리 기전과 갱글리오사이드의 관련성을 밝히고자 하였다.

대상과 방법

정상 안와섬유모세포의 일차 배양을 위하여, 비염증성질환으로 안와 혹은 안검 수술을 시행하는 환자들을 대상으로 술 중 안와지방조직을 획득하여 이를 콜라게나아제(collagenase; Sigma, St. Louis, MO, USA) 처리한 후 75 cm² T-플라스크(BD Falcon, San Jose, CA, USA)에 접종하여 세포를 얻

고, 이를 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA)과 항생제가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 배양액으로 사용하여 세포 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 3일마다 교환하였고, trypsin/EDTA 처리를 통하여 계대 배양하였으며, 5번째 이내의 계대 배양 세포를 실험에 사용하였다. 총 6명으로부터 얻은 정상 안와섬유모세포를 실험에 사용하였으며, 남녀 성비는 2:4, 평균 연령은 45세(21-67세)였다. 세포간 비교 분석을 위하여 일차 피부섬유모세포(dermal fibroblast)와 지방전세포(pre-adipocyte)의 세포주(3T3-L1, ATCC CCL 92.1; American tissue culture collection, Manassas, VA, USA)를 실험에 사용하였다.

실험을 위하여 세포를 35 mm 세포 배양 접시에 접종한 후 실험 전 2-3일간의 안정기를 확보하였다. 세포에 대한 갱글리오사이드 처리 후 세포의 형태 변화를 관찰하기 위하여 세포 배양액에 혼합 갱글리오사이드(bovine brain gangliosides mixture; Matreya, Pleasant Gap, PA, USA) (GM1: 18%; GD1a: 55%; GD1b: 15%; GT1b: 10%; GQ1b, GM2, GD2, GD3: 2%)를 첨가한 후 계획된 시간 경과 시점에 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석한 10% 포르말린으로 고정하고, 위상차현미경(Axiovert 200M, Carl Zeiss AG, Baden-Württemberg, Germany)으로 관찰 후 현미경에 장착된 디지털카메라를 이용하여 사진을 촬영하였다.

지방 염색을 위하여, 6 mL의 oil red O 용액(0.5 g in 100 mL 이소프로판올(isopropanol))에 4 mL의 증류수를 혼합 후 상온에서 1시간 경과시키고 0.2 µm 필터에 통과시켜 반응 용액을 준비하였다. 35 mm 세포 배양 접시에 접종되어 혼합 갱글리오사이드를 처리한 세포를 10% 포르말린으로 고정 후 300 µL의 oil red O 반응 용액을 배양액에 첨가하여 15분간 상온에서 유지하였다. 염색 후 증류수로 남아있는 염색제를 세척하고 위상차현미경을 사용하여 염색 여부를 관찰하였다. 염색 강도를 측정하기 위하여 염색된 세포 배양 접시에 이소프로판올을 첨가하여 염색제를 녹여낸 후 이를 밀도측정기(densitometry)를 사용하여 측정하였다.

지방세포 분화와 연관된 유전자의 활성 여부를 관찰하기

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Genes	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'
<i>C/EBPβ</i>	AACTTTGGCACTGGGG	GGCCCCGGCTGACAGTT
<i>PPARγ1</i>	AAAGAAGCCGACACTAAACC	CTTCCATTACGGAGAGATCC
<i>Actin</i>	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG	CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC

C/EBPβ = CCAAT/enhancer binding protein beta; *PPARγ* = peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

위하여 해당 유전자의 프라이머(primer)를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다(Table 1). TriZol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포로부터 RNA를 획득하고, 5 µg의 RNA로부터 1 µL의 random hexamer (2 µg/µL) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden), 1.25 mM dNTP (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany), 그리고 200 U M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, NY, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 0.25 mM dNTP, 0.25 U의 Taq polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA), 10 pmole의 primer pair, 그리고 3 µL의 cDNA를 사용하여 thermal cycler (PerkinElmer, NY, USA) 내에서 시행하였다. 92°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 주기로 PCR을 실행하였다.

측정치에 대한 통계 분석은 SPSS ver. 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하였으며, *p*-value가 0.05 미만일 때 의미 있는 것으로 판단하였다.

결 과

갱글리오사이드의 안와섬유모세포에 대한 영향을 관찰하기 위하여 세포 배양액에 50, 100, 200 µg/mL의 혼합 갱글리오사이드를 첨가하고 48시간 경과 후 위상차 현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과, 농도에 비례적으로 세포의 핵 주변으로 세포질이 커지고 밝아지는 형태 변화가 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 안와섬유모세포의 형태 변화는 100 µg/mL의 혼합 갱글리오사이드를 첨가한 피부섬유모세포나 지방전세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이러한 혼합 갱글리오사이드에 의해 변화된 안와섬유모세포의 형태 변화가 갑상샘병증의 대표적 병리 변화인 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화와 관련이 있는지 여부를 규명하기 위하여, 동일한 방법으로 세포 배양액에 100 µg/mL의 혼합 갱글리오사이드 첨가 후 48시간 경과한 세포에 대하여 oil red O 염색을 시행한 결과, 일부 세포에서 세포질에 붉게 염색된 지방입자를 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 염색 강도를 측정하기 위하여 염색된 세포 배양액에 이소프로판올을 첨가하여 염색제를 녹여낸 후 이를 밀도측정기를 사용하여 측정한 결과, 대조군에 비하여 혼합 갱글리오사이드 처리 세포에서 염색 정도가 증가된 경향을 관찰할 수 있었으나, 통계적으로 의미 있는 수준에는 도달하지 못하였다(Fig. 3B). 지방세포분화에 관련된 대표적 유전자로 알려져 있는 CCAAT/enhancer binding protein beta (*C/EBPβ*)와 peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 (*PPARγ1*)의 발현 증가 여부를 밝히기 위하여, 동일한 방법으로 안와섬유모세포의 배양액에 100 µg/mL의 혼합 갱글

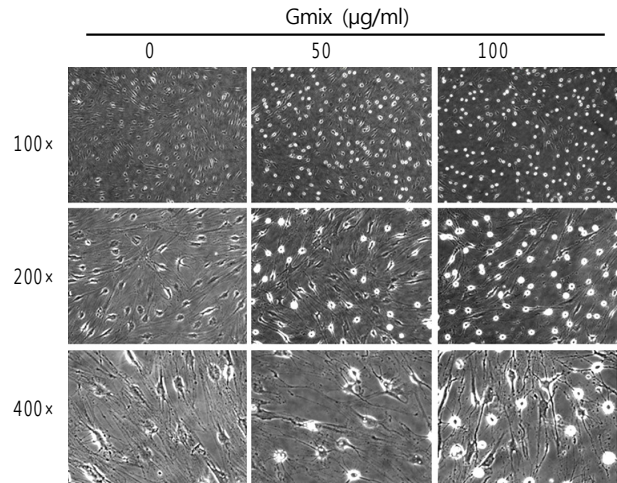


Figure 1. The effect of gangliosides mixture (Gmix) treatment on morphological changes of orbital fibroblasts. On phase contrast microscopic examination, Gmix induced morphological changes of orbital fibroblasts in dose-dependent manner up to 100 µg/mL of concentration at 48 hours of treatment.

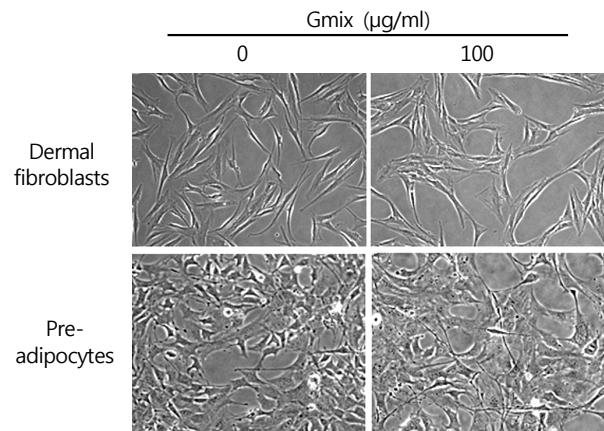


Figure 2. The effect of gangliosides mixture (Gmix) treatment on morphological changes in dermal fibroblast and preadipocyte. Phase contrast microscopic examination of dermal fibroblasts and preadipocyte cell line (3T3-L1) after treatment with 100 µg/mL of Gmix was performed. No detectable morphological changes are noted up to 48 hours compared to untreated control ($\times 400$).

리오사이드를 첨가한 후, 6, 12, 24, 48 시간 경과 후에 각각 세포로부터 RNA를 분리하여 두 유전자에 대한 RT-PCR을 시행한 결과, *C/EBPβ*의 발현이 혼합 갱글리오사이드 처리 6시간에 대조군에 비하여 증가함이 관찰되었으며, 이러한 증가는 24시간에 정점을 이루고 48시간에도 유지되었다. *PPARγ1*의 발현은 *C/EBPβ*에서 관찰되었던 발현량의 증가에 비하여는 덜 확연하였으나, 대조군에 비하여 혼합 갱글리오사이드 처리 세포에서는 시간의 경과에 따라 증가하여 24시간에 정점에 이르고 48시간에 유지됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

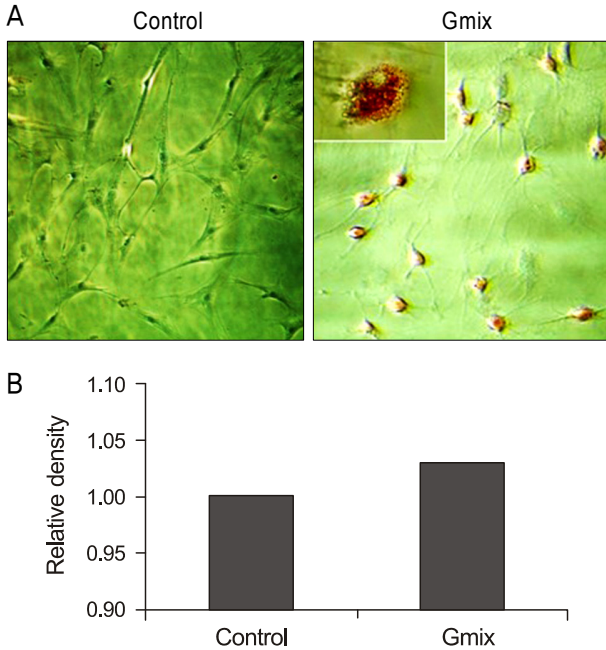


Figure 3. Differentiation of orbital fibroblast into adipocyte by gangliosides mixture (Gmix) treatment. (A) Oil red O staining of orbital fibroblast. Oil red O stain was performed at 48 hours after treatment with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Gmix. More and larger lipid droplets are noted in Gmix-treated orbital fibroblasts than untreated control, and they are stained with red color by oil red O staining. (B) Density of oil red O extracted from experiment A.

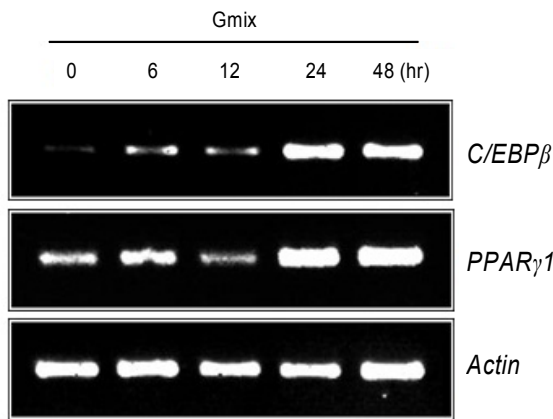


Figure 4. RT-PCR for *C/EBP β* and *PPAR γ 1* from orbital fibroblasts following treatment with gangliosides mixture (Gmix) at various time points. Increased induction of *C/EBP β* as well as *PPAR γ 1* expression is noted evidently at 24 and 48 hours after 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Gmix treatment.

고 찰

갑상샘눈병증의 임상 증상과 소견은 제한된 안와 공간 내에서 안와 조직의 부피가 증가됨으로 발생하는 것으로 설명할 수 있으며, 이러한 안와 조직의 부피 증가에 기여하는

주요 병리 소견 중 하나는 안와 지방조직의 비대이다.⁶ 1996년 안와지방조직 내에 분포하는 안와섬유모세포에 실험실적으로 insulin, triiodothyronine, carbaprostacyclin, thyrotropin, dexamethasone, 그리고 isobutylmethylxanthine으로 구성된 분화 유도 배양액을 처리함으로써 안와섬유모세포가 지방세포로 분화함이 실험적으로 보고된 이래로,²⁵ 안와섬유모세포가 안와지방 비대의 근원 세포인 것으로 생각되고 있다. 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화 과정에서 상기 분화 배양액 내의 각 구성 성분에 의한 자세한 기전은 밝혀지지 않았으나, cAMP의 증가가 가능한 기전 중 하나로 생각된다.^{26,27} 이후 rosiglitazone과 같은 PPAR γ 의 길항제가 또한 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화를 유도함이 보고되었으며,²⁸ 활성화된 T 림프구가 PPAR γ 의 ligand 역할을 할 수 있는 prostaglandins을 분비함으로써 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화를 유도함이 보고되었다.²⁹

본 연구에서는 혼합 갱글리오사이드가 정상인의 안와지방조직으로부터 배양한 안와섬유모세포의 형태변화를 유도함을 관찰하였으며, 이러한 갱글리오사이드의 세포 형태 변화에 대한 영향은 피부섬유모세포나 지방전세포에서는 관찰되지 않았다. 인체 내 각 부분에 존재하는 섬유모세포가 대부분 중배엽(mesoderm) 기원인 것과 달리, 안와섬유모세포는 흥미롭게도 신경외배엽(neuroectoderm) 기원인 것으로 알려져 있다.³⁰ 또한, 안와섬유모세포는 다른 섬유모세포와 구분되는 특징을 가지는 것이 보고되어 왔다.¹ 대표적으로 leukoregulin과 IL-1 β 와 같은 전 염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 자극에 의하여 안와섬유모세포는 강한 염증 유도 반응을 보이나, 이에 반하여 피부 섬유모세포는 동일 자극에 대한 반응을 나타내지 않는다.^{31,32} 그러므로, 알려져 있는 이러한 위치 특이적인 안와 섬유모세포의 특징이 본 연구에서의 관찰 결과와도 관련된 것으로 생각된다.

본 연구에서 갱글리오사이드 처리로 유도된 일부 안와섬유모세포의 형태 변화는 부분적으로 지방세포로의 분화에 기인됨을 관찰할 수 있었다. 기존에 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화를 세포 내 지방 과립의 증가에 대한 관찰로 규명한 보고는 있으나,²⁵ 특정 자극에 의한 안와섬유모세포의 형태학적 변화에 대한 연구는 없어, 본 연구에서 관찰된 세포의 형태학적 변화를 기존의 보고와 비교하여 규명하는데는 제한이 있으며, 또한 본 결과의 자세한 분자생물학적 기전은 연구되지 않았으나, 갱글리오사이드 처리 24시간 이후부터 관찰되었던 PPAR γ mRNA의 증가를 관찰함으로써 기존에 보고된 안와섬유모세포의 지방세포분화 과정에서 PPAR γ 와의 연관성을 뒷받침할 수 있었으며, 또한 지방

세포분화와 연관된 것으로 알려진 또 다른 유전자인 C/EBPβ의 증가도 관찰할 수 있었고, 이러한 유전자 mRNA 발현양 증가의 시간 과정은 세포의 형태학적 변화와 일치하였다. 안와섬유모세포는 세포 표면 당단백(glycoprotein)인 Thy-1 (CD90)의 발현 유무에 따라 두 가지 표현형을 나타내는 세포군으로 분류되는 것으로 알려져 있다.³³ 각 세부군의 안와섬유모세포는 외부 자극에 대하여 각각 상이한 반응을 나타내는데, Thy-1 발현 안와섬유모세포는 TGF-β의 자극에 의하여 근섬유모세포(myofibroblasts)로 분화되나, Thy-1을 발현하지 않는 안와섬유모세포는 PPARγ 길항제나 c-AMP를 증가시키는 자극제에 의해 지방세포로 분화하는 것으로 보고되었다.^{11,34} 또한 Thy-1 발현 안와섬유모세포는 사이토카인 자극에 의하여 prostaglandin E2, interleukin-8, 그리고 hyaluronic acid의 분비를 증가시킴도 알려져 있다.³⁴ 현재까지 안와섬유모세포의 Thy-1 발현 유무가 가역적인 것인지의 여부는 밝혀지지 않았으나, 갑상샘눈병증 환자의 안와 조직 내 Thy-1의 발현량이 증가되어 있음이 보고된 바 있다.³⁵ 이로부터, 본 연구에서는 갑상샘눈병증의 병리기전을 재현하기 위하여 갑상샘눈병증 환자가 아닌 정상 안와섬유모세포를 실험에 사용하였으므로, 혼합 갱글리오사이드의 자극에 의하여 일부 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화를 육안으로 관찰할 수 있었으나, 염색된 oil red O를 추출하여 그 밀도를 분석한 결과, 대조군과 비교하여 증가된 경향은 보였으나 통계적으로 의미 있는 수준에는 도달하지 못한 결과가 본 연구에 사용된 정상 안와섬유모세포의 Thy-1의 발현 정도와 관련이 있는 것으로 생각할 수 있겠다.

본 연구결과를 요약하면, 갱글리오사이드 혼합액은 일부 안와섬유모세포의 지방세포로의 분화를 유도하며, 이로부터 갱글리오사이드가 갑상샘눈병증의 주요 병리 기전에 관여할 가능성을 제시하는 바이며, 향후 갱글리오사이드의 각 아형들의 안와섬유모세포에 대한 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2003;24:802-35.
- 2) Bahn RS, Heufelder AE. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 1993;329:1468-75.
- 3) Forbes G, Gorman CA, Brennan MD, et al. Ophthalmopathy of Graves' disease: computerized volume measurements of the orbital fat and muscle. *AJNR Am J Neuroradiol* 1986;7:651-6.
- 4) Tallstedt L, Norberg R. Immunohistochemical staining of normal and Graves' extraocular muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:175-84.

- 5) Kahaly G, Forster G, Hansen C. Glycosaminoglycans in thyroid eye disease. *Thyroid* 1998;8:429-32.
- 6) Hufnagel TJ, Hickey WF, Cobbs WH, et al. Immunohistochemical and ultrastructural studies on the exenterated orbital tissues of a patient with Graves' disease. *Ophthalmology* 1984;91:1411-9.
- 7) Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151:317-22.
- 8) Fries KM, Blieden T, Looney RJ, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:283-92.
- 9) Cao HJ, Smith TJ. Leukoregulin upregulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression in human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 1999;277:C1075-85.
- 10) Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA, Cheavens M. Stimulation of glycosaminoglycan accumulation by interferon gamma in cultured human retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72: 1169-71.
- 11) Smith TJ, Koumas L, Gagnon A, et al. Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:385-92.
- 12) Svennerholm L. The gangliosides. *J Lipid Res* 1964;5:145-55.
- 13) Ruan S, Raj BK, Lloyd KO. Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J Neurochem* 1999;72:514-21.
- 14) Tsuji S. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem* 1996;120:1-13.
- 15) Hakomori Si SI. The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:225-32.
- 16) Nojiri H, Takaku F, Terui Y, et al. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:782-6.
- 17) Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 1990;265:18713-6.
- 18) Hakomori S, Yamamura S, Handa AK. Signal transduction through glyco(sphingo)lipids. Introduction and recent studies on glycol (sphingo)lipid-enriched microdomains. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 845:1-10.
- 19) Mullin BR, Fishman PH, Lee G, et al. Thyrotropin-ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:842-6.
- 20) Aloj SM, Kohn LD, Lee G, Meldolesi MF. The binding of thyrotropin to liposomes containing gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;74:1053-9.
- 21) Kielczynski W, Harrison LC, Leedman PJ. Direct evidence that ganglioside is an integral component of the thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1991-5.
- 22) Kielczynski W, Bartholomeusz RK, Harrison LC. Characterization of ganglioside associated with the thyrotrophin receptor. *Glycobiology* 1994;4:791-6.
- 23) Bouchon B, Portoukalian J, Bornet H. Major gangliosides in normal and pathological human thyroids. *Biochem Int* 1985;10:531-8.
- 24) Kiljanski J, Ambroziak M, Pachucki J, et al. Thyroid sialyltransferase mRNA level and activity are increased in Graves' disease. *Thyroid* 2005;15:645-52.

- 25) Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3428-31.
- 26) Reddy L, Wang HS, Keese CR, et al. Assessment of rapid morphological changes associated with elevated cAMP levels in human orbital fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;245:360-7.
- 27) Valyasevi RW, Jyonouchi SC, Dutton CM, et al. Effect of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and transforming growth factor-beta on adipogenesis and expression of thyrotropin receptor in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:903-8.
- 28) Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2352-8.
- 29) Feldon SE, O'Loughlin CW, Ray DM, et al. Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol* 2006;169:1183-93.
- 30) Smith TJ. Novel aspects of orbital fibroblast pathology. *J Endocrinol Invest* 2004;27:246-53.
- 31) Chen B, Tsui S, Smith TJ. IL-1 beta induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy. *J Immunol* 2005;175:1310-9.
- 32) Young DA, Evans CH, Smith TJ. Leukoregulin induction of protein expression in human orbital fibroblasts: evidence for anatomical site-restricted cytokine-target cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8904-9.
- 33) Smith TJ, Sempowski GD, Wang HS, et al. Evidence for cellular heterogeneity in primary cultures of human orbital fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2620-5.
- 34) Koumas L, Smith TJ, Feldon S, et al. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol* 2003;163:1291-300.
- 35) Khoo TK, Coenen MJ, Schiefer AR, et al. Evidence for enhanced Thy-1 (CD90) expression in orbital fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2008;18:1291-6.

=ABSTRACT=

Effect of Gangliosides Mixture on Differentiation of Orbital Fibroblasts into Adipocytes

Youn-Hee Choi, MD, PhD^{1,2}, Eun Hyung Cho, MD³, Koung Hoon Kook, MD, PhD^{2,3}

Department of Physiology, Ewha Womans University School of Medicine¹, Seoul, Korea

Chronic Inflammatory Disease Research Center, Ajou University School of Medicine², Suwon, Korea

Department of Ophthalmology, Ajou University School of Medicine³, Suwon, Korea

Purpose: To investigate the role of gangliosides in the differentiation of orbital fibroblasts into adipocytes, a component in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy.

Methods: Orbital tissues were obtained during orbital surgery for subjects without Graves' ophthalmopathy or other inflammatory orbital disease, and orbital fibroblasts were primarily cultured from each obtained tissue. Morphological examination of orbital fibroblasts was performed after treatment with commercially available gangliosides mixture (Gmix) comprised of several subtypes. To determine the effect of Gmix on the differentiation of orbital fibroblasts into adipocytes and the differentiation-related genes, Oil Red-O staining and RT-PCR were performed.

Results: The treatment with Gmix induced the morphological changes, which at least in part were explained with the differentiation of orbital fibroblasts into adipocytes in accordance with the increase of mRNA level of genes known to be related to adipogenesis, whereas dermal fibroblasts and preadipocytes were irresponsive to the same treatment.

Conclusions: The results from the present study suggest gangliosides may have a role in pathologic mechanisms of Graves' ophthalmopathy by the induction of differentiation of orbital fibroblasts into adipocytes.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(3):338-344

Key Words: Adipocyte differentiation, Gangliosides mixture, Graves' ophthalmopathy, Orbital fibroblast

Address reprint requests to **Koung Hoon Kook, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Ajou University Hospital
San 5 Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-721, Korea
Tel: 82-31-219-5260, Fax: 82-31-219-5259, E-mail: drkook@ajou.ac.kr