

# 배양된 각막 기질세포에서 Ceramide로 유발된 apoptosis

박혜련 · 김태임 · 차홍원

울산대학교 의과대학 안과학교실

**목적 :** 각막 기질세포의 apoptosis 과정에 ceramide가 관계하는지 여부와 어떤 경로를 통하여 apoptosis가 일어나는지에 대해 알아보고자 하였다.

**대상과 방법 :** 각막 기질세포를 배양한 후, ceramide type II 와 type VI, phytoceramide type II 와 type VI를 처리하여 시간대 별로 LDH activity를 측정하여 apoptosis를 평가하였다. CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK), specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO), specific caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK)를 사전 처리한 후의 apoptosis를 평가하였고, 각각의 ceramide를 처리 후 cytochrome C 면역 염색을 시행하였다.

**결과 :** 4가지 종류의 ceramide 모두에서 20 μM 이상의 농도에서 apoptosis가 잘 유발되었고, ceramide의 처리 시간이 증가 할수록 LDH의 활성도가 증가하였다. 4가지 ceramide의 LDH의 활성도가 CPP32-like protease inhibitor 와, caspase-8 inhibitor, caspase-9 inhibitor 의 처리로 억제되었다. cytochrome C 면역 염색에 양성 반응을 보였다.

**결론 :** 배양된 각막 기질세포에서 ceramide에 의해 apoptosis가 유발 되었으며, 이는 caspase cascade 중, mitochondria를 거치는 경로를 통해 일어남을 알 수 있었다.

<한안지 44(4):945-954, 2003>

Apoptosis는 이미 예정된 세포사의 한 과정으로 다른 세포 생물에서 항상성을 유지하는데 필수적인 기전이다.<sup>1,2</sup> Apoptosis는 조직 괴사(necrosis)와는 달리, 마지막 단계까지 세포막의 기능이 유지되어서 세포내의 독성 물질이 세포 외로 유출되지 않아, 주변 조직에 염증 반응을 일으키지 않고 개개의 세포가 제거되는 과정이다.<sup>3,4</sup> Apoptosis를 활성화시키는 신호 전달체계는 모든 세포 내에 정상적인 환경에서는 비활성화 된 상태로 존재하나 여러 가지 외부 자극에 의해 활성화되게 된다.<sup>1,2</sup> Apoptosis를 유도하는 신호 전달 체계가 모두 밝혀지지는 않았으나 최근 몇 년간 ceramide에 대한 관심이 증가하고 있다.

Wilson 등<sup>3</sup>은 각막 상피세포의 손상에 대한 반응으로 각막 기질세포의 소설이 생기며, 이는 apoptosis에 의해 매개된다고 하였다. 기계적인 조작, 삼투압에 의한

탈수, 강력한 환경자극, virus에 의한 감염 등에 의해 각막 상피세포의 손상이 일어나고, 이어 각막 기질세포의 apoptosis가 유발된다.<sup>3,5</sup> Apoptosis에 의해 각막 기질세포가 제거된 후, 각막 상피세포의 과다 증식과 기질세포의 재활성화 및 재형성이 일어나게 되며, 이로 인해 교원질이 포함된 세포외 기질의 과합성 등이 유발되며, 이는 굴절 수술 후의 근시 재발 및 각막 혼탁 발생의 원인이 될 수 있다.<sup>3,6,7</sup>

본 연구에서는 각막 기질세포의 apoptosis 과정에 ceramide가 관계하는지 여부와 관계한다면 ceramide에 의해 각막 기질세포에서 유발되는 apoptosis는 어떤 경로를 통하여 유발되는지를 알아보고자 하였다.

## 대상과 방법

### 1. 각막 기질세포 배양

1.5 kg Newzealand White Rabbit의 귀 정맥에 공기를 주입 하여 치사시킨 후, 안구를 적출하였다. 5% Povidone iodide 용액에 3-5 분간 소독한 후 cold PBS (phosphate-buffered solution)로 2번 세척하였다. 안구에서 공막 부분이 2-3 mm 포함되도록 각막을 채취하여 PBS로 세척하였다. 현미경하에서 데스메

<접수일 : 2002년 12월 10일, 심사통과일 : 2003년 2월 19일>

통신저자 : 차 흥 원

서울시 송파구 풍납동 388-1  
서울아산병원 안과  
Tel: 02-3010-3680, Fax: 02-470-6440  
E-mail: hwtchah@www.amc.seoul.kr

막을 분리하고 0.4% dispase II를 가한 후 37°C에서 30분간 배양하여, 10% FBS DMEM을 넣고 blade로 각막 상피세포를 긁어내었다. 주위의 공막을 제거한 각막 조직을 dish바닥에 붙인 후 10% FBS DMEM을 조직이 마르지 않을 정도만 넣어주고 배양하였다. 70% 이상 자란 단세포층의 각막 기질세포를 trypsinize시켜 세포를 분리해 낸 후 배양액에 세포를 모았다. 96 well plate에 세포의 성장 속도에 따라 well 당 같은 양으로  $3 \times 10^3$ 에서  $5 \times 10^3$ 개의 세포를 뿐리고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 24~48시간 배양하였다.

## 2. Ceramide 농도와 시간에 따른 apoptosis의 평가

① 한 well 당  $3 \times 10^3$ 에서  $5 \times 10^3$ 개의 각막 기질세포에 ceramide type II, type VI (Sigma, USA), phytoceramide type II, type VI (이후 C2, C6, P2, P6)를 각각 10, 20, 40, 80 μM 처리하여 24시간 배양 후 다음의 ②, ③, ④의 방법으로 apoptosis를 평가 하였다. 또한 각각의 ceramide 20 μM을 처리하여 6, 12, 24시간에 대한 apoptosis를 조사하였다.

② LDH Assay (CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA)

각각의 ceramide를 처리하여 배양한 후, 한 well 당 그 배양액 50 μL를 새로운 96 well로 옮기고, 50 μL reconstituted substrate mix를 첨가하여 실온에서 30분 동안 빛을 차단한 후 배양하였다. 50 μL stop solution을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 490 nm 파장에서 LDH활성도를 ELISA reader로 판독하였다.<sup>8</sup>

③ Hoechst-EthD (Molecular probe, Netherland) 염색

배양된 각막 기질세포에 ceramide를 처리한 후, 살아 있는 세포 상태에서 Hoechst 33342 1 μg/mL을 직접 배양 세포에 처리한 다음 37°C에서 30분간 반응시키고, UV filter에서 형광 현미경과 위상차 현미경으로 촬영하였다.<sup>9</sup>

④ Phosphatidylserine Externalization Assay (Annexin V binding assay, Caltag laboratories, USA)

각각의 ceramide를 처리하여 배양한 후, 37°C의 HEPES buffer (pH7.4)로 세척하고, HEPES buffer에 녹인 5 μg/mL biotinylated annexin V 용액으로 37°C에서 30분간 반응시켰다. HEPES buffer로 세척 후 4% paraformaldehyde/0.1M PBS (pH 7.4)로 30분간 고정하였다. Avidin-HRP complex용액을 1:300으로 희석하여 1시간 반응 시킨 후, PBS용액으로 세척하고 0.05% diaminobenzo-

nine/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 발색시켜 광학 현미경 하에서 관찰하였다.<sup>10</sup>

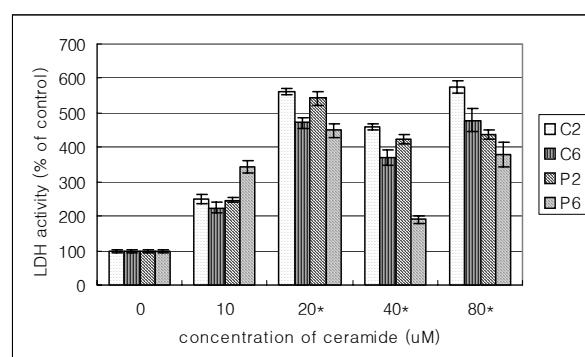
## 3. Ceramide에 의한 apoptosis 단계분석

① 배양되어 well에 나누어 담은 각막 기질세포에 CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK, Calbiochem, Germany)를 0, 10, 100, 1000, 10000 nM의 농도로 사전 처리하고, 3시간 후에 각각의 ceramide 20 μM을 넣고 12시간 배양 후 LDH의 활성도를 측정하였다.

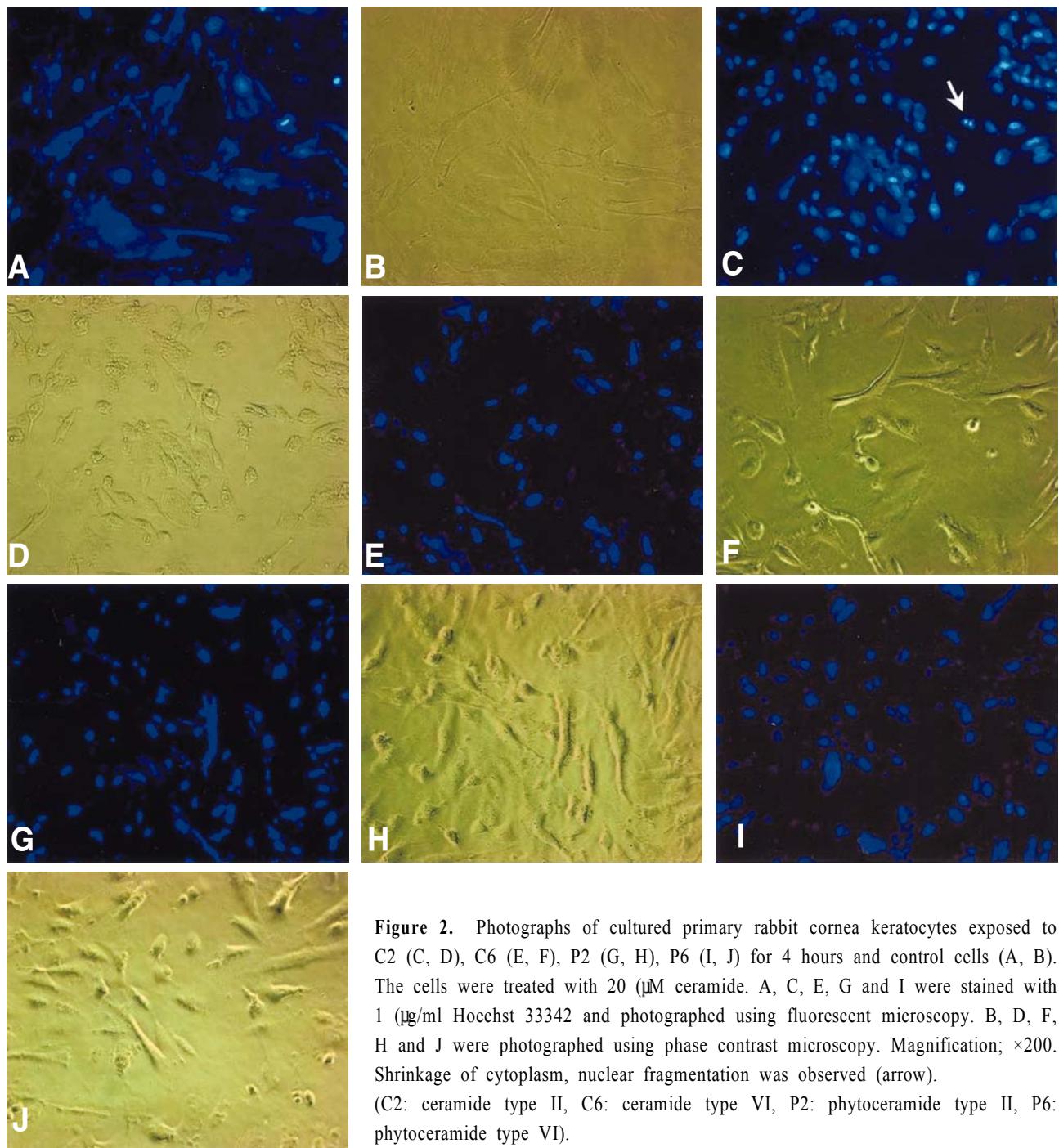
② 각막 기질세포에 specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO, Calbiochem, Germany)를 0, 50, 100 μM의 농도로 사전 처리하고, 1시간 후에 각각의 ceramide 20 μM을 넣고 12시간 배양 후 LDH의 활성도를 측정하였다.

③ Ceramide를 시간대 별로 처리한 후, Methanol로 1시간 고정하고, 2% BSA로 비특이 반응을 방지한 후 Cytochrome C rabbit polyclonal antibody (Satnta Cruz Biotechnology, USA)를 1:200으로 희석하여 2시간 동안 면역 염색을 시행하였다. PBS로 세척 후, anti-rabbit IgG biotinylated antibody (Vector laboratories, USA)로 1시간 동안 항원 항체반응을 유도하고, avidin-biotin peroxidase complex를 이용하여 반응을 유도시키고, 0.05% diaminobenzidine/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 발색시켜 광학현미경 하에서 관찰하였다.

④ 각막 기질세포에 specific caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK, Calbiochem, Germany)를 0,



**Figure 1.** Cell death in primary rabbit cornea keratocyte was caused by various ceramides application. Dose dependent cytotoxicity was measured at 24 hours after each ceramide application (\*P<0.01 by ANOVA analysis). (C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).



**Figure 2.** Photographs of cultured primary rabbit cornea keratocytes exposed to C2 (C, D), C6 (E, F), P2 (G, H), P6 (I, J) for 4 hours and control cells (A, B). The cells were treated with 20 ( $\mu\text{M}$ ) ceramide. A, C, E, G and I were stained with 1 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Hoechst 33342 and photographed using fluorescent microscopy. B, D, F, H and J were photographed using phase contrast microscopy. Magnification;  $\times 200$ . Shrinkage of cytoplasm, nuclear fragmentation was observed (arrow). (C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

50, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 사전 처리하고, 1시간 후에 각각의 ceramide 20  $\mu\text{M}$ 을 넣고 12시간 배양 후, LDH의 활성도를 측정하였다.

#### 4. 통계 분석법

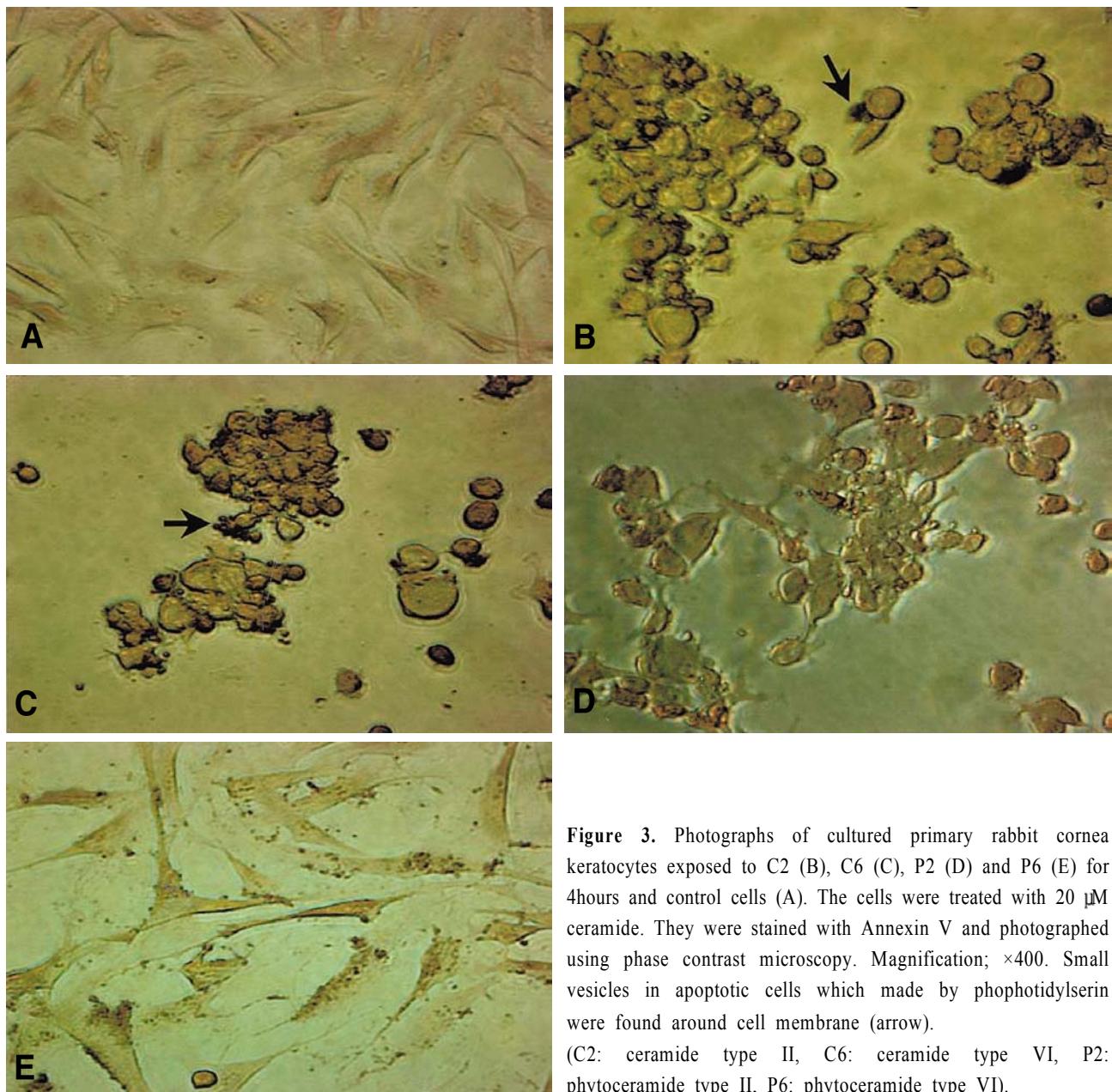
LDH의 활성도를 각 군별로 ANOVA를 이용하여 검정하였고 여기에는 SPSS 통계프로그램(SPSS 10.0

for Windows, SPSS Inc)을 이용하였다.

#### 결과

##### 1. ceramide 농도와 LDH activity

각막 기질세포에 C2, C6, P2와 P6를 각각 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  농도의 ceramide로 처리하여 24시간 배



**Figure 3.** Photographs of cultured primary rabbit cornea keratocytes exposed to C2 (B), C6 (C), P2 (D) and P6 (E) for 4hours and control cells (A). The cells were treated with 20  $\mu\text{M}$  ceramide. They were stained with Annexin V and photographed using phase contrast microscopy. Magnification;  $\times 400$ . Small vesicles in apoptotic cells which made by phosphatidylserine were found around cell membrane (arrow).

(C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

양 후 apoptosis를 평가 하였다. 4가지 종류의 ceramide 모두에서 20  $\mu\text{M}$ 에서부터 LDH의 활성도의 증가를 보였으며( $p\text{-value} < 0.01$ ), 이 결과를 바탕으로 다음 실험을 진행하였다(Fig. 1).

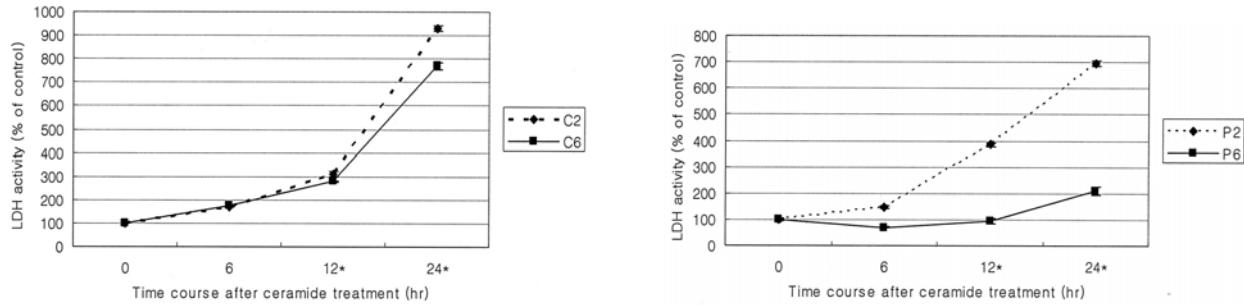
## 2. apoptosis의 발생

각각 기질세포에 4가지 종류의 ceramide 20  $\mu\text{M}$ 를 처리한 군과 ceramide를 처리하지 않은 대조군을 4시간 배양한 후 Hoechst 염색을 시행하였다(Fig. 2). 대조군에 비해 ceramide처리 군에서 apoptosis가 일어

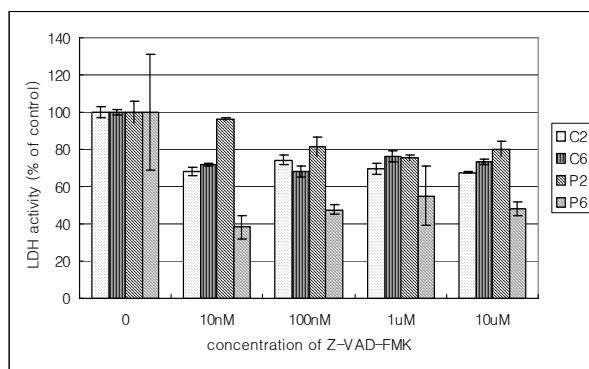
난 세포에서 관찰 할 수 있는 응축되거나 쪼개진 핵을 더 많이 관찰할 수 있었다. Annexin V 염색을 같은 조건에서 시행해 보았는데 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰할 수 있는 phosphatidyl serine에 의해 생기는 세포막 주위의 작은 소포들이 관찰되는 소견을 보여 ceramide에 의해 apoptosis가 유발되는 것을 세포질과 세포막에서 확인할 수 있었다(Fig. 3).

## 3. 시간에 따른 apoptosis

각각 기질세포에 각각의 ceramide 20  $\mu\text{M}$ 을 처리



**Figure 4.** Time course of cell death after application of various ceramides application. Each 20  $\mu\text{M}$  ceramide was treated. LDH assay was used for cell toxicity test. Data show mean  $\pm$ S.D. of each 3 samples. LDH acitivity was significantly increased after 12 hours exposure to four type ceramides and was dependent on exposure time ( $^*P < 0.01$ ).  
(C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

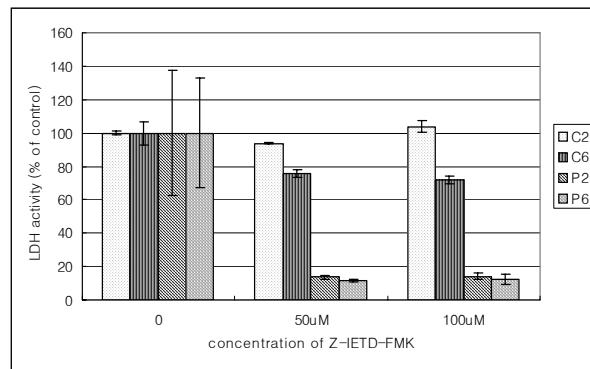


**Figure 5.** The effect of CPP32-like protease inhibitor, Z-VAD-FMK on primary rabbit cornea keratocyte. Rabbit cornea keratocytes were preincubated for 3 hours in various concentrations of CPP32-like inhibitor, Z-VAD-FMK. At 12 hours after each ceramide application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. Each 20  $\mu\text{M}$  ceramide was treated. Data show mean  $\pm$ S.D. of each 3 samples. Z-VAD-FMK significantly inhibited apoptosis induced by all 4 types of ceramides  
(C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

하여 6, 12, 24시간 경과에 따른 apoptosis를 조사하였다. P6에서 다른 ceramide에 비해 가장 낮은 LDH 활성도를 보였다. 통계적 유의성에 있어선 12시간 이후부터 유의하게 증가함을 보였고( $p$ -value  $<0.01$ ), 시간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4).

#### 4. CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK)의 효과

P6로 처리 한 기질 세포에서 가장 강한 억제를 보였

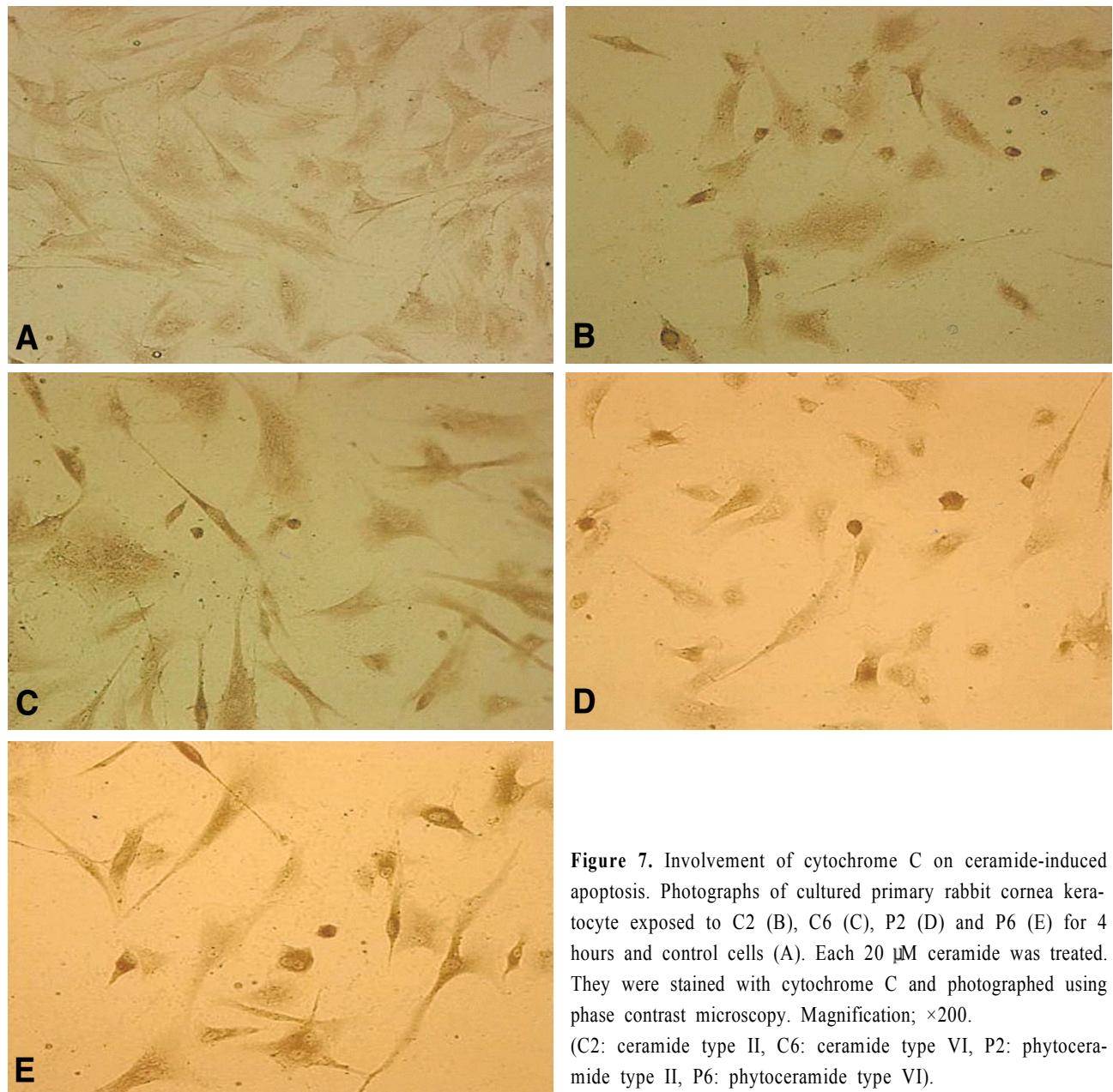


**Figure 6.** The effect of Caspase-8 inhibitor, IETD-CHO on primary rabbit cornea keratocyte. Rabbit cornea keratocyte was preincubated for 1 hour in various concentrations of IETD-CHO. At 12 hours after each ceramide application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. Each 20  $\mu\text{M}$  ceramide was treated. Data show mean  $\pm$ S.D. of each 3 samples. IETD-CHO significantly inhibited apoptosis induced by various ceramides except ceramide type II  
(C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

으며, 4가지 ceramide의 LDH 활성도 모두 10 nM 이상의 CPP32-like protease inhibitor의 처리로 통계적으로 유의하게 억제되는 것으로 나타났다( $p$ -value  $<0.01$ ) (Fig. 5).

#### 5. specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO)의 효과

C2를 제외한 3종류 ceramide에서 통계적으로 유의한 억제를 보였다( $p$ -value  $<0.05$ ). 특히 phytoceramide가 ceramide에 비해 specific caspase-8 inhi-



**Figure 7.** Involvement of cytochrome C on ceramide-induced apoptosis. Photographs of cultured primary rabbit cornea keratocyte exposed to C2 (B), C6 (C), P2 (D) and P6 (E) for 4 hours and control cells (A). Each 20  $\mu$ M ceramide was treated. They were stained with cytochrome C and photographed using phase contrast microscopy. Magnification;  $\times 200$ .  
(C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

bitor (IETD-CHO)에 더 강한 억제를 보이는 것으로 나타났다( $p\text{-value}=0.013$ , P2,  $p\text{-value}=0.003$ , P6) (Fig. 6).

#### 6. cytochrome C 염색

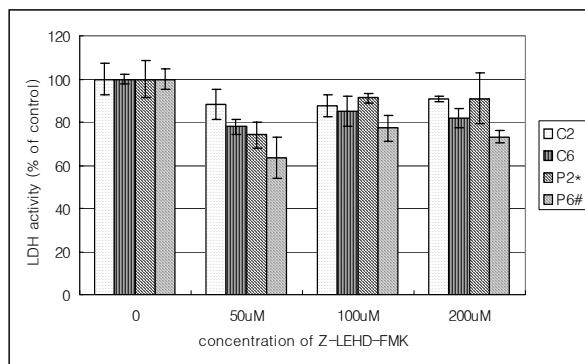
ceramide를 처리한 모든 경우에 있어서 apoptosis가 일어난 세포에서 면역 염색에서 양성 반응을 보였다 (Fig. 7).

#### 7. caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK)의 효과

P2 ( $p\text{-value}=0.004$ )와 P6 ( $p\text{-value}=0.001$ )에서 caspase-9 inhibitor에 의한 유의한 LDH 활성도의 억제를 보였다 (Fig. 8).

## 고 찰

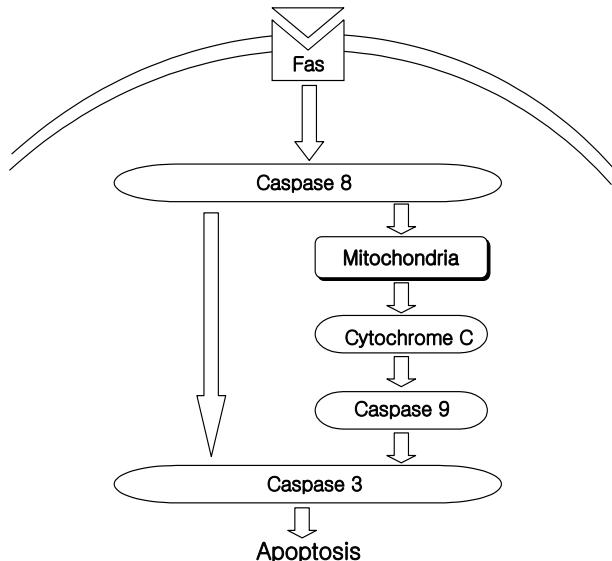
Nakayasu<sup>11</sup>와 Campos 등<sup>12</sup>은 각막 상피의 손상 후에 표층 각막 기질세포의 소실에 관하여 최초로 기술한 바 있으며, 상피의 치과 손상 후의 표층 각막 기질세포의 소실이 apoptosis의 과정과 연관된다고 보고하였다. 전자현미경의 관찰에 의하면 수상 후 4시간 내에 세



**Figure 8.** The effect of Caspase-9 inhibitor, Z-LEHD-FMK on primary rabbit cornea keratocyte. Rabbit cornea keratocyte was preincubated for 1 hour in various concentrations of Z-LEHD-FMK. At 12 hours after each ceramide application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. Each 20  $\mu$ M ceramide was treated. Data show mean $\pm$ S.D. of each 3 samples. Z-LEHD-FMK significantly inhibited apoptosis induced by P2 and P6 ( $^*P=0.013$ ,  $^{\#}P=0.003$ ). (C2: ceramide type II, C6: ceramide type VI, P2: phytoceramide type II, P6: phytoceramide type VI).

포자연사가 나타났으며, 10일까지 그 반응이 지속되는 것으로 알려져 있다.

각막 기질세포의 apoptosis는 기계적 손상이나 압력에 의해 단독으로 생기지는 않는 것으로 생각되며 상피세포와 아래쪽의 표층 각막 기질세포와의 상관 관련에 의해 생긴다고 알려져 왔다.<sup>4,13</sup> 그 동안의 여러 보고에 따르면, IL-1과 Fas-Fas 연결이 각막 상피 손상과 관련된 각막 기질세포의 apoptosis에 연관이 있는 것으로 생각되고 있다.<sup>3,14-17</sup> IL-1이 이미 Fas 수용체가 발현되어 있는 세포에서 Fas 연결을 유도하고 이것이 각막 기질세포의 apoptosis를 유도한다. Fas ligand는 tumor necrosis factor 수용체와 nerve growth factor를 포함하는 세포 표면 수용체군의 일종으로 세포질내의 ‘death domain’을 공유하는데 이것은 caspase cascade의 결합에 매우 중요하다. 어떠한 자극에 의해 Fas 수용체가 활성화되면, caspase-8이 활성화 되고, 이어서 2가지의 다른 경로를 통해 caspase-3가 활성화 되어 apoptosis가 일어난다. 직접 caspase-3를 활성화 시켜 apoptosis를 일으키는 경로와, mitochondria를 거치는 경로가 있는데, 이중 후자는 활성화된 caspase-8이 mitochondria에서 cytochrome C를 세포질내로 유리시키고, 이 cytochrome C는 다시 caspase-9을 활성화시키며, 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>18,19</sup>(Fig. 9). 이 과정에서 ceramide는 세포사의 중단, 세포 분화, 자연사의 다양한 세



**Figure 9.** Schematic representation of the caspase cascade. Activated caspase-8 leads directly to caspase-3 activation or activate caspase-3 via the mitochondria.

포반응을 유도하는 이차매개체로 알려져 있다. 이를 바탕으로 ceramide가 각막 기질세포의 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보기 하였다.

본 연구에 따르면, 각막 기질세포에서 ceramide에 의한 apoptosis가 유발되었고, 20  $\mu$ M에서 가장 apoptosis가 잘 유발이 되었으며, 시간이 증가 할수록 apoptosis 유발이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). 각막 기질세포에서의 ceramide에 의해 매개되는 apoptosis가 caspase cascade를 거치는지를 알아보기 위하여 caspase 억제제를 사용하여 apoptosis 억제 여부를 관찰하였다. Caspase를 전반적으로 억제하는 CPP32-like protease inhibitor와 caspase-8 inhibitor로 처리한 경우에 있어서는 apoptosis가 억제되었고, phytoceramide의 경우가 ceramide에 비해 더 큰 억제력을 보였다(Fig. 5, 6). 이 결과를 바탕으로 ceramide로 유도되는 apoptosis가 caspase cascade를 통해 일어남을 알 수 있었다. Caspase cascade의 두 가지 경로 중 관계되는 경로를 밝히기 위해 ceramide로 apoptosis를 유발 시킨 후 cytochrome C 면역 염색을 시행하여 mitochondria를 거치는 경로를 통하는지를 알아보았다. 그 결과 apoptosis가 일어난 세포에서 양성 반응을 보였고 이것은 mitochondria의 cytochrome C가 관련된 경로를 통해 apoptosis가 유발된다는 증거로 생각되었다(Fig. 7). 만약 이 경로를 통한다면 caspase-9의 작용을 억제할 경우에 apoptosis가 억제 될 것으로 생각되어,

caspase-9 억제제를 처리해 본 결과 C2와 C6에서는 억제되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았고, P2와 P6의 경우는 유의한 억제를 보였다(Fig.8). 즉, ceramide의 경우 부분적으로 다른 경로를 통해서도 apoptosis를 유발한다는 것을 암시해주고 있다. Phytoceramide는 sphingoid의 4번 탄소에 수소 대신 수산화기(hydroxyl group)를 가지고 있는데, 이는 포유류 ceramide의 yeast counterpart로 생각된다.<sup>20-22</sup> 기존의 연구 결과에 따르면, phytoceramide가 ceramide보다 더 강하게 작용하는 것으로 나타난다고 했는데<sup>23</sup>, 본 연구에서는 ceramide와 phytoceramide가 비슷하게 apoptosis를 유발하는 것으로 나타났으며, 다만 phytoceramide에 의한 apoptosis가 억제제에 의해 더 많이 억제되는 경향을 볼 수 있었다. 이상으로 요약하면, 저자들은 본 연구를 통해 ceramide가 각막 기질세포의 apoptosis를 유발하고, 이것은 mitochondria를 거치는 caspase cascade를 통해 일어남을 알 수 있었다.

이전의 보고에 의하면 PRK와 LASIK 수술 모두에서 각막 상피의 손상이 각막 기질세포의 apoptosis를 초래하는 것이 관찰되었다. Gao 등<sup>24</sup>은 photorefractive keratectomy (PRK) 후 수일 뒤의 각막 기질세포의 자연사를 보고하였으며, 상피세포의 손상 후의 수일 후에 새로운 각막 기질세포의 출현을 관찰하였다. 그러나 이렇게 새로 생긴 각막 기질세포는 밀도가 증가되고 망상체가 증가하는 형태학적인 변화를 가져와 세포가 활성화된다는 것을 보여주었다. 이렇게 활성화된 각막 기질세포는 교원질의 축적과 손상을 가져 와서 굴절수술 후의 근시의 재발과 각막 혼탁을 가져온다. 또한 성장인자를 분비하고 이것은 상피세포의 과성장을 가져오는데 각막 상피세포의 과성장과 분화의 부족으로 인해 굴절수술의 효과를 반감시키는 역할을 할 수 있다.<sup>3,15,25</sup> 비교적 각막상피의 손상을 주지 않는 transseptelial PRK에서는 수술 후의 전층 각막 기질에 있어서 각막 기질세포의 apoptosis가 적어 각막 상피의 손상을 줄이는 것으로 보고 되었다.<sup>26,27</sup> 그러나 현재 까지 수술에 있어서 apoptosis가 각막의 창상과 치유 과정에 있어 어떠한 영향을 미치는지에 관해 다양한 견해가 존재 한다.

저자들은 본 연구에서 ceramide에 의한 각막 기질세포의 apoptosis를 단계를 살펴보았다. 아직까지 각각의 단계가 완전히 규명된 것은 아니지만 초기의 세포의 apoptosis를 줄이거나, 수술 후 재활성화 되는 활성화된 각막 기질세포의 apoptosis를 유발하는 방법이 굴절 수술 후의 각막 혼탁과 수술 효과의 감소를 줄여서 시력 개선 효과를 높이고 합병증을 줄이는데 역할을 할

수 있을 것으로 생각한다. 이런 목적으로 생체내의 이미 존재하는 물질인 ceramide가 새로운 치료 보조제로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 1) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
- 2) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-54.
- 3) Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996;62:325-7.
- 4) 제승연, 최희영, 이종수 등. 엑시머레이저의 각막절제양에 따른 각막실질세포의 apoptosis 비교. *한안지* 2001;42:1045-51.
- 5) Santana P, Llanes L, Hernandez I, et al. Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* 1996;137:2480-9.
- 6) Hanna KD, Pouliquen YM, Waring GO 3rd, et al. Corneal wound healing in monkeys after repeated excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1286-91.
- 7) Del Pero RA, Gigstad JE, Roberts AD, et al. A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates. *Am J Ophthalmol* 1990;109:419-29.
- 8) Barak A, Morse LS, Goldkorn T. Ceramide: a potential mediator of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:247-54.
- 9) Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, et al. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994;17:59-65.
- 10) Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res* 1994;214:242-49.
- 11) Nakayasu K. Stromal changes following removal of epithelium in rat cornea. *Jpn J Ophthalmol* 1988;32:113-25.
- 12) Campos M, Szerenyi K, Lee M, et al. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol* 1994;112:254-60.
- 13) Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, et al. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:276-83.
- 14) Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, et al. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 1994;59:63-71.

- 15) Wilson SE, Li Q, Weng J, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1582-92.
- 16) Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 1997;65:575-89.
- 17) Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189-92.
- 18) Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- 19) Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A ,et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-87.
- 20) Mao C, Saba JD, Obeid LM. The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J* 1999;342:667-75.
- 21) Skrzypek MS, Nagiec MM, Lester RL, Dickson RC. Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* 1999;181:1134-40.
- 22) Saba JD, Nara F, Bielawska A, et al. The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem* 1997;272:26087-90.
- 23) Hwang O, Kim G, Jang YJ, et al. Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides. *Mol Pharmacol* 2001;59:1249-55.
- 24) Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, et al. Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Cornea* 1997; 16:200-8.
- 25) Li Q, Weng J, Mohan RR, et al. Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:727-39.
- 26) Gimbel HV, DeBroff BM, Beldavs RA, et al. Comparison of laser and manual removal of corneal epithelium for photo-refractive keratectomy. *J Refract Surg* 1995;11:36-41.
- 27) Johnson DG, Kezirian GM, George SP, et al. Removal of corneal epithelium with phototherapeutic technique during multizone, multipass photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1998;14:38-48.

=ABSTRACT=

## Ceramide-Induced Apoptosis in Cultured Keratocyte

Hye Ryun Park, M.D., Tae-im Kim, M.D., Hungwon Tchah, M.D.

*Department of Ophthalmology, Asan Medical Center, University of Ulsan, College of Medicine*

**Purpose:** We investigated the effect of ceramide on keratocyte apoptosis and pathway of ceramide-induced keratocyte apoptosis.

**Methods:** Cultured Newzealand White Rabbit keratocytes were exposed to various concentrations of ceramide type II, VI and phytoceramide type II, VI. LDH level was measured for the evaluation of time and concentration related apoptosis. Keratocytes were preincubated in various concentrations of CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK, diffuse caspase inhibitor), specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO) and specific caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK), then were exposed to 20  $\mu$ M of 4 types of ceramide. Cytochrome C immune staining was done after exposure of keratocyte to 4 types of ceramide.

**Results:** The lower effective dose of 4 types of ceramide was 20  $\mu$ M. Apoptosis of keratocytes was dependent on ceramide exposure time. Ceramide induced keratocyte apoptosis was inhibited by CPP32-like protease inhibitor, specific caspase-8 inhibitor and specific caspase-9 inhibitor. Apoptotic keratocytes induced by ceramide were immune-stained with cytochrome C antibody.

**Conclusions:** Ceramide induced apoptosis in cultured corneal keratocytes. This apoptosis developed according caspase cascade, especially via mitochondria.

J Korean Ophthalmol Soc 44(4):945-954, 2003

**Key Words:** Apoptosis, Caspase, Ceramide, Keratocyte, Mitochondria

---

Address reprint requests to **Hungwon Tchah, M.D.**

Department of Ophthalmology, University of Ulsan, College of Medicine, Asan Medical Center  
#388-1 Pungnap-2dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea  
Tel: 82-2-3010-3680, Fax: 82-2-470-6440, E-mail: hwtchah@amc.seoul.kr