대한안과학회지 제 44 권 제 11 호 2003
J Korean Ophthalmol Soc 44(11):2627-2636, 2003

수정체상피세포에서 Ceramide 및 Phytoceramide에 의해 유발된 세포자멸사

채주병 · 김태임 · 차흥원

울산대학교 의과대학 안과학교실

목적 : 세포자멸사(apoptosis)의 이차매개체로 알려진 ceramide와 phytoceramide가 수정체상피세포의 세포자멸사를 유발하는지의 여부와 그 경로를 알아보고자 하였다.
대상과 방법 : 소의 수정체 상피세포에 다양한 농도의 ceramide와 phytoceramide를 처리한 후 세포자멸사를 확인하기 위해 Hoechst-EthD염색과 Annexin V염색을 시행하였다. 세포자멸사 경로를 알아보기 위해 수정체 상피를 CPP32-like protease inhibitor, caspase 8 inhibitor, caspase 9 inhibitor를 처리하고, ceramide 와 phytoceramide에 노출시켜 LDH assay를 통해 세포자멸사를 평가하였다. 그리고 세포자멸사와 cytochrome c와의 관계를 평가하였다.
결과 : 모든 종류의 ceramide와 phytoceramide는 수정체 상피세포에 농도와 시간에 비례한 세포자멸사를 유발하였다. Caspase-8,9 inhibitor는 ceramide와 phytoceramide의 세포자멸사 과정을 억제하였다. 모든 수정체 상피세포에서 cytochrome c 염색에서 양성을 보였다.
결론 : 모든 ceramide와 phytoceramide는 수정체상피세포에 있어서 세포자멸사를 유발하였고 따라서 백내장 수술 후 발생하는 후낭혼탁에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.
〈한안지 44(11):2627-2636, 2003〉

수정체 상피세포에서 세포자멸사는 백내장 형성과정 및 백내장 적출술 후 후낭 혼탁의 예방과 관련되어 연구되어왔다.[1-10] Sugar alcohol, 자외선(UV) 및 mitomycin C, calcimycin, 5-fluorouracil, daunomycin, aclacinomycin등의 화학물질은 세포자멸사를 일으키는 물질로 알려져 있으며,[4-10] sugar alcohol과 자외선(UV)은 백내장 형성과정을 설명하는 데에 연관되어 주로 연구되고 있고, mitomycin, calcimycin, daunomycin, aclacinomycin등의 화학물질은 후낭 혼탁의 방지와 관련되어 연구되어 왔다.

세포자멸사는 세포사의 생리적인 형태이며 세포괴사(cell necrosis)와 달리 세포 자체에서 계획적으로 이루어지는 반응이다. 세포자멸사는 염증을 유발하는 부작용을 일으키지 않으며 세포외적으로 death receptor에 특이적인 death ligand가 결합함으로써 이루어 지거나, 방사선, 열, 저산소증 등의 세포 내 스트레스 등에 의해서 세포 내 신호체계가 발현되어 나타나게 된다. 세포자멸사에 대한 여러 연구들은 death receptor와 그 ligand들과 세포 내 신호체계와 관련하여 antiproliferative chemotherapy의 개발에 그 주안점을 두고 있다. 이와 관련된 단백질 등의 존재와 기능에 대한 연구들은 세포자멸사의 신호전달체계를 이해하고 조절하는데 이용되고 있으며 최근의 연구에서 세포자멸사의 시작과 과정이 세포 종류와 세포물질에 선택적임이 알려지고 있다.[11]

Ceramide는 세포자멸사를 일으키는 이차적 전령물질로 알려져 있으며, tumor necrosis factor α, fas ligand, 방사선, 항암제, interferon β, interferon γ, 열손상, 화학적손상 등의 자극에 의해서 분비된다. 이러한 자극은 spingomyelin pathway를 활성화시키고 sphingomyelin-specific sphingomyelinase는 ceramide synthetase와 함께 spingomyelin을 ceramide로 변화시킨다. JNK/SAPK, c-jun/AP-1, CPP32-like protease등의 활성화를 통해 ceramide는 세포자멸사를 유발하며 이 과정에서 pro-

〈접수일 : 2003년 5월 14일, 심사통과일 : 2003년 9월 29일〉

통신저자 : 차 흥 원
서울시 송파구 풍납동 388-1
서울아산병원 안과
Tel: 02-3010-3679, 3680, Fax: 02-470-6440
E-mail: hwtchah@amc.seoul.kr

tein kinase C의 세포질 내로의 분비가 보고된 바 있다.[12-20] Phytoceramide(N-acyl-4D-ribo-phytoshpingosines)는 yeast의 성장과 스트레스 반응을 조절하는 물질로 영장류(mammalian)에서의 ceramide에 해당되는 물질로ceramide와 다른점은 sphingolipid의 C5에 hydrogen대신 hydroxyl기가 있다는 점이다. Ceramide와의 효능 차이는 이견이 많으나 phytoceramide의 대량 생산 가능성과 효과는 이미 증명된 사실이다. 따라서 phytoceramide는 ceramide의 대용물로서 연구되고 있다.[20-24]

Shen과 Tao[25]는 ceramide hydrolase와 synthetase가 소의 수정체상피세포에서 발견되었음을 보고하였다. 그러나 수정체상피세포와 ceramide와의 연관성에 대한 보고는 지금까지 없었다. 따라서 본 연구에서는 소의 수정체상피세포에서ceramide와 phytoceramide가 세포자멸사를 일으킬 수 있는지 알아보고, 만일 그렇다면 세포자멸사가 일어나는 경로에 대하여알아보고자 하였다.

대상과 방법

1. 수정체 상피세포 일차 배양 준비

소의 수정체낭을 2.0mg/ml의 collagenase로 37℃에서 16시간동안 처리한 후 10% fetal bovine serum (FBS)에 처리된Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 1ml를 첨가하여 세포들을 원심 분리하였다. 원심분리후의 부유물은 버리고 남아있는 세포들은 다시 1.5 ml의 성장배지(growth medium)에 섞은 후 12개 plate에 나누어 담아 14일간 배양하였다. 세포들은 암실상태에서 10% FBS에 penicillin(10U/ml), streptomycin (10 μg/ml), amphotericin B (250 ng/ml)가 첨가된 DMEM에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양되었다.

2. Ceramide처리 세포자멸사 염색 평가

1) Hoechst-EthD (Molecular probe®, Netherlands) 염색

Hoechst 33342 염색은 조각화된 핵을 염색해서 핵조각화 및 cytoplasm 위축 소견을 관찰 할 수 있어서 세포자멸사 여부를 판별할 수 있는 염색 방법이다. 세포들을 20 μM의 ceramide type II와 VI, phytoceramide type II와 VI로 12시간동안 처리한 군을 실험군으로 하고 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 1 μg/ml Hoechst 33342로 염색하여 형광 현미경과 위상차 현미경으로 관찰하였다.

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

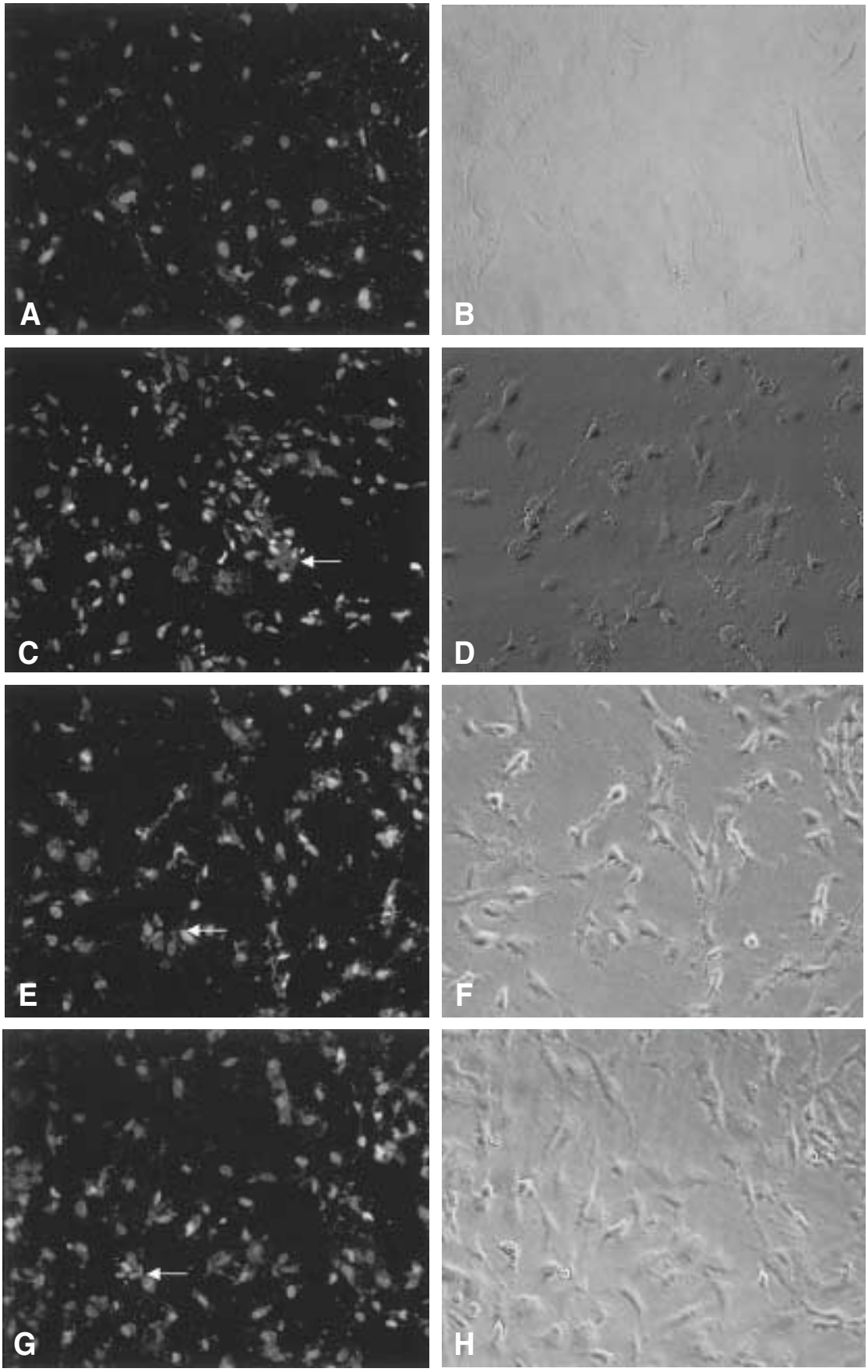
Annexin V binding assay® 는 세포자멸사가 일어난 세포에서 관찰할 수 있는 phosphatidyl serine에 의해 생기는 세포막 주위의 작은 소포를 염색하게 된다. 이 원리를 이용하여 세포들을 20 μM의 ceramide type II, VI와 phytoceramide type II, VI로 처리한 후 Annexin V로 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

3. Ceramide와 phytoceramide의 농도와 처리시간에 따른 세포 독성의 평가

세포자멸사가 일어나는경우 핵파괴 및 조각화로 인해서 LDH가 올라가게 되므로 각각의 농도에 따른 세포 독성 및 이에 연관되어 나타나는 세포자멸사 정도를 알기 위해 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 삼고 다양한 농도의 ceramide와 phytoceramide(0 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM, 80 μM)를 처리한 군을 실험군으로 삼아 12시간 뒤에 LDH assay (CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA)를 하였다. 또한 시간에 따른 세포 독성과 연관되어 나타나는 세포자멸사의 정도를 알아보기 위해 20 μM의 ceramide와 phytoceramide에 각각 0, 6, 12, 24시간 동안 노출 시킨 후 세포 독성을 통한 세포자멸사의 과정을 측정하여 LDH assay를 시행하였다.

4. 세포자멸사의 경로(pathway)분석

배양 전에 0, 10, 100, 1000, 10000nM 농도의 CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK®, Calbiochem, Germany)를 한 시간 동안 처리한 후 20M ceramide와 phytoceramide 를 각각 첨가하였다. 같은 방법으로 0, 50, 100, 200M 농도의 specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO®, Z-IETD®, Calbiochem, Germany) 와 specific caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK®, Calbiochem, Germany)를 한시간 동안 처리한 후 20M ceramide와 phytoceramide를 각각 첨가하였다. 12시간 후에 LDH assay를 시행하여 세포자멸사의 억제정도를 평가하였다.


A
B
C
D
E
F
G
H

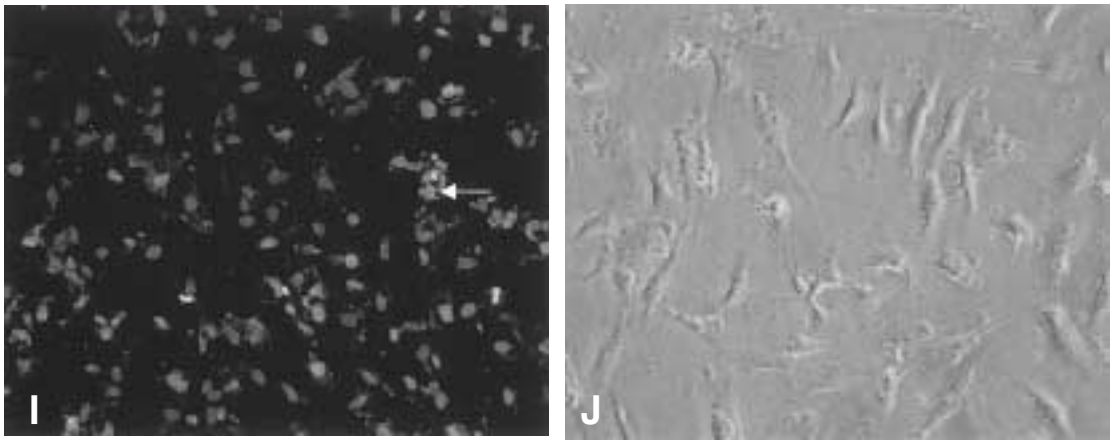


Figure 1. Photographs of control cells(A, B) and primary bovine lens epithelial cells exposed to 20μ M ceramide type II for 12 hours (C, D), 20μ M ceramide type VI for 12 hours (E, F), 20μ M phytoceramide type II for 12 hours (G, H), 20μ M phytoceramide type VI for 12 hours (I, J). Apoptotic features such as shrinkage of cytoplasm and nuclear fragmentation (Arrows) were better observed in the ceramide treated group (C, E, G, I) than in the control group (A). A, C, E, G, and I were stained with 1μ g/ml Hoechst 33342 and photographed using fluorescent microscopy. B, D, F, H, and J were photographed using phase contrast microscopy. Magnification; ×200.

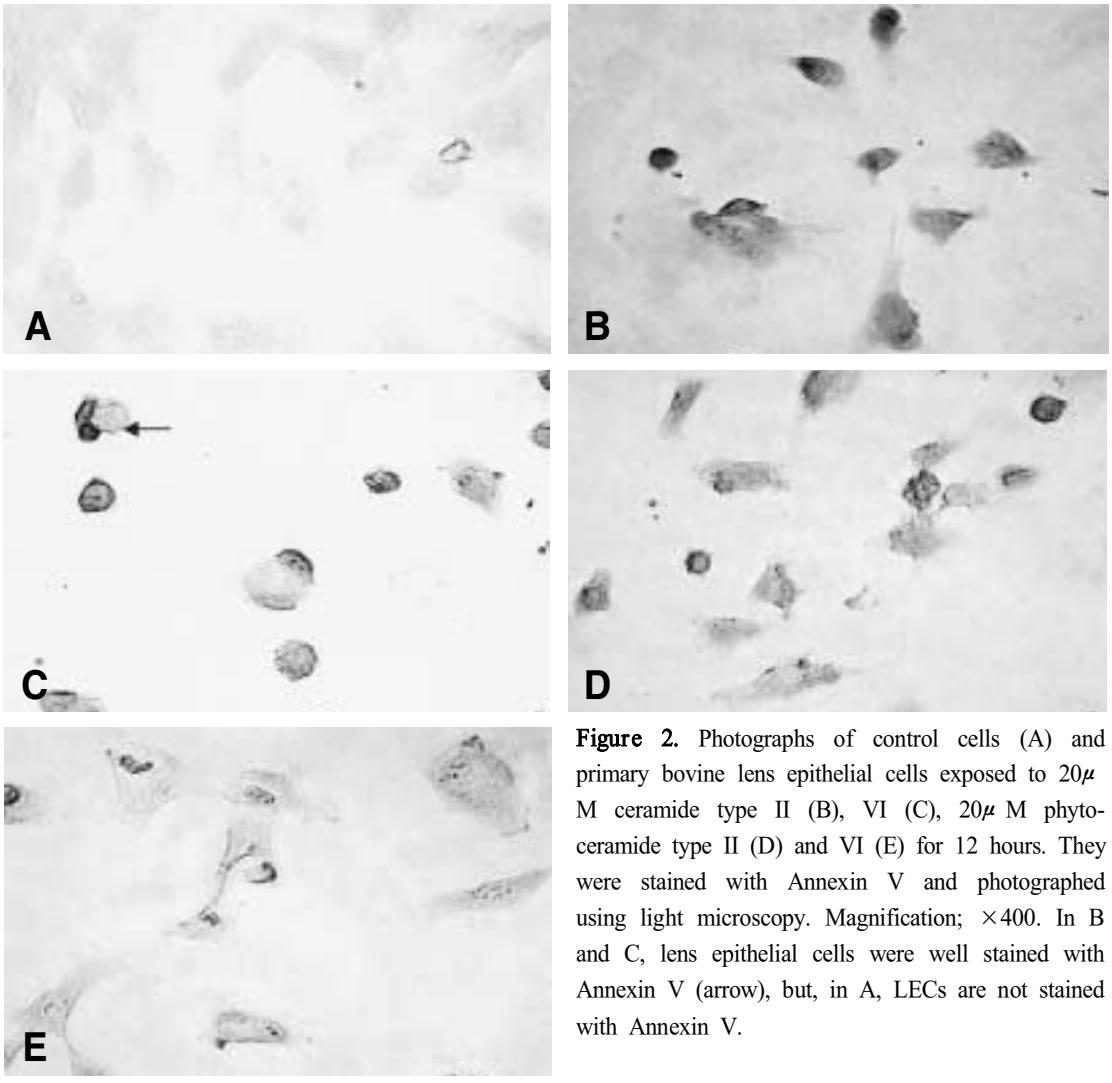


Figure 2. Photographs of control cells (A) and primary bovine lens epithelial cells exposed to 20μ M ceramide type II (B), VI (C), 20μ M phytoceramide type II (D) and VI (E) for 12 hours. They were stained with Annexin V and photographed using light microscopy. Magnification; ×400. In B and C, lens epithelial cells were well stained with Annexin V (arrow), but, in A, LECs are not stained with Annexin V.

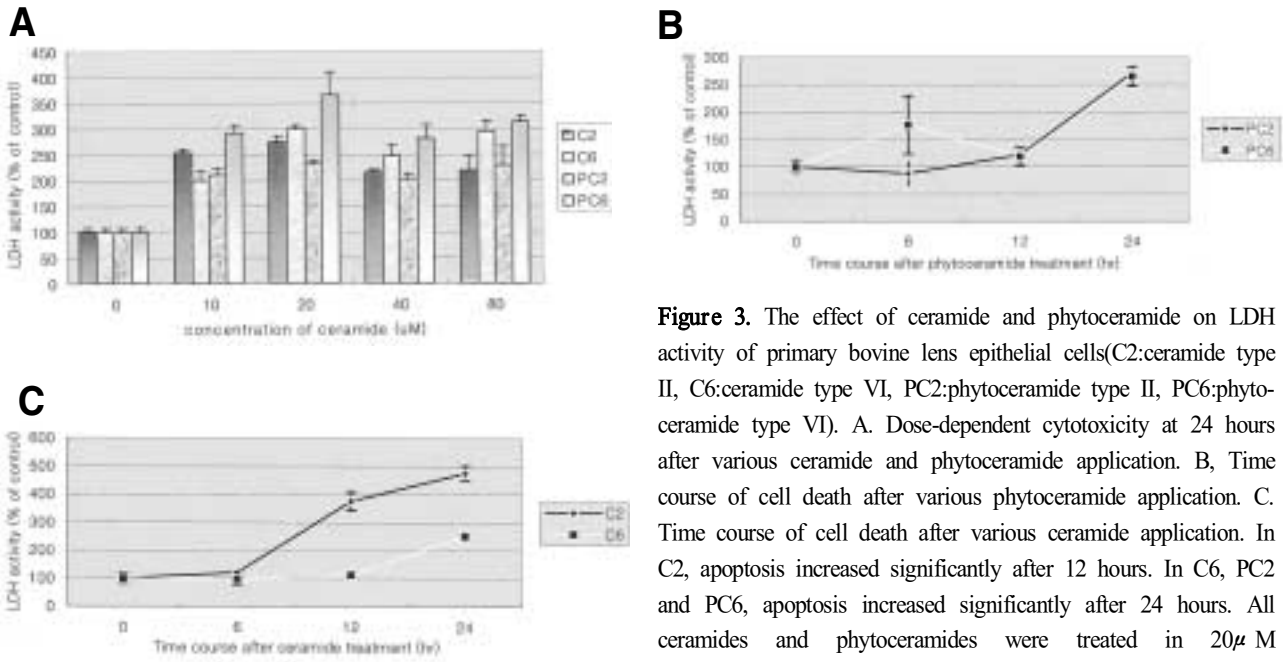


Figure 3. The effect of ceramide and phytoceramide on LDH activity of primary bovine lens epithelial cells(C2:ceramide type II, C6:ceramide type VI, PC2:phytoceramide type II, PC6:phytoceramide type VI). A. Dose-dependent cytotoxicity at 24 hours after various ceramide and phytoceramide application. B, Time course of cell death after various phytoceramide application. C. Time course of cell death after various ceramide application. In C2, apoptosis increased significantly after 12 hours. In C6, PC2 and PC6, apoptosis increased significantly after 24 hours. All ceramides and phytoceramides were treated in 20μ M concentration. LDH assay was used for cell toxicity test.

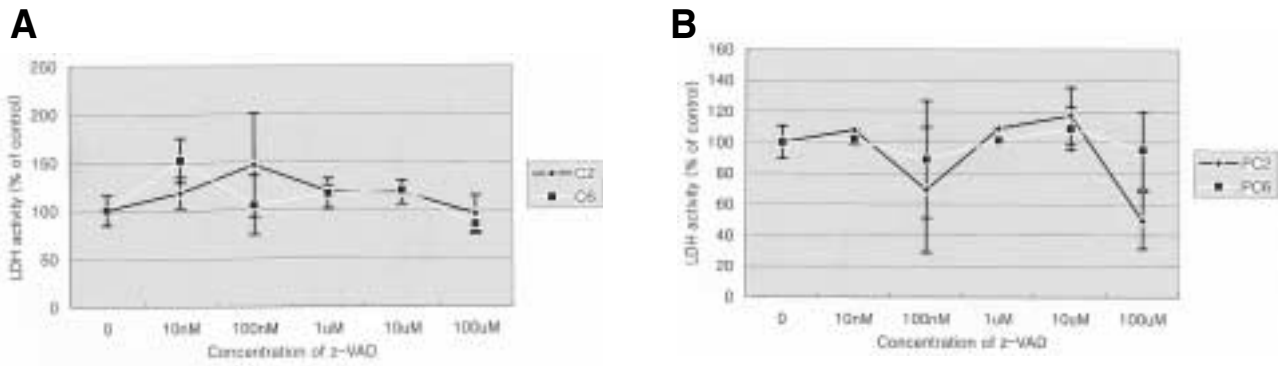


Figure 4. The effect of CPP32-like protease inhibitor on primary bovine lens epithelial cells. Bovine lens epithelial cells were preincubated for 3 hours in various concentrations of CPP32-like inhibitor, Z-VAD-FMK®. At 12 hours after each ceramide (A) and phytoceramide (B) application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. Each 20μ M ceramide and phytoceramide was treated. Z-VAD-FMK® doesn't reduce the apoptotic response in lens epithelial cells caused by various ceramides and phytoceramides.

세포자멸사 과정에서 미토콘드리아에서 분리되는 cytochrome c를 측정하기 위하여 20 μM의 ceramide와 phytoceramide를 각각 처리한 후 cytochrome c rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)처리후 6시간 뒤에 광학 현미경을 통하여 관찰하였다.

5. 통계분석

세포자멸사 평가를 위하여 ANOVA test를 이용하였다. P-value 가 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성을 가지는 것으로 정하였고 자료의 분석은 SPSS 10.0 for Windows® (SPSS Inc, USA)를 이용하였다.

결 과

1. Ceramide처리 후 세포자멸사 염색의 결과

1) Hoechst-EthD 염색

형광 현미경 소견 및 위상차 현미경 소견에서 모두 Ceramide type II로 처리된 세포들은 대조군에 비해 세포자멸사가 일어난 세포에서 관찰되는 cytoplasm

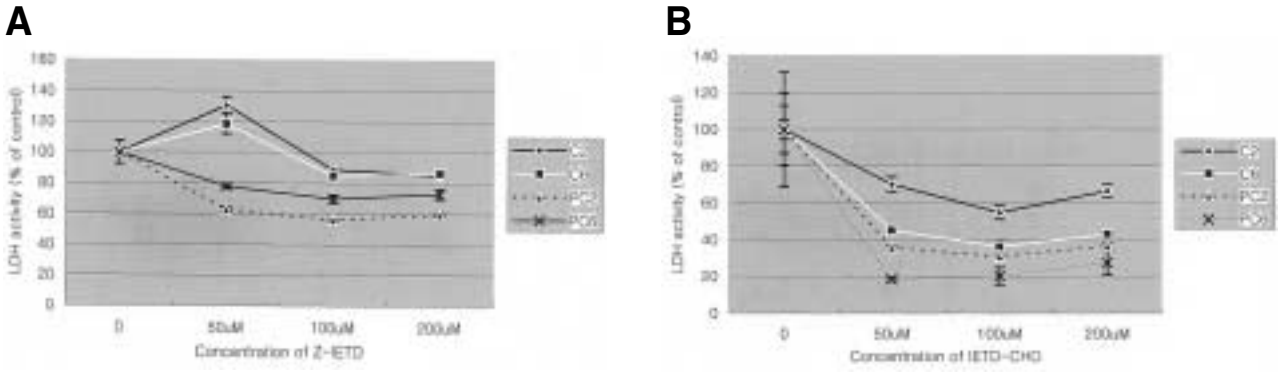


Figure 5. The effect of Caspase-8 inhibitor, IETD-CHO® on primary bovine lens epithelial cells. Bovine lens epithelial cells were preincubated for 1 hour in various concentrations of IETD-CHO®. At 12 hours after each ceramide and phytoceramide application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. IETD-CHO® reduced the apoptotic response in C6, PC2 and PC6 (A). Z-IETD® reduced only in PC2 (B). (C2:ceramide type II, C6:ceramide type VI, PC2:phytoceramide type II, PC6:phytoceramide type VI)

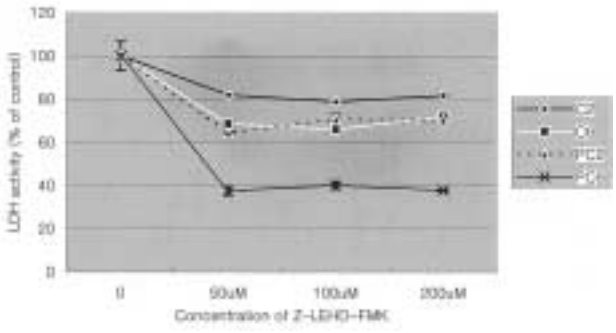


Figure 6. The effect of Caspase-9 inhibitor, Z-LEHD-FMK®, on primary bovine lens epithelial cells. Bovine lens epithelial cells were preincubated for 1 hour in various concentrations of Z-LEHD-FMK®. At 12 hours after each ceramide and phytoceramide application, cell toxicity was assayed using the LDH assay. Z-LEHD-FMK® reduces the apoptotic response in all ceramides and phytoceramides. (C2:ceramide type II, C6:ceramide type VI, PC2:phytoceramide type II, PC6:phytoceramide type VI)

의 위축과 핵조각화소견을 관찰할 수 있었으며 ceramide type VI, phytoceramide type II, VI처리군 에서도 비슷한 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

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

광학 현미경 소견상 ceramide type II를 처리한 세포에서 세포막의 위축소견과 세포막 주위에 소포를 가장 잘 관찰할 수 있었으며 ceramide type VI와 phytoceramide type II에서도 비슷한 정도의 염색을 나타내었다. Phytoceramide type VI에서는 약간의 세포막위축소견만이 관찰되었다(Fig. 2).

2. Ceramide와 phytoceramide의 농도와 처리시간에 따른 LDH를 이용한 세포 독성의 평가

Fig. 3A에서 보는 바와 같이 각각의 ceramide II, VI와 phytoceramide II, VI를 처리한 경우 농도와 관계 있는 세포 독성이 관찰되었으며 특히 10 μM이상의 농도에서 대조군에 비해 유의하게 높은 세포자멸사가 나타났다(P-value〈0.05). Fig. 3B는 20 M의 다양한 ceramide II, VI와 phytoceramide II, VI를 넣은 후 시간경과에 따른 세포사 정도를 나타내는데 ceramide type II에서 세포자멸사가 12시간 지난 후 유의하게 증가하였으며(P-value〈0.05), ceramide type VI와 phytoceramide type II, VI에서도 24시간까지 세포사의 증가를 관찰할 수 있었다(P-value〈0.05) (Fig. 3).

3. 세포자멸사의 경로분석

CPP32-like protease inhibitor를 처리한 모든 군에서 LDH 활성도는 감소되지 않았다(P-value〉0.05) (Fig.4). Caspase 8 inhibitor의 경우 ceramide type II를 제외한 ceramide VI와 phytoceramide II, VI에서 specific caspase-8 inhibitor가 LDH증가를 억제시켰고(P-value〈0.05), specific caspase-9 inhibitor는 오직 phytoceramide II에서만 LDH증가를 억제시켰다(Fig. 5). Caspase 9 inhibitor가 통계적으로 유의하게 모든

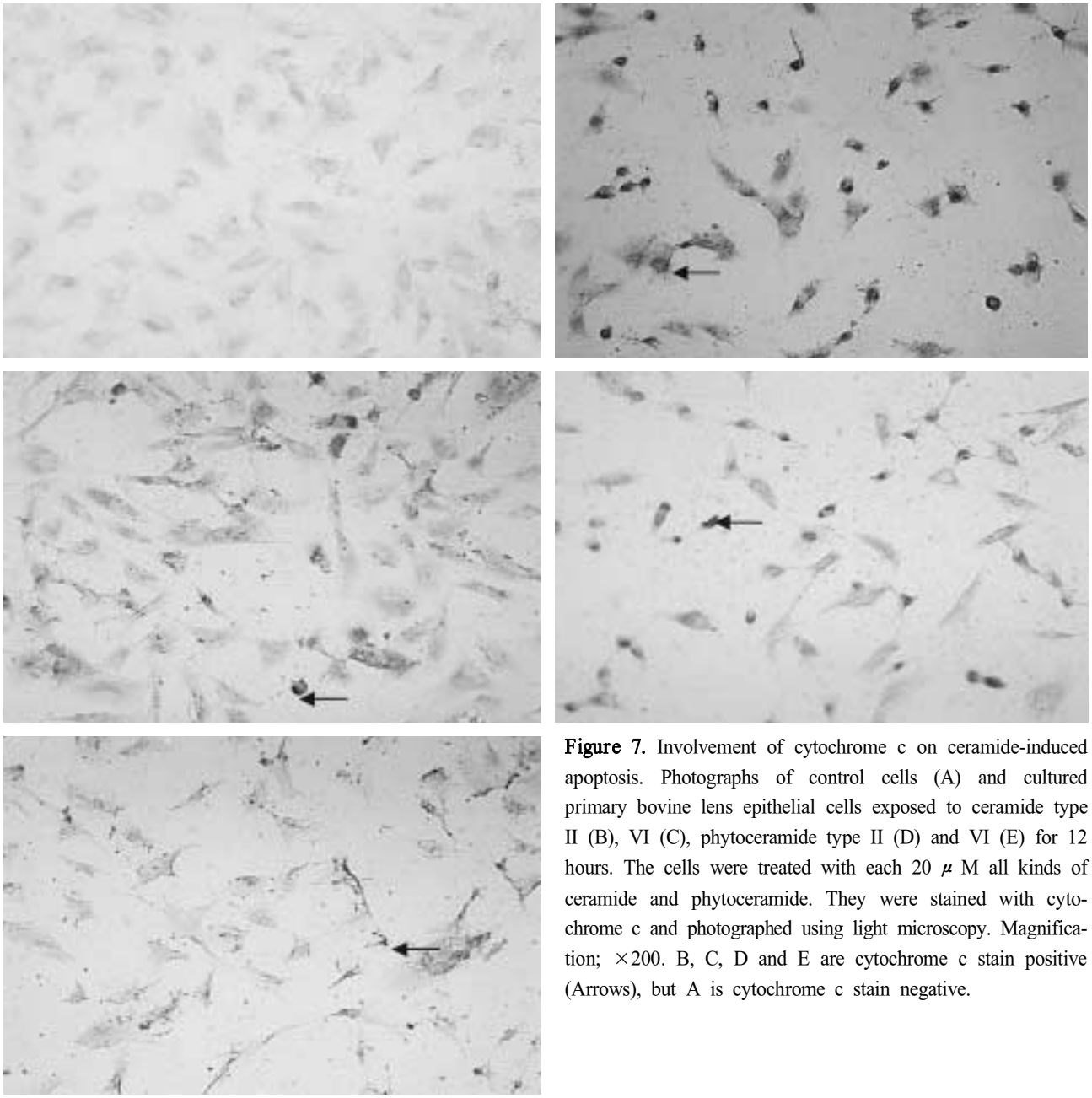


Figure 7. Involvement of cytochrome c on ceramide-induced apoptosis. Photographs of control cells (A) and cultured primary bovine lens epithelial cells exposed to ceramide type II (B), VI (C), phytoceramide type II (D) and VI (E) for 12 hours. The cells were treated with each 20 μ M all kinds of ceramide and phytoceramide. They were stained with cytochrome c and photographed using light microscopy. Magnification; ×200. B, C, D and E are cytochrome c stain positive (Arrows), but A is cytochrome c stain negative.

ceramide II, VI와 phytoceramide II, VI에서 LDH를 감소시켰다.(P-value<0.05) (Fig. 6).

4. Cytochrome c 염색

광학 현미경 소견상 모든 ceramide II, VI와 phytoceramideII, VI 처리군에서 세포질 내에 점상의 염색이 관찰되어 세포자멸사에서 수반되는 미토콘드리아로부터의 cytochrome c의 유리를 확인할 수 있었고 이것을 바탕으로 ceramide 에 의해 유발되는 세포자멸사가 미토콘드리아에서 유리되는 cytochrome c와 관련된 것임을 알 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

Ceramide type II, VI과 phytoceramide type II, VI는 수정체상피세포에서 세포자멸사를 유발하였다. 이는 Hoechst-EthD 염색과 Annexin V binding assay에 의해서 확인되었다. 시간, 농도에 따른 세포자멸사의 정도를 알아보기 위해 다양한 시간과 다양한 농도의 ceramide와 phytoceramide를 적용해 보았다. 농도에 따른 세포자멸사의 정도에서는 모

든 ceramide와 phytoceramide에서 20 μM이상의 농도에서 유의한 LDH 활성도의 증가를 관찰할 수 있었으며 ceramide type VI에서는 LDH가 전체농도에서 농도의존적 관계를 보였다. 시간에 따른 LDH 활성도는 ceramide type II에서 12시간이 지난 후에 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 ceramide type VI와 phytoceramide II, VI에서는 통계적으로 유의한 LDH 활성도의 증가를 유발하는데 24시간 이상이 소요되었다.

세포자멸사의 과정은 세포막내 Fas ligand의 활성화와 관련되는데, 세포의 자극에 의해 Fas 수용체가 활성화되면, caspase 8가 활성화되고, 이어서 2가지의 다른 경로를 통해 caspase 3가 활성화되어 세포자멸사가 일어난다. 이 과정중 직접 caspase 3를 활성화시켜 세포자멸사를 일으키는 경로와, 미토콘드리아를 거치는 경로가 있는데, 이중 후자는 활성화된 caspase 8이 미토콘드리아에서 cytochrome c를 세포질내로 유리시키고, 이 cytochrome c는 다시 caspase 9를 활성화시키며, 활성화된 caspase 9는 caspase 3를 활성화시켜 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다.[27] 이에 우리는 capspase 8, 9 inhibitor를 사용하여 세포 자멸사 과정의 일련 과정을 억제시켜서 그 경로를 파악하고자 하였다. CPP32-like protease는 ceramide에 의한 LDH 활성도의 증가를 억제시키지 않았으나 caspase 8 inhibitor, IETD-CHO®는 ceramide type II를 제외한 각각의 ceramide와 phytoceramide에서 LDH 활성도 억제가 나타났다. 그러나 200 μM의 IETD-CHO® 에서는 LDH 활성도가 유의하게 증가하는 소견을 보였다. 이는 CPP32-like protease가 세포 독성을 가지는 것처럼 고농도의 IETD-CHO®도 세포 독성을 가지기 때문인 것으로 생각 된다.[26] Caspase 8 inhibitor, Z-IETD®는 오직 phytoceramide type II에서만 세포자멸사를 감소시켰다. 따라서 IETD-CHO® 는 Z-IETD®와 역가(potency)나 기전에 있어서 차이가 있다고 생각된다. Caspase 9 inhibitor는 모든 ceramide처리군에서 LDH증가를 억제시켰다.

미토콘드리아는 세포자멸사 과정에 중요한 역할을 하는데 그 이유는 미토콘드리아가 cytochrome c와 같은 많은 세포용해물질을 분비하기 때문이다. 저자들은 ceramide와 phytoceramide가 세포자멸사를 유발하는데 있어서 미토콘드리아의 관계를 평가하기 위해 세포용해물질의 하나인 cytochrome c 염색을 실시하였고 그 결과 모든 ceramide와 phytoceramide군에서 cytochrome c 양성의 염색 결과를 얻어내었다. 따라서 ceramide는 미토콘드리아와 관련된 경로를 통해 수정체 상피세포의 세포자멸사를 유발한다고 결론 내릴 수 있었다.

Ceramide에 의한 수정체 상피세포에서의 세포자멸사 경로는 알려진 바가 없으며 본 연구의 결과를 바탕으로, 그 경로는 caspase 8, caspase 9, 미토콘드리아 경로와 관련이 있을 것으로 생각할 수 있겠다.

현재까지 후낭 혼탁을 예방하기 위하여 많은 노력이 안과의 여러 분야에서 있어왔다. 이는 수술적 기법에서 인공수정체 재질 및 형태에 있기까지 다양하였다. 최근 들어서 후낭 혼탁 방지를 위한 수정체상피세포의 세포자멸사와 관련된 물질 개발에 많은 연구가 있어왔으나 아직 임상적 평가가 이루어지지 못하고 있는 실정이다. Calcimycin이 최근 들어서 각광 받고 있으나 그 임상적 효용성은 아직 결정되지 못하고 있다.

이상의 결과로 볼 때 ceramide는 몸 속에 존재하는 물질이기 때문에 최소의 독성을 지니면서도 수정체 상피세포의 세포자멸사를 유발함으로써 후낭 혼탁을 막을 수 있을 가능성을 지닌 물질이다. 향후 백내장 형성 기전 중의 역할을 밝히고 안내독성에 대한 평가가 이루어진다면 후낭혼탁 방지를 위해 좀 더 많은 독성 실험과 동물 실험을 통하여 ceramide나 phytoceramide를 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1) Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. J Cell Biol 1995;130:169-81.
2) Spector A, Wang GM, Wang RR, et al. A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. II. Mechanism of action. Exp Eye Res 1995;60:483-93.
3) Li WC, Spector A. Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. Free Radic Biol Med 1996;20:301-11.
4) Murata M, Ohta N, Sakurai S, et al. The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). Chem Biol Interact 2001;30:617-25.
5) Li WC, Kuszak JR, Wang GM, et al. Calcimycin-induced lens epithelial cell apoptosis contributes to cataract formation. Exp Eye Res 1995;61:91-8.
6) Jordan JF, Kociok N, Grisanti S, et al. Specific features of apoptosis in human lens epithelial cells induced by mitomycin C in vitro. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001;239:613-8.
7) Geissler FT, Li DW, James ER. Inhibition of lens epithelial cell growth by induction of apoptosis: potential for prevention of posterior capsule opacification. J Ocul Pharmacol Ther

2001;17:587-96.
8) Duchesne B, Tahi H, Gautier S, et al. Implantation of controlled-release 5-FU for the prevention of secondary cataract: preliminary study. Bull Soc Belge Ophtalmol 1998; 268:69-72.
9) Ismail MM, Alio JL, Ruiz Moreno JM. Prevention of secondary cataract by antimitotic drugs: experimental study. Ophthalmic Res 1996;28:64-9.
10) Schmidt JF, Meyer JH, Fluegel B, et al. Effect of aclacinomycin A on in vitro cultures of porcine lens epithelial cells. Exp Eye Res 1998;66:43-7.
11) Wilson SE. Stimulus-specific and cell type-specific cascades :emerging principles relating to control of apoptosis in the eye. Exp Eye Res 1999;69:255-66.
12) Dressler KA, Mathias S, Kolesnick RN. Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. Science 1992;255:1715-8.
13) Mathias S, Younes A, Kan CC, et al. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. Science 1993;259:519-22.
14) Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. J Biol Chem 1991;266: 484-9.
15) Agresti C, D'Urso D, Levi G. Reversible inhibitory effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. Eur J Neurosci 1996;8:1106-16.
16) Tepper CG, Jayadev S, Liu B, et al. Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:8443-7.
17) 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.
18) Hartfield PJ, Mayne GC, Murray AW. Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. FEBS Lett 1997;401:148-52.
19) Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. Science 1996;274:1855-9.
20) Hwang O, Kim G, Jang YJ, et al. Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides. Mol Pharmacol 2001;59:1249-55.
21) 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.
22) 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.
23) 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.
24) Hwang O, Kim G, Jang YJ, et al. Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides. Mol Pharmacol 2001;59:1249-55.
25) YW Shen, RV Tao. The presence of ceramide hydrolase and synthetase in pig lens epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1982;22:734-43.
26) Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE. Caspase inhibitor z-VAD-FMK inhibits keratocyte apoptosis, but promotes keratocyte necrosis, after corneal epithelial scrape. Exp Eye Res 2000;71:225-32.
27) 박혜련, 김태임, 차흥원. 배양된 각막 기질세포에서 ceramide로 유발된 apoptosis. 한안지 2003;44:945-54.

=ABSTRACT=

The Apoptosis induced by Ceramide and Phytoceramide in the Lens Epithelial Cell

Ju-byung Chae, M.D., Tae-im Kim, M.D., Hungwon Tchah, M.D.

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

Purpose: The purpose of this study was to determine if ceramide, which is known as secondary messenger of programmed cell death (apoptosis), can cause apoptosis in lens epithelial cell (LEC) and if so, to identify the pathway by which apoptosis occurs.

Methods: After LECs were exposed to various concentrations of ceramide and phytoceramide, we evaluated the resulting apoptosis response using the Hoechst-EthD stain and Annexin stain. To search for the apoptosis pathway, LECs were preincubated in various concentrations of CPP32-like protease inhibitor, specific caspase-8 inhibitor, and specific caspase-9 inhibitor, then treated with ceramide and phytoceramide. We performed LDH assay 12 hours later. Cytochrome c immunostaining was done after exposure to the ceramide and phytoceramide.

Results: All kinds of ceramide induced time and concentration dependent apoptosis in LEC. Caspase 8 inhibitor and caspase 9 inhibitor reduced the apoptosis in ceramide VI, phytoceramide II, and phytoceramide VI. In all ceramides, cytochrome c staining was positive.

Conclusions: Ceramide and phytoceramide can cause apoptosis in LEC. Ceramide and phytoceramide may be used to prevent the posterior capsular opacity after cataract surgery.

J Korean Ophthalmol Soc 44(11):2627-2636, 2003

Key Words: Apoptosis, Caspase, Ceramide, Mitochondrial pathway, Phytoceramide

---

Address reprint requests to **Hungwon Tchah, M.D.**
Department of Ophthalmology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center
#388-1 Poongnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-040, Korea
Tel: 82-2-3010-3679, 3680, Fax: 82-2-470-6440, E-mail: hwtchah@amc.seoul.kr