

## 자외선 조사를 한 수정체 상피세포에서 Nuclear Factor Kappa B의 활성화에 관한 연구

이도형<sup>1</sup> · 김정권<sup>1</sup> · 오세훈<sup>1</sup> · 김용권<sup>2</sup> · 주천기<sup>3</sup>

인제대학교 의과대학 일산백병원 안과<sup>1</sup>, 연세대학교 의과대학 안과학교실, 시기능 개발 연구소<sup>2</sup>  
가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 안과<sup>3</sup>

**목적** : 배양된 사람 수정체 상피세포에서 자외선 조사 후 생기는 세포사에 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)의 활성화가 미치는 영향을 알아보고 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제함으로써 어떠한 변화가 일어나는지 알아보고자 하였다.

**대상과 방법** : Simian virus 40 (SV40)으로 핵산전달감염(transfection)된 사람 수정체 상피 세포주를 배양한 후 312 nm의 자외선 B를 에너지 효율 0.6mW/cm<sup>2</sup>로 1, 2, 3, 4분간 조사하였다. 세포의 생존률은 MIT assay를 이용하여 측정하였고 NF- $\kappa$ B의 활성화는 NF- $\kappa$ B p65 항체를 이용한 면역세포화학검사를 시행하였다. 또한 실제로 NF- $\kappa$ B가 DNA에 결합하는 정도를 보기 위하여 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 시행하였다. NF- $\kappa$ B의 활성화 억제제인 sulfasalazine을 자외선 조사 30분 전에 배지에 첨가하여 같은 실험을 하였다.

**결과** : 자외선을 조사한 수정체 상피세포는 생존률이 감소하였는데 특히 3 분 이상 조사한 군에서 현저히 감소함이 관찰되었다. 한편 면역세포화학검사로 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 전위를 관찰할 수 있었으며 실제로 NF- $\kappa$ B와 DNA의 결합 정도를 나타내는 EMSA 상 6시간에 활성화가 가장 증가됨이 관찰되었다. 반면 sulfasalazine을 투여한 군에서는 이러한 세포사가 관찰되지 않았으며 면역세포화학검사로도 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 전위를 관찰할 수 없었다.

**결론** : 수정체상피세포에서 자외선 조사 후 일어나는 NF- $\kappa$ B의 활성화는 세포사에 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

<한안지 45(3):500-506, 2004>

백내장은 노인성 질환 중 발생빈도가 높고 평균 연령의 증가로 점차 증가추세에 있다. 백내장이 생기는 기전은 매우 복잡하며 당뇨병 등과 같은 전신 질환 뿐만 아니라 자외선, 열, 호르몬 이상, 흡연 등과 관련이 있는 것으로 보고되어 왔다.<sup>1</sup> 그 중 자외선은 역학적으로 또한 실험적으로 백내장을 일으키는 중요한 요인으로 알려졌다.<sup>2,3</sup> 자외선은 그 생물학적 성질에 따라 UVC (200~290nm), UVB (290~320nm), UVA (320~400nm)로 나뉘며 이 중 각막은 200~300nm의 파장의 자외선을 흡수하고 300~400nm의 자외선은 투과하여 수정체에서

흡수하게 된다. 다만 이러한 자외선의 백내장 발생에 대한 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않은 실정이다. 현재까지 알려져 있기에는 자외선에 의한 DNA손상 축적, 수정체 상피세포막의 구조와 기능의 변형, 그리고 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (HO<sup>-</sup>) 등의 reactive oxygen species (ROS) 생성으로 인한 수정체 내의 생리학적, 생화학적 변화가 백내장을 형성하는 것으로 보고되고 있다.<sup>4,5</sup> 최근 염증이나 면역학적 반응에 있어서 평시에는 불활성 상태로 존재하다가 여러가지 자극에 의해 활성화되는 내인성 전사요소인 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)가 관여하고 있음이 밝혀졌는데<sup>6</sup> NF- $\kappa$ B는 LPS 또는 TNF나 IL-1과 같은 염증 매개 물질, 바이러스 감염, 자외선 조사, B또는 T세포의 활성화, 그리고 다른 생리적 또는 비생리적 자극에 의해 활성화 되어 세포사 기전에 관여한다고 보고되고 있다.<sup>7</sup>

저자들은 이미 자외선으로 유발된 각막 상피 세포의 손상기전에 NF- $\kappa$ B가 중요한 역할을 담당함을 보고한 바 있다.<sup>8</sup> 본 연구는 동일한 방법을 이용하여 자외선 조사가 유발하는 수정체 손상의 기전에 있어서 내인성 전

<접수일 : 2003년 7월 23일, 심사통과일 : 2004년 3월 6일>

통신저자 : 주 천 기

서울시 서초구 반포동 505  
가톨릭대학교 강남성모병원 안과  
Tel: 02-590-2615, Fax: 02-533-3801  
E-mail: ckjoo@cmc.cuk.ac.kr

\* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(02-PJ1-PG1-CH02-0003).

사요소인 NF- $\kappa$ B의 관련성을 알아보고 이러한 전사요소의 활성화가 억제되었을 경우의 세포손상 여부에 관해 연구하기 위하여 시행되었다. 자외선의 조사에 의한 세포의 손상을 관찰하기위해 사람 수정체 상피세포(HLE-B3 cells)를 배양한 후 수정체에서 흡수되는 영역인 290~320nm를 가지는 자외선 B를 조사하였다. NF- $\kappa$ B의 활성화의 여부는 면역세포화학검사와 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 이용하여 알아보았다. 또한, NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하기 위해 sulfasalazine을 투여한 후 동일한 실험을 반복하여 세포의 생존률 및 NF- $\kappa$ B의 활성화 정도를 비교함으로써, 자외선에 의한 수정체 손상에서 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 요인임을 밝히고 나아가 자외선 조사로 유발되는 백내장의 예방을 위해 NF- $\kappa$ B의 활성 억제가 담당할 수 있는 역할을 타진하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

## 대상과 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 사용된 주요 시약, 소모품 및 기기는 다음과 같다.

Minimum essential media (MEM), 우태아혈청 (fetal bovine serum ; FBS), Phosphate buffer solution (PBS), Hank's balanced salt solution (Hank's BSS), trypsin-EDTA solution (이상 Gibco lab), sodium deoxycholate sulfate (SDS) (이상 E. Merk Co., Germany), ammonium chloride, naphthylethylenediamine dihydrochloride, sodium borate, sodium phosphate, sulfonilamide, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (이상 Sigma, St. Lois, MO), Tacs 2 TdT-Blue Label In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD), rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), sheep anti-rabbit IgG rhodamine (Boehringer Manhein Corp., Indianapolis, IN), CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific, Inc.), sterile bench, 위상차 도립 현미경(Olympus, CK 2, Japan), 원심 분리기(Hanil Corp.), spectrophotometer (Bio-Tek instrument Co.)등이 사용되었으며, 기타 피펫(Coring, USA), 배양용기(Nunclon, Denmark), 시험관(Falcon, USA) 등은 일회용 제품을 사용하였다. UVB의 광원은 UVX-31 (Serial

No. E20069)를 이용하였다.

### 2. 세포 배양

본 연구에 사용될 세포군의 조건으로, 계대 배양을 하더라도 수정체 상피세포의 고유의 성질을 잃지 않게 하기위해 사람의 수정체 상피세포에 SV40 (simian virus 40)을 transfection시켜 처리한 B3 cell line 세포군을 사용하였다. 세포 배양은 MEM에 56°C에서 30분간 열처리한 우태아혈청을 20% 함유시킨 합성 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다. 포화된 세포 단층(confluent cell monolayer) 형성은 배양 후 1주 쯤 관찰되었으며, 단층 배양 상태가 되면 Hank's BSS로 2회 세척 후, 0.25% trypsin-EDTA (calcium-magnesium free Hank's BSS에 trypsin 5 mg/ml와 EDTA 50  $\mu$ g/ml를 함유한 용액)로 처리하여 세포를 분리시킨 후 1500 rpm에서 6분간 원심 분리 하였다. 그 후 여기에 포함된 trypsin-EDTA 용액을 제거하기 위해 Hank's BSS로 다시 2회 세척한 후, 수집된 세포에 새로운 배양액 3 ml를 첨가하여 부유시킨 후 계대 배양하였다. 이러한 방법으로 10회 계대 배양한 B3 세포를 본 연구에서 사용하였다.

### 3. UVB 조사량에 의한 수정체 상피세포의 생존률

단층 배양된 상피 세포를 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 떼어낸 후, 세포수가  $5 \times 10^4$  cells/well가 되도록 합성배지에 부유시켜 24well plate에 각각 0.5 ml씩 분주했다. 그리고 조직 배양기에서 18시간 배양하여 단층 배양 상태가 되도록 한 다음, Hank's BSS로 두 번 씻어내고 0.1 ml의 Hank's BSS를 넣었다. 이후 24well plate의 뚜껑을 열고 UVB lamp를 이용하여 UVB를 조사하였다. 본 실험에서 사용한 자외선의 파장은 312 nm였으며, 배지로부터 10 cm 떨어진 거리에서 조사하였는데 이 때의 UVB는 에너지 효율 0.6 mW/cm<sup>2</sup>의 강도(irradiance)였으며, 노출 시간을 1, 2, 3 그리고 4분간으로 하여 노출시간에 따른 각각의 생존률 정도를 비교하였다. UVB를 조사하고 30분 후 Hank's BSS를 제거하고 합성배지에 serum free MEM을 0.5 ml씩 첨가한 후 조직배양기에서 배양하고, 24시간 후에 수정체 상피세포의 생존률을 살아있는 미토콘드리아의 탈수소 효소에 의해 tetrazolium salt가 dark blue formazan 화합물로 바뀌는 성질을 이용한 생체염색의 한 방법인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 방법을 이용하여 측정하였다.<sup>9</sup> 그 후

500  $\mu$ l의 배지가 들어있는 24well 배양용기에 5 mg/ml MTT 용액을 50  $\mu$ l씩 첨가 후 37°C에서 1시간 동안 보온하고, SDS를 300  $\mu$ l 씩 추가로 첨가한 후, 570 nm의 파장에서 흡광도의 변화를 micro ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 이 때 세포의 생존률은 각 군의 흡광도의 수치를 대조군 칸(자외선을 조사하지 않은 군)의 흡광도 수치로 나눈 백분율로 계산하였다.

#### 4. 자외선 조사 후 시간 경과에 따른 NF- $\kappa$ B의 면역 세포화학검사

Chamber slide에  $1 \times 10^4$  cells 이 되도록 세포를 분주하고 15시간 뒤에 60%의 단층배양이 된 후 자외선 B를 100 mJ/cm<sup>2</sup> 이 되도록 조절한 후 자외선을 3 분간 조사하였으며 2, 4, 8, 12, 18, 24시간 뒤에 각각 PBS로 한 차례 씩 세척한 후 70% 에탄올로 1시간 동안 세포를 고정하였다. 세포 고정 후 1시간 뒤에 세포를 PBS로 세 차례 세척한 후 일차 항체 0.5  $\mu$ g/ml를 투여하고 12시간 동안 배양한 후 다시 PBS로 세 차례 세척하였다. 그리고 이차 항체를 투여하고 1시간 동안 37°C에서 배양한 후, chamber slide를 증류수로 세척하고 coverslip으로 덮은 다음 546 nm filter의 형광 현미경으로 관찰하였다.

#### 5. NF- $\kappa$ B의 억제제인 sulfasalazine을 이용한 UVB에 대한 보호효과

NF- $\kappa$ B 억제제로 알려진 sulfasalazine을 DMSO에 녹여 농도가 0.5  $\mu$  mole이 되도록 한 후 UVB조사 30분 전에 24 well 배양용기의 배지에 첨가하고 위와 동일한 실험을 반복하였다. Sulfasalazine의 농도 결정은 예비 실험에서 sulfasalazine을 다양한 농도로 조절한 후, MTT assay를 이용하여 sulfasalazine이 수정체 상피세포에 독성을 미치지 않는 농도로 결정하였다.

#### 6. Nuclear extract의 preparation

자외선을 조사한 후 2, 4, 6, 8, 12시간에 세포를 ice-cold PBS로 세척한 뒤 scrapping하여 4°C, 12,000 rpm 에서 1 분 간 원심 분리한 뒤 400  $\mu$ l의 buffer A, 즉 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1mM EGTA, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.6% (v/v) Nonidet P-40을 첨가하였다. Nuclear pellets을 30  $\mu$ l 의 buffer C, 즉 20 mM

HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10g/ml aprotinin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF에 부유시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 20 분 간 원심 분리한 후 상층액을 용기에 담았다. 단백질량은 Bio-Rad protein assay kit을 이용하였으며 -70°C에 보관하였다.

#### 7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA는 NF- $\kappa$ B oligonucleotide probe와 gel shift assay kit를 이용하여 실시하였다.<sup>7</sup> <sup>32</sup>P-labelling of NF- $\kappa$ B oligonucleotide는 T4-polynucleotide kinase와 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3,000 Ci/mmol)를 이용하였다. 결합반응은 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 20% glycerol 과 0.25 mg/ml poly(dI-dC) · poly(dI-dC)를 함유한 binding 완충액(buffer) 10  $\mu$ l에 핵추출물(nuclear extracts) 5  $\mu$ g 를 섞은 용액에 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP labelling NF- $\kappa$ B oligonucleotide probes (5 fmol per reaction)를 첨가하여 수행하였다. 혼합된 시료는 실온에서 20분간 incubation 한 후 100V에서 한 시간 동안 미리 전기영동 시킨 TGE buffer에 5% non-denaturing polyacrylamide gel 을 이용하여 200V에서 두 시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 겔을 건조시킨 뒤 X-ray 필름에 노출시켰다.

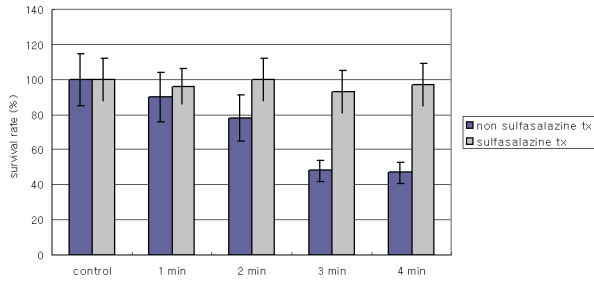
#### 8. 통계처리

배양된 수정체 상피세포에서 자외선 조사량에 따른 세포독성을 측정하여 MTT assay를 이용한 세포 생존률의 산술 평균치와 표준편차를 구하였으며 유의성 검정은 ANOVA with Duncan's multiple range test (SAS, ver. 6.0)를 사용하여 검정하였다. 유의성은 p<0.05시 의미가 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. UVB 조사량에 따른 수정체 상피세포의 생존률

1, 2, 3 그리고 4분간 UVB를 조사한 후 MTT assay로 측정한 수정체 상피세포의 생존률은 자외선의 조사량에 따라 현저히 감소하는 양상을 보였으며, 약 3 분간 UVB를 조사했을 때 수정체 상피세포의 생존률이 대조군에 비하여 약 50%가 되는 것을 알 수 있었다. 반면 0.5  $\mu$  mole 농도의 sulfasalazine을 처리했을 때, 대조



**Figure 1.** Dose-dependent cytotoxic effects of irradiated UVB in cultured lens epithelial cells with/without sulfasalazine treatment. UVB irradiation showed progressive cytotoxic effect with increasing irradiation time in the control group. In sulfasalazine treated group, the cytotoxic effects was protected despite UV irradiation. Standard variation for each result is indicated by the error bars.

군과의 세포 생존률을 비교해보면 sulfasalazine을 처리한 군에서 1~4분간 조사한 자극에 반응을 하지 않음을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ )(Fig. 1).

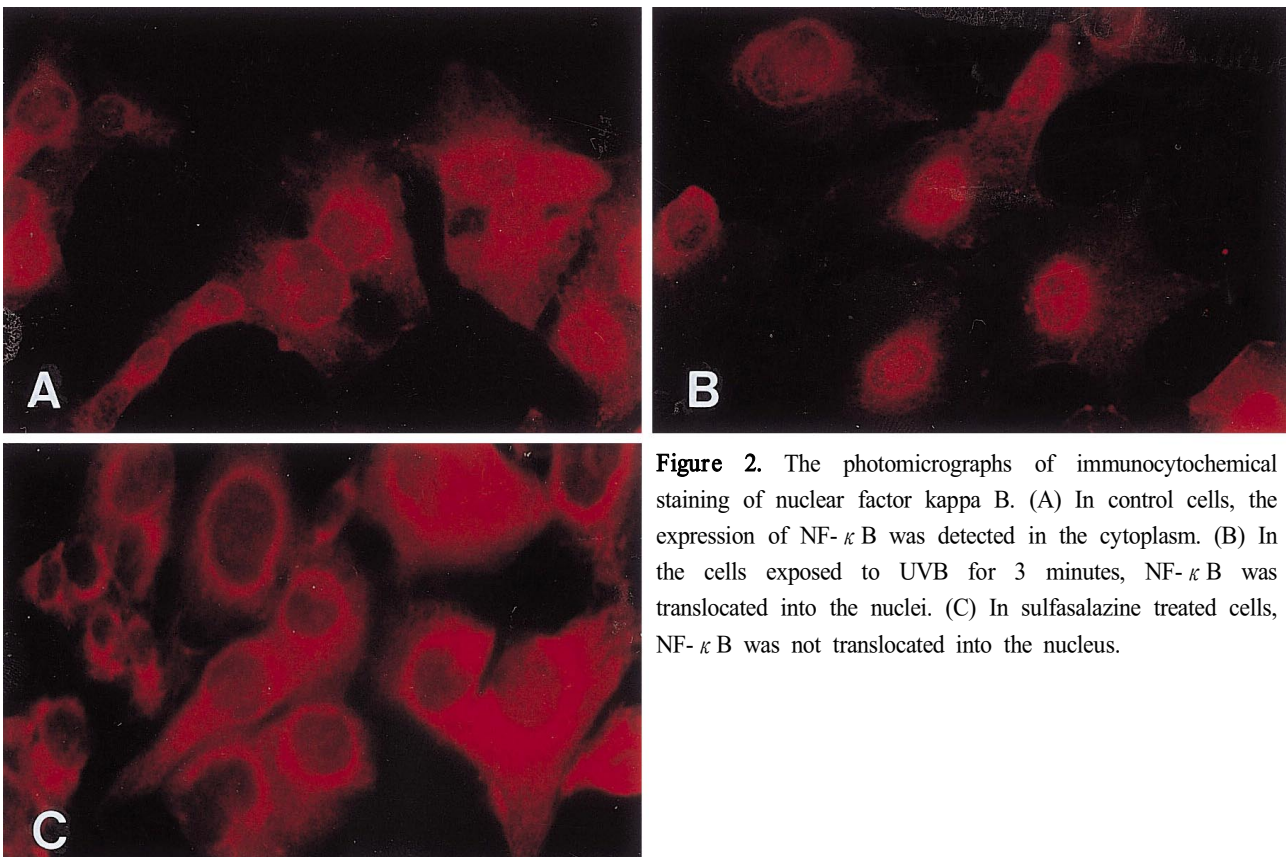
## 2. 면역세포화학 염색 상의 NF- $\kappa$ B의 활성화

수정체 상피세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성화를 알아보기 위해 면역세포화학 염색을 시행하였는데, NF- $\kappa$ B는 원래 세포질 내에 불활성 형태로 존재하다가 세포의 핵 내로 이동하여 활성화 되는 것으로 UVB를 조사하지 않은 대조군에서는 NF- $\kappa$ B가 주로 세포질 내에 존재하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 3분간 UVB를 조사한 수정체 상피세포에서는, UVB를 조사한 후 4시간 뒤부터 NF- $\kappa$ B의 발현이 관찰되기 시작하였고, 8시간 후에 가장 많이 나타났다가(Fig. 2B). 반면 sulfasalazine을 투여한 군에서는 이러한 NF- $\kappa$ B의 전위가 조사한 시간대에서 관찰되지 않았다(Fig. 2C).

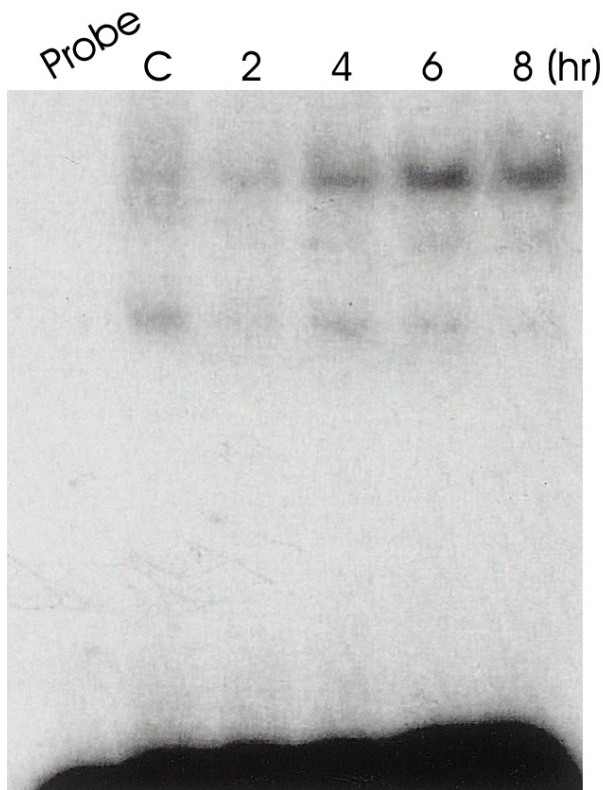
## 3. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

면역세포화학 염색상 나타난 결과를 확인하기 위하여 행한, 실제로 NF- $\kappa$ B가 DNA에 결합하는 정도를 나타내는 EMSA 결과상 자외선 조사 후 4시간부터 시작되어 6~8시간에 최대치를 보였고 그 후 감소하는 양상을 보여 면역세포화학검사와 일치하는 소견을 보였다(Fig. 3).

## 고 찰



**Figure 2.** The photomicrographs of immunocytochemical staining of nuclear factor kappa B. (A) In control cells, the expression of NF- $\kappa$ B was detected in the cytoplasm. (B) In the cells exposed to UVB for 3 minutes, NF- $\kappa$ B was translocated into the nuclei. (C) In sulfasalazine treated cells, NF- $\kappa$ B was not translocated into the nucleus.



**Figure 3.** Time course of the effects of ultraviolet irradiation on the DNA-binding activities of NF- $\kappa$ B in human lens epithelial cells. The DNA binding with NF- $\kappa$ B was peaked at 6 hours after ultraviolet irradiation.

자외선 중 300~400nm의 자외선은 수정체에 직접 흡수되기 때문에 수정체의 손상, 즉 백내장의 형성에 직접적인 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.<sup>10</sup> 이러한 자외선에 의한 백내장의 발생기전은 정확히 밝혀져 있지는 않지만 수정체 상피세포의 광화학적 작용에 의한 DNA의 손상과 이로 인한 단백질 합성의 이상, 구조 단백질의 변성, 효소의 불활성화, 세포막 손상에 따른 전해질의 불균형 등 여러 생화학적, 생물학적인 변화가 축적되어 수정체 상피세포에 독성작용을 일으키기 때문으로 생각된다.<sup>45</sup>

최근 저자들은 SV40으로 핵산전달감염된 각막 상피 세포주에서 자외선 조사 후 세포사가 일어나고 이러한 세포사가 일어나기 전에 NF- $\kappa$ B의 활성화가 일어나는 것을 관찰하여 각막 상피세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성화가 세포사를 일으키는 여러 기전 중 일부를 담당하고 있음을 보고하였다.<sup>8</sup> 세포사에 있어서 NF- $\kappa$ B의 역할은 세포에 따라 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>11-17</sup> 저자들은 이러한 NF- $\kappa$ B의 작용경로가 자외선을 조사한 수정체 상피세포에서도 일어날 것으로 생각하여 본 연구를 시행하였다.

NF- $\kappa$ B는 본래 B-세포에서 immunoglobulin kappa chain 유전자의 발현 조절에 관여하는 역할이 확인되면서 명명된 전사인자로서 NF- $\kappa$ B/Rel 단백질 가족군의 여러 조합에 의해 구성된 이중체 (dimer)의 전사인자이다. 이는 cytokine 및 염증 매개성 유전자들의 유도발현에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있다.<sup>11</sup> 이러한 NF- $\kappa$ B는 세포에 따라 세포사를 유발하거나<sup>12</sup> 세포사를 억제하는 작용을 한다는 보고<sup>13</sup>가 있어 그 작용이 세포에 따라 다르게 나타나는 것으로 추측된다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 외부의 자극, 즉 세포가 lipopolysaccharide (LPS)나 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 바이러스 감염, 자외선 조사, B 또는 T cell의 활성화, Reactive Oxygen Species (ROS), 그리고 다른 생리적 또는 비생리적 자극에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> NF- $\kappa$ B의 작용기전은 정확히 밝혀져 있지 않으나, p65/p50 단백질의 이형이중체(heterodimer)가 평상시 세포질 내에 inhibitory kappa B(I $\kappa$ B)라는 억제 단백질에 의해 잡혀 있다가 어떠한 신호를 받았을 때 세포질 내에 존재하고 있던 NF- $\kappa$ B에서 I $\kappa$ B가 분리된 후 남은 이중체가 세포핵 내로 이동하여 target DNA에 부착하게 되고 특정 유전자를 활성화시켜 세포사를 유발하거나 또는 세포사를 억제하는 것으로 보고 되고 있다.<sup>18,19</sup>

본 연구에서는 자외선 조사 후 수정체 상피 세포에서 세포사가 일어나기 직전에 NF- $\kappa$ B의 활성화가 일어나는 것을 관찰할 수 있었고, 이는 각막 상피 세포와 마찬가지로 수정체 상피세포에서도 NF- $\kappa$ B의 활성화가 세포사를 일으키는 여러 기전 중 일부를 담당하고 있음을 시사한다. 한편 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제시켜 세포사를 막을 수 있는지 여부를 보기 위하여 NF- $\kappa$ B의 작용경로를 특이적으로 억제시키는 물질로 알려진 sulfasalazine을 처리한 후 관찰하였는데<sup>20,21</sup> sulfasalazine의 NF- $\kappa$ B에 대한 작용기전은 NF- $\kappa$ B에서 I $\kappa$ B의 분리를 억제함으로써 나타난다고 알려져 있다.<sup>20,22</sup>

본 실험에서는 수정체 상피세포에 자외선을 조사하기 30분 전에 독성을 미치지 않는 농도의 sulfasalazine을 처리하였고, sulfasalazine을 처리한 군에서 NF- $\kappa$ B의 세포핵 내로의 전이가 일어나지 않음과 이와 동시에 수정체 상피세포의 세포사가 거의 일어나지 않음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 각막상피세포와 비슷한 결과를 보여 각막이나 수정체에서 자외선의 중요성을 확인할 수 있었다.

이상과 같은 결과로 미루어 볼 때 자외선으로 유발된 수정체 상피세포의 세포사에 따른 백내장의 발생기전에 있어서 NF- $\kappa$ B의 중요성을 알 수 있었고, sulfasalazine과 같은 NF- $\kappa$ B 억제제에 의해 세포의 손상을 막

음으로써 자외선으로 유발된 백내장의 발생 또한 억제할 수 있는 가능성을 발견하였다. 향후 NF- $\kappa$ B pathway와 관련된 신호전달체계에 대한 연구 등이 시도되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- 1) Worgul BV, Merriam GR Jr, Medvedovsky C. Cortical cataract development- an expression of primary damage to the lens epithelium. *Lens Eye Tox Res* 1989;6:559-71.
- 2) Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, et al. Effect of ultraviolet radiation in cataract formation. *N Engl J Med* 1988;319:1429-33.
- 3) Zigman S, Vaughn T. Near-ultraviolet light effect on the lenses and retinas of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974;13:462-5.
- 4) Spector A, Garner H. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981;33:673-81.
- 5) Ramachandran S, Morris SM, Devamanoharan P, et al. Radio-isotopic determination of hydrogen peroxide in aqueous humor and urine. *Exp Eye Res* 1991;53:503-6.
- 6) Saliou C, Kitazawa M, McLaughlin L, et al. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1-2, 174-83.
- 7) Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
- 8) 이도형, 최규대, 주천기. 자외선을 조사한 각막상피세포에서 Nuclear Factor Kappa B의 활성화에 관한 연구. *한안지* 2002;43:171-7.
- 9) Harpe JD, Nathan CF. A semi-automated microassay for H2O2 release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Immunol Methods* 1985;78:323-36.
- 10) 홍래선, 고성민, 신경환. 배양된 가토 수정체 상피세포에 대한 자외선 B의 영향. *한안지* 1997;38:35-46.
- 11) DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, et al. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1997;388:853-62.
- 12) Grimm S, Bauer MKA, Bauerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down regulates the activity of transcription factor NF-kB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134:13-23.
- 13) Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, et al. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:784-7.
- 14) Chen YG, Zhang C, Chiang SK, et al. Increased nuclear factor-kappa B p65 immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Neurosci Res* 2003;72:125-31.
- 15) Yang P, McKay BS, Allen JB, et al. Effect of mutant IkappaB on cytokine-induced activation of NF-kappaB in cultured human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1339-47.
- 16) Dudek EJ, Shang F, Taylor A. H(2)O(2)-mediated oxidative stress activates NF-kappa B in lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:651-8.
- 17) Choi JS, Kim JA, Kim DH, et al. Failure to activate NF-kappaB promotes apoptosis of retinal ganglion cells following optic nerve transection. *Brain Res* 2000;883:60-8.
- 18) Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:784-7.
- 19) Regnier CH, Song H, Gao H, et al. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* 1997;90:373-83.
- 20) Egan LJ, Sandborn WJ. Inhibition of nuclear factor kappaB by sulfasalazine: a new target for inflammatory bowel disease therapy? *Gastroenterology* 1998;115:1295-6.
- 21) Jue DM, Jeon KI, Jeong JY. Nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 1999;14:231-8.
- 22) Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998;101:1163-74.

=ABSTRACT=

## The Role of Nuclear Factor Kappa B on Lens Epithelial Cells after Ultraviolet B Irradiation

Do-Hyung Lee, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Jung-Kweon Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
Sae-Hoon Oh, M.D.<sup>1</sup>, Eung-Kwon Kim, M.D.<sup>2</sup>, Choun-Ki Joo, M.D., Ph.D.<sup>3</sup>

*Department of Ophthalmology, Ilsan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University<sup>1</sup>  
The Institute of Vision Research, Department of Ophthalmology, Yonsei University, College of Medicine<sup>2</sup>  
Department of Ophthalmology, Kangnam St. Mary's Hospital,  
The Catholic University of Korea, College of Medicine<sup>3</sup>*

**Purpose:** This study was performed to determine the role of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) on the lens epithelial cell death after ultraviolet (UV) irradiation.

**Methods:** Simian virus 40 transfected human lens epithelial cells (HLE B-3 cells) were used in this study. UVB located at 10cm from the bottom was irradiated during 1, 2, 3 and 4 minutes. To measure the cytotoxicity MTT assay was used. Translocation of NF- $\kappa$ B was examined by immunocytochemistry with anti NF- $\kappa$ B p65 antibody and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). To confirm the role of NF- $\kappa$ B, the cells were pretreated with sulfasalazine, a specific inhibitor of NF- $\kappa$ B, for 30 minutes before irradiation, and cytotoxicity and translocation of NF- $\kappa$ B were evaluated.

**Results:** UV irradiation produced a progressive cytotoxic effect in cultured HLE B-3 cells after 1 minute and maximum cytotoxicity was reached after 3 minutes irradiation. When HLE B-3 cells were irradiated with UVB, the translocation of NF- $\kappa$ B was observed in immunocytochemistry. These translocations were peaked 6 hours after UV irradiation in EMSA. In HLE B-3 cells pretreated with sulfasalazine, the translocation of NF- $\kappa$ B was blocked. The cellular death after UV irradiation was markedly blocked by sulfasalazine. UV irradiation can translocate NF- $\kappa$ B and sulfasalazine is a useful blocking agent in this pathway. In addition, sulfasalazine can prevent cellular death after UV irradiation.

**Conclusions:** These findings suggest that NF- $\kappa$ B plays an important role in cellular death after UV irradiation.

J Korean Ophthalmol Soc 45(3):500-506, 2004

**Key Words:** Human lens epithelial cells, Nuclear factor kappa B, Ultraviolet irradiation

---

Address reprint requests to **Choun-Ki Joo, M.D.**

Department of Ophthalmology, Kangnam St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea  
#505 Banpo-dong, Seocho-ku, Seoul 137-040, Korea

Tel: 82-2-590-2615, Fax: 82-2-533-3801, E-mail: ckjoo@cmc.cuk.ac.kr