

각막내피세포에서 Ceramide에 의해 유발된 Apoptosis

이선영 · 김태임 · 차흥원

울산대학교 의과대학 안과학교실

목적 : 여러 종류의 ceramide가 각막 내피세포의 apoptosis를 유발 여부와 그 경로를 알아보고자 하였다.

대상과 방법 : 가토의 각막내피세포를 배양 후 10, 20, 40, 80M의 ceramide type 2, 6, phytoceramide type 2, 6을 처리한 다음, apoptosis를 확인하기 위해 LDH 분석과 Hechst 염색 및 Annexin V 염색을 이용한 flow cytometry 분석을 시행하였다. 경로를 알아보기 위해 내피세포를 CPP32-like protease inhibitor, caspase-8 inhibitor, caspase-9 inhibitor로 처리한 뒤 20M의 ceramide와 phytoceramide에 노출시키고 LDH assay를 통해 세포사 정도를 평가하였다. 4종류의 ceramide에 노출시킨 뒤 cytochrome c 면역염색을 시행하였다.

결과 : Hoechst 염색상 세포질의 위축, apoptosis체 형성, 핵 조각화를 보였으며 Flow cytometry 분석검사상 초기 apoptosis 반응이 나타났다. Ceramide와 phytoceramide는 10M 이상, 12시간 이후에 유의한 apoptosis를 유발하였다. CPP32-like protease inhibitor, caspase-8, 9 inhibitor는 이러한 apoptosis의 과정을 억제하였고, Ceramide와 phytoceramide를 처리한 모든 내피세포에서 cytochrome c 염색에서 양성을 보였다.

결론 : 모든 ceramide와 phytoceramide는 각막내피세포에 있어서 apoptosis를 유발하였고 그 경로는 caspase 및 미토콘드리아경로와의 관련을 보였다.

<한안지 44(9):2128-2136, 2003>

Ceramide는 apoptosis를 일으키는 이차적 전령 물질로 알려져 있으며 tumor necrosis factor α , fas ligand, 방사선, 항암제, interferon β , interferon γ , 열손상, 화학적손상 등의 자극에 의해서 분비 된다.¹⁻⁹ 이러한 자극은 sphingomyelin 경로를 활성화 시키고 sphingomyelin-specific sphingomyelinase는 ceramide synthetase와 함께 sphingomyelin을 ceramide로 변화시킨다. Ceramide는 JNK/SAPK, c-jun/AP-1, CPP32-like protease 등의 활성화를 통해 apoptosis를 유발하며 이에 따른 Fas경로의 활성화 및 protein kinase c의 세포질 내로의 분비가 알려져 있다.¹⁻⁹

그러나 생체 내 ceramide는 정상적인 세포막을 통과할 수 없으므로 직접적인 치료목적으로 사용될 수 없기에 생체 내에서의 ceramide와 효과가 비슷한 ceramide 유사체가 개발되었다. 특히 생체 내의

ceramide의 long-chain fatty acid를 short-acyl group으로 대체하여 세포막 통과를 용이하게 한 ceramide가 배양 백혈병 세포에서의 생체 내 ceramide와 유사한 효과가 보고된 바 있다.¹⁰⁻¹² Phytoceramide(N-acyl-4D-ribo-phytoshpingosines)는 효모의 성장과 스트레스 반응을 조절하는 물질로 영양류에서의 ceramide에 해당되는 물질로 ceramide와의 차이점은 sphingolipid의 5번째 탄소기에 hydrogen 대신 hydroxyl기가 있다는 점이다. Ceramide와의 효능 차이는 이견이 많으나 phytoceramide의 대량 생산 가능성의 제시 및 효과는 이미 증명된 사실이다. 따라서 phytoceramide는 ceramide의 대용물로서 연구되고 있다.^{9,13-17}

각막의 뒷면은 단층의 내피세포로 이루어져 있다. 내피세포는 다각형 세포로 대부분은 육각형모양이며 젊은 사람에게 있어서는 그 수가 대략 3500 개/mm² 이다. 내피세포의 세포질 내에는 큰 핵과 많은 수의 미토콘드리아와 골지 복합체가 있어서 활동적인 대사에 관여한다. 이러한 장벽기능과 펌프기능으로 인해 각막의 수분함유량이 78%(3.8mg water/mg dry weight)으로 유지되며 각막 간질의 투명도가 유지된다.¹⁸

최근 굴절교정 수술 이후의 보다 나은 결과를 위해 각막세포의 창상 치유 과정이 활발히 연구 되고 있으

<접수일 : 2003년 6월 18일, 심사통과일 : 2003년 8월 11일>

통신저자 : 차 흥 원

서울시 송파구 풍납동 388-1

서울아산병원 안과

Tel: 02-3010-3680, Fax: 02-470-6440

E-mail: hwtchah@amc.seoul.kr

며, 저자들은 각막실질세포와 ceramide의 관계를 연구한 바 있다. 이 연구에서 ceramide는 각막세포의 apoptosis를 유발하였고 그 경로는 caspase 및 미토콘드리아경로와 관련을 보였다. 또한 백내장 수술 이후의 후낭 혼탁에의 ceramide의 예방 효과를 알아보고자 한 저자들의 수정체 상피세포와 ceramide의 관계 연구에서 ceramide가 수정체 상피세포에 있어서도 apoptosis를 유발하였다. 즉 ceramide는 각막 세포의 창상 치유 과정과 수정체 상피세포의 증식과정을 조절 할 수 있는 물질로 생각되며 임상적용을 위해서는 안정성의 평가가 이루어져야 하겠다. 이에 저자들은 본 연구를 통해 ceramide와의 처리에 따른 각막 내피세포의 안정성을 알아보고자 하였다.

대상과 방법

1. 각막 내피세포 배양

가토의 안구를 적출하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻은 다음 각막 윤부에서 3~4mm 떨어진 부위를 따라 절제하여 각공막편을 얻은 후 수술용 현미경하에서 내피세포 층과 데스메막을 각막의 간질세포로부터 떼낸 다음 Ca^{2+} -와 Mg^{2+} - free Hanks' balanced salt 용액 내에서 0.05% trypsin과 0.53mM EDTA을 첨가하여 5분간처리한 후 1400 rpm에서 원심분리하였다. 상청액은 버리고 남은 세포에 20 ml의 배양액을 넣은 다음 조직배양 flask에 넣고 CO₂ incubator (5% CO₂, 100% humidity, 37°C)내에서 세포가 충분히 많아질 때까지 배양하였다. 3차례의 계대배양을 거친 각막 내피세포를 사용하였고 Well당 세포수가 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 개가 담기도록 96개의 well plate에 나누어 담은 후 10%의 FBS DMEM내에서 24~48시간 동안 다시 배양하였다.

2. Ceramide, phytoceramide 처리 및 apoptosis 염색

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

내피세포들을 20 μM 의 ceramide type 2(C2)와 6(C6), phytoceramide type 2(PC2)와 6(PC6)로 12시간 동안 처리 한 다음 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342로 37°C에서 30분간 염색 하고 phosphate-buffered saline (PBS)에 세 차례 세척한 후 형광 현미경과 광학 현미경으로 관찰하였다.

2) Flow cytometry 분석(Annexin V FITC[®], Caltag laboratories, USA)

20 μM 의 각각의 ceramide를 12시간 동안 처리한 내피세포와 ceramide 처리를 하지 않은 내피세포를 PI 함유 buffer-용액과 함께 Annexin V-FITC[®] 염색 후 flow cytometry 분석을 시행 하였다.

3. Ceramide의 농도와 처리시간에 따른 세포사의 변화

10, 20, 40, 80 μM 의 C2, C6와 PC2, PC6를 24시간 동안 내피세포에 처리한 다음 LDH assay (CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay[®] Promega, USA)를 통해 세포사의 정도를 측정하였다. 또한 시간에 따른 세포사의 정도를 알아보기 위해 20 μM 의 ceramide와 phytoceramide를 각각 0, 6, 12, 24 시간동안 처리 한 다음 LDH assay를 하였다.

4. Apoptosis의 경로 분석

내피세포를 0, 10, 100, 1000, 10000 nM의 농도의 CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK[®], Calbiochem, Germany)를 세시간 동안 처리한 후 20 μM 의 ceramide와 phytoceramide를 각각 처리하였다. 같은 방법으로 0, 50, 100, 200 μM 의 specific caspase-8 inhibitor (IETD-CHO[®], Calbiochem, Germany and Z-IETD[®], Calbiochem, Germany)와 caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK[®], Calbiochem, Germany)를 한시간 동안 처리한 후 20 μM 의 ceramide와 phytoceramide를 각각 첨가하였다. 12시간 후에 LDH assay를 시행하여 세포사의 억제정도를 평가 하였다. 20 μM 의 ceramide와 phytoceramide를 처리한 다음 내피세포를 4% paraformaldehyde로 4°C 에서 25분간 고정시킨 다음 cytochrome c rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 형광 염색을 시행하고 12시간 후에 광학 현미경을 통하여 관찰 하였다.

5. 통계분석

내피세포의 apoptosis 평가를 위하여 ANOVA test를 이용하였다. P-value가 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성을 가지는 것으로 정의하였고 자료의 분석을 SPSS 10.0 for Windows[®] (SPSS Inc, USA)를 이용하였다.

Figure 1. Photographs of corneal endothelial cells exposed to ceramide type 2 (C2) for 12 h (C, D), ceramide type 6 (C6) for 12 h (E, F), phytoceramide type 2 (PC2) for 12 h (G, H), phytoceramide type 6 (PC6) for 12 h (I, J), and control cells (A, B). Cells were treated with a fixed concentration of all ceramide types (20 μ M). A, C, E, G, and I were stained with 1 μ g/ml Hoechst 33342 and photographed using fluorescence microscopy. B, D, F, H, and J were photographed using phase-contrast microscopy. Ceramide treated groups displayed more fluorescence and chromatin condensation than the control group. In phase-contrast microscopy, apoptotic features such as shrinkage of cytoplasm was more evident. Magnification; $\times 200$.

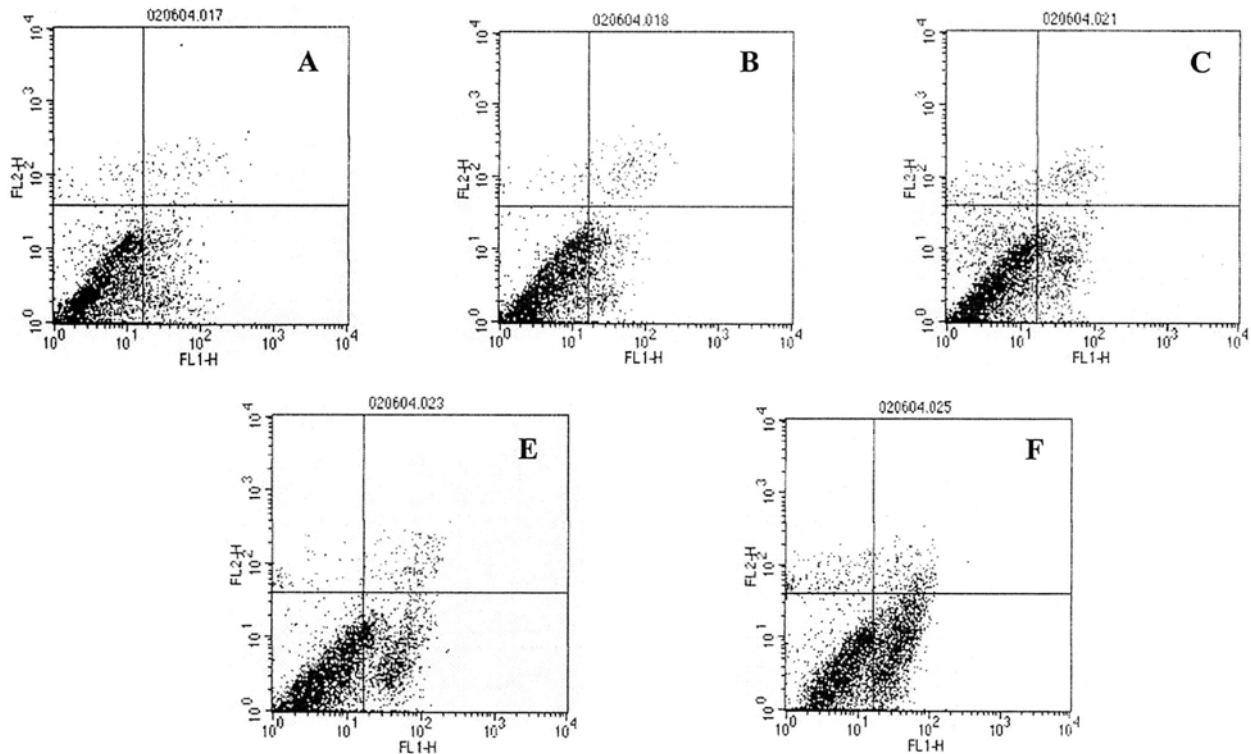


Figure 2. Flow cytometric analysis of apoptotic cells using Annexin V-FITC. Rabbit cornea endothelial cells were left untreated (A) or were treated with ceramide type 2, C2 (B), ceramide type 6, C6 (C), and phytoceramide type 2, PC2(D), phytoceramide type 6, PC6 (E) for 12 hours. Cells were incubated with Annexin V-FITC in a buffer containing PI and analyzed by flow cytometry. Untreated cells were primarily Annexin V-FITC and PI negative (lower left quadrant, panel A), indicating that the cells were viable and not undergoing apoptosis. After treatment with ceramides and phytoceramides, populations of cells have progressed to a later stage of apoptosis and are stained with both PI and Annexin V, indicating that the cells are no longer viable.

결 과

1. Ceramide 와 phytoceramide를 처리한 후 내피세포의 apoptosis

Hoechst 염색에서 ceramide 및 phytoceramide로 처리된 내피 세포들은 대조군에 비해 핵 조각화 및 세포질의 위축의 특징적 소견을 보였다(Fig. 1). Flow cytometry 분석에서 대조군은 Annexin V-FITC 및 PI에 음성을 보여 apoptosis 과정이 일어나지 않은 소견을 보인 반면, 12시간동안의 20 μ M ceramide 및 phytoceramide 처리 군에서 의미 있는 Annexin V 및 PI 양성 소견을 보여 apoptosis가 진행된 소견을 보였다 (Fig. 2B, C, D, E).

2. Ceramide와 phytoceramide의 농도와 처리시간에 따른 세포사

Ceramide 및 phytoceramide 모두 10 μ M 이상

의 농도에서 세포사가 의미 있게 증가하였다($p < 0.01$). 그러나 10, 20, 40, 80 μ M 농도간의 통계학적으로 유의한 있는 차이는 없었다.

처리시간에 따른 세포사 평가 에서 C2, C6, PC2군에서 24시간 까지 처리시간에 따른 세포사가 증가하였으며(Fig. 3) 특히 C2와 C6군에서 12시간째, PC2 및 PC 6군에서는 24시간째에 세포사가 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$).

3. Apoptosis 의 경로 분석

CPP32-like protease inhibitor를 처리한 모든 군에서 의미 있는 LDH 활성도의 감소를 보였다($p < 0.05$). 그러나 고농도의 CPP32-like protease inhibitor를 처리한 군에서는 LDH의 활성도가 증가하였다. 이는 CPP32-like protease inhibitor에 의한 세포 독성이 작용하였으리라 생각된다(Fig. 4). Caspase-8 inhibitor는 C6, PC2, PC6군에서 LDH 활성화를 의미 있게 감소 시켰고($p < 0.01\%$),

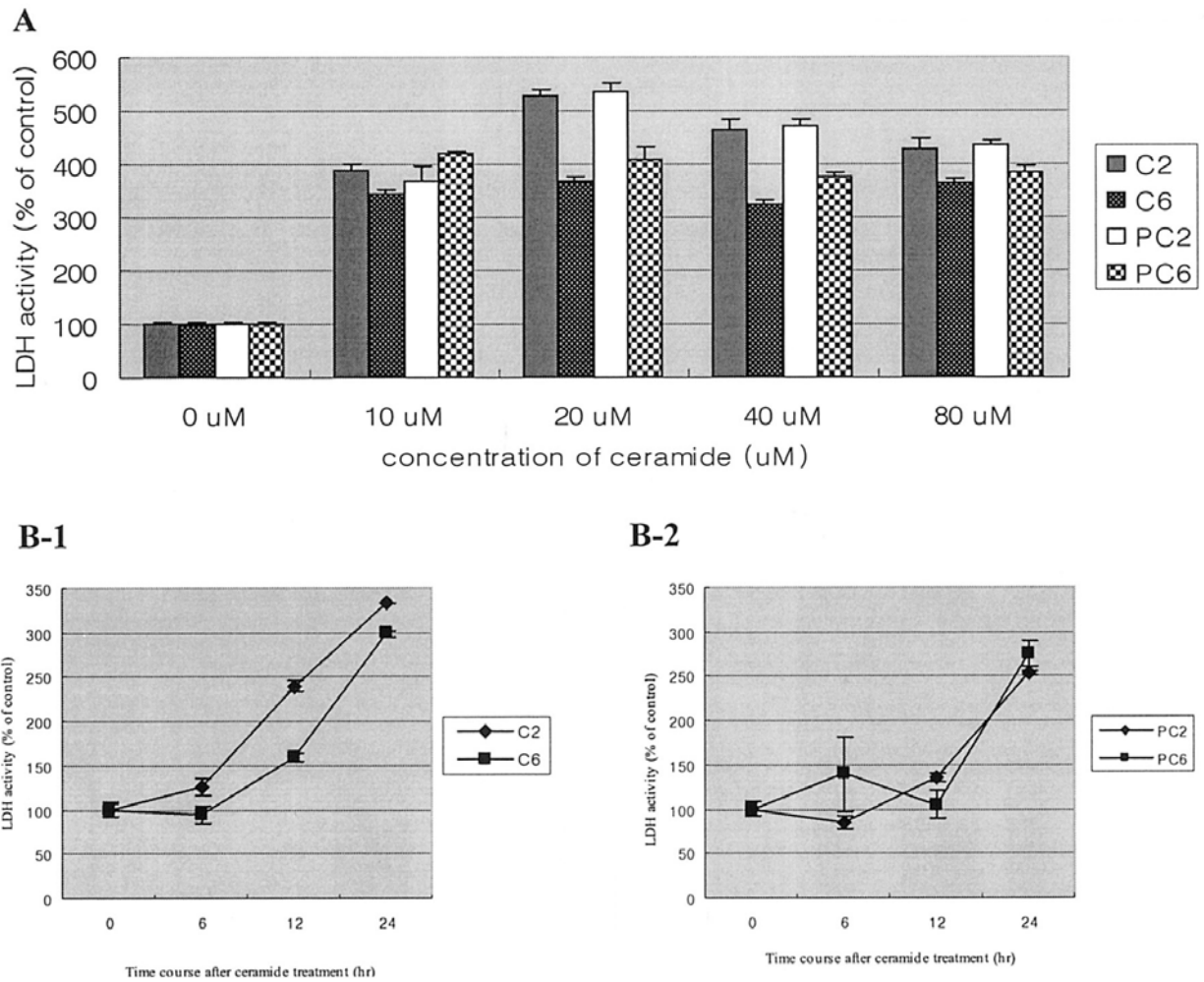


Figure 3. Cell death in primary rabbit corneal endothelial cells was induced by various ceramides (ceramide type2 (C2), ceramide type 6(C6),phytoceramide type 6(PC2),phytoceramide type 6 (PC6)). (A) Dose-dependent cytotoxicity at 24 h after application of each ceramide type. (B 1, 2) Time-course of cell death following treatment with various ceramides at a fixed concentration (20 μ M). Cell toxicity was analyzed using the LDH assay.

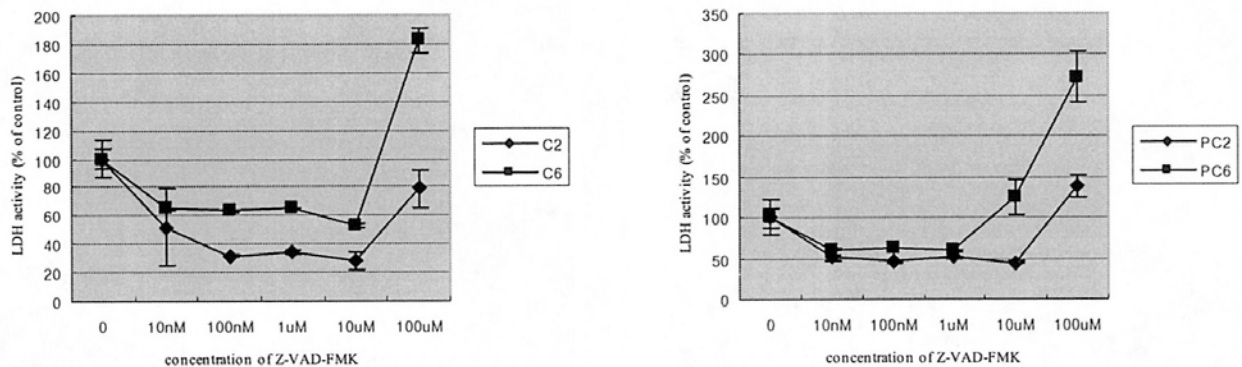


Figure 4. The effect of CPP32-like protease inhibitor on rabbit corneal endothelial cells. Endothelial cells were preincubated for 3 h with various concentrations of CPP32-like inhibitor, Z-VAD-FMK. At 12 h after treatment with each ceramide type (20 μ M), cell toxicity was assayed using the LDH assay. Z-VAD-FMK significantly reduced LDH activities in ceramide type 2 (C2), ceramide type 6 (C6), phytoceramide type 2 (PC2), and phytoceramide type 6 (PC6) ($p < 0.05$). But, at higher concentration of ceramides, LDH activities were increased

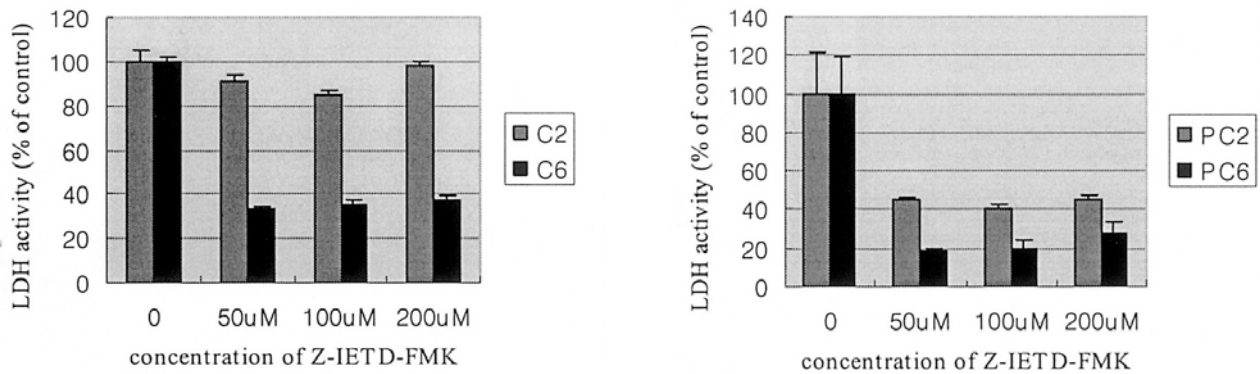


Figure 5. The effect of caspase-8 inhibitor, LIETD-CHO on rabbit corneal endothelial cells. Endothelial cells were preincubated for 1 h in various concentrations of LIETD-CHO. At 12 h after treatment with each ceramide type (20 μ M), cell toxicity was analyzed using the LDH assay. Caspase-8 inhibitor reduced LDH activities in ceramide type 6 (C6), phytoceramide type 2 (PC2) and phytoceramide type 6 (PC6)-treated cells ($p < 0.05$). but, couldn't reduced LDH activities in ceramide type 2 (C2)

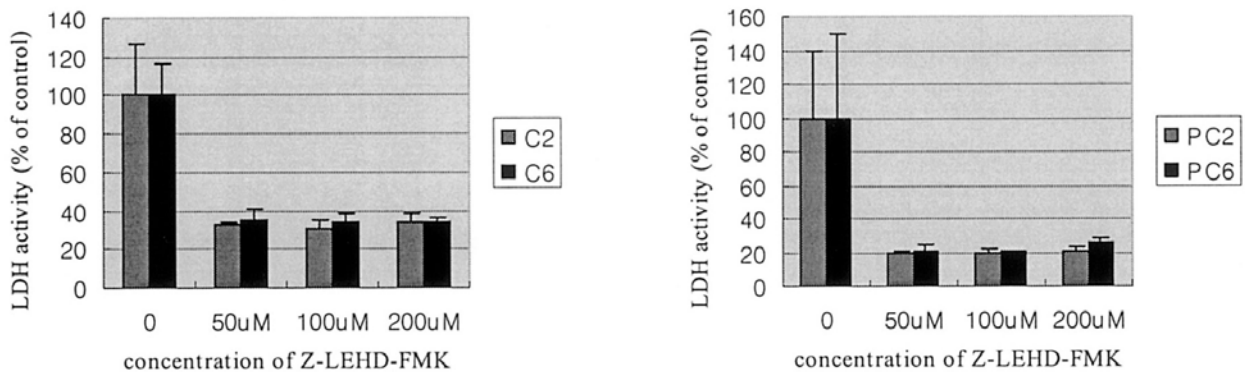


Figure 6. The effect of the caspase-9 inhibitor, Z-LEHD-FMK on rabbit endothelial cells. Endothelial cells were preincubated for 1 h with various concentrations of Z-LEHD-FMK. At 12 h following treatment with each ceramide (20 μ M), cell toxicity was assayed using the LDH assay. Z-LEHD-FMK reduced the apoptotic response induced by all the ceramides (ceramide type 2 (C2), ceramide type 6 (C6), phytoceramide type 2 (PC2), phytoceramide type 6 (PC6)) examined.

C2군에서는 LDH활성도가 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 감소는 아니었다. caspase-9 inhibitor는 C2, C6, PC2, PC6의 모든 군에서 LDH활성화를 감소시켰다($p < 0.01\%$)(Fig. 6). Cytochrome c 형광 염색상 모든 ceramide와 phytoceramide 처리 군에서 세포질 내에 점상의 갈색 색소를 보였으며 이는 ceramide와 phytoceramide에 의해 유도되는 apoptosis과정 중 미토콘드리아에서 cytochrome c의 유리가 동반됨을 나타낸 것이라 할 수 있다(Fig. 7).

고 찰

Ceramide type 2, 6과 phytoceramide type 2,

6는 모두 각막 내피세포의 apoptosis를 유발하였다. 이는 Hoechst-EthD 염색과 Annexin V FITC[®]를 이용한 flow cytometry분석을 통해서 확인되었다. Hoechst-EthD 염색 및 Flow cytometry 분석에서 apoptosis의 특징적인 소견인 세포질의 위축, 핵 조각화, 염색체의 응축이 ceramide와 phytoceramide를 24시간 처리 한 후에 관찰 되었다. Ceramide와 phytoceramide를 24시간 동안 처리한 경우에는 LDH 활성화의 의미 있는 증가를 보였는데 이는 세포 괴사와 apoptosis이외의 다른 종류의 세포 독성이 있을 수 있는 가능성을 고려할 수 있겠다.^{19,20} 즉, ceramide는 어떠한 조건에서는 세포괴사를 야기 할 수 있을 것이다. Hetz CA 등²⁰ 은 림프세포에서 ceramide에 의한 두 종류의 세포사를 보고한 바 있다. 이는 apoptosis 와

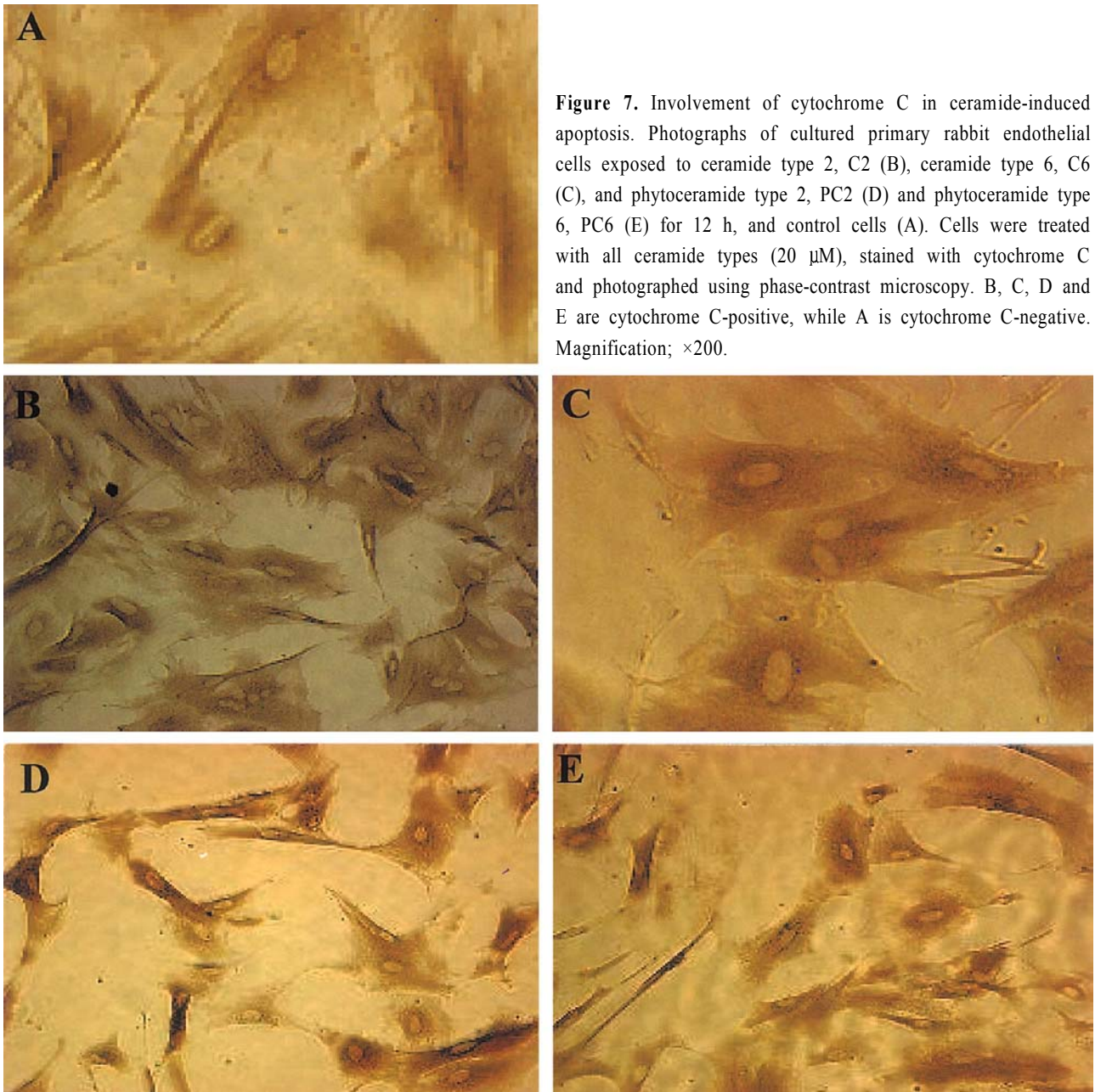


Figure 7. Involvement of cytochrome C in ceramide-induced apoptosis. Photographs of cultured primary rabbit endothelial cells exposed to ceramide type 2, C2 (B), ceramide type 6, C6 (C), and phytoceramide type 2, PC2 (D) and phytoceramide type 6, PC6 (E) for 12 h, and control cells (A). Cells were treated with all ceramide types (20 μ M), stained with cytochrome C and photographed using phase-contrast microscopy. B, C, D and E are cytochrome C-positive, while A is cytochrome C-negative. Magnification; $\times 200$.

세포괴사로 이중 세포괴사는 세포 내 ceramide의 지연 증가와 관련이 있음을 보고 하였다.

따라서, 치료적 목적에서 ceramide와 phytoceramide의 적절한 적용 시간이 중요하다. 또한 10 M이상의 농도에서는 LDH의 활성화 정도가 더 이상 증가하지 않았다. 이는 ceramide 와 phytoceramide의 농도 10 μ M이 내피세포의 apoptosis유발에 적절한 농도라 할 수 있겠다. 물론 이 결론은 사람의 내피세포에 직접 적용할 수는 없으며 이를 위해서는 안전하고 효과적인 농도 및 적용 시간의 규명이 필요할 것이라 생각된다.

광범위 caspase inhibitor 인 CPP32-like pro-

tease inhibitor는 ceramide와 phytoceramide에 의한 모든 apoptosis 반응을 의미 있게 억제하였다. Caspase 8 inhibitor는 C6, PC2, PC6 군에서 apoptosis 반응을 의미 있게 억제 하였고, caspase 9 inhibitor는 또한 모든 군에서 apoptosis 반응을 의미 있게 억제 하였다. 또한 저자들은 apoptosis를 유발하는데 있어서 미토콘드리아와의 관계를 평가 하기 위해 세포용해 물질의 하나인 cytochrome c염색을 실시하였고 그 결과 모든 ceramide와 phytoceramide군에서 cytochrome c 양성의 염색소견을 보였다. 본 연구의 결과를 바탕으로 ceramide에 의한 각막

내피세포의 apoptosis는 caspase 8, caspase 9, 미토콘드리아 경로를 통해 일어난다 하겠다.

Inoue K²¹ 는 지질대사 장애 시 축적 산물인 cholestanol에 의한 각막 내피세포 및 수정체 상피세포의 apoptosis를 보고 한 바 있으나, 이는 지질 대사 장애인 cerebrotendinous xanthomatosis에서 백내장 형성 및 각막 혼탁의 병리 생리기전을 규명하고자 한 연구였으며, 수정체 상피세포보다 각막 내피세포의 손상으로 인해 cholestanol은 후낭 혼탁을 예방하기 위한 치료제로 부적합하다고 하였다.

Ceramide는 정상적 세포 내 존재하는 물질로서, 외상이나, 스트레스에 의해 증가 되며, 증가된 ceramide는 각막내피세포의 apoptosis를 유발할 수 있을 것이다. 정상 상태, 수술 중, 외상후의 안내 ceramide의 농도를 측정하여, 만약 ceramide가 확인된다면, ceramide inhibitor나 apoptosis inhibitor가 각막의 내피세포의 손상을 방지하는 물질로 사용 될 수 있을 것이다.

이미 저자들은 ceramide와 phytoceramide가 각막세포와 수정체 상피세포의 apoptosis 유발을 관찰한 바 있다. 이러한 ceramide와 phytoceramide가 백내장 수술후의 후낭 혼탁 및 굴절교정수술후의 각막 혼탁의 예방을 위해 사용 되어지려면 각막 내피의 손상 없이 수정체 상피 세포의 apoptosis를 유발해야 할 것이다. 그러나 본 연구 결과에서 나타난 바와 같이 ceramide와 phytoceramide는 각막 세포, 수정체 상피 세포뿐만 아니라 각막 내피세포의 apoptosis 역시 유발 시켰다. 따라서 ceramide와 phytoceramide의 임상적용은 각 세포에 선택적으로 apoptosis를 유발 하는 농도 및 적용 시간의 연구가 인간의 세포를 대상으로 선행되어 안정성을 확보할 수 있을 때까지 미루어져야 할 것이다.

참고문헌

- 1) Dressler KA, Mathias S, Kolesnick RN. Tumor necrosis factor- α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 1992;27:1715-8.
- 2) 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 β . *Science* 1993;22:519-22.
- 3) Kim MY, Linardic C, Obeid L, et al. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor α and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1991;266:484-9.
- 4) Agresti C, D'Urso D, Levi G. Reversible inhibitory effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor- α on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 1996;8:1106-16.
- 5) Tepper CG, Jayadev S, Liu B, et al. Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8443-7.
- 6) Santana P, Llanes L, Hernandez I, et al. Interleukin-1 β stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* 1996;137:2480-9.
- 7) Hartfield PJ, Mayne GC, Murray AW. Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS Lett* 1997;401:148-52.
- 8) Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996;274:1855-9.
- 9) Hwang O, Kim G, Jang YJ, et al. Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides. *Mol Pharmacol* 2001;59:1249-55.
- 10) Geley S, Hartmann BL, Kofler R. Ceramides induce a form of apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cells that is inhibited by Bcl-2, but not by CrmA. *FEBS Lett* 1997;400:15-8.
- 11) Jarvis WD, Grant S, Kolesnick RN. Ceramide and the induction of apoptosis. *Clin Cancer Res* 1996;2:1-6.
- 12) Kolesnick R, Hannun YA. Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem. Sci* 1996;24:224-5.
- 13) 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.
- 14) 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;342Pt 3:667-75.
- 15) Skrzypek MS, Nagiec MM, Lester RL, et al. Analysis of phosphorylated sphingolipid long-chain bases reveals potential roles in heat stress and growth control in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* 1999;181:1134-40.
- 16) YW Shen, RV Tao. The presence of ceramide hydrolase and synthetase in pig lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:734-43.
- 17) 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.
- 18) W M Hart. *Adler's Physiology of the eye*, 9th edition. Morby Year Book, St. Louis, USA 1998;29-70.
- 19) Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, et al. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 1999;89:175-82.
- 20) Hetz CA, Hunn M, Rojas P, et al. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci* 2002;115:4671-83.
- 21) Inoue K, Kubota S, Tsuru T, et al. Cholestanol induces apoptosis of corneal endothelial cell and lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:991-7.

=ABSTRACT=

The Apoptosis Induced by Ceramide in the Endothelial Cell

Sun Young Lee, M.D., Tae Im Kim, M.D., Hungwon Tchag, M.D.

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

Purpose: To evaluate the effect of variable ceramides on the apoptosis of corneal endothelial cell and then, if ceramide induce the apoptosis in endothelial cells, via which pathway apoptosis occur.

Methods: Corneal endothelial cells were isolated from fresh rabbit cornea and cultured. Cultured corneal endothelial cells were exposed to 10, 20, 40 and 80 μ M of ceramide type II, VI and phytoceramide type II, VI. And then, apoptosis was evaluated with Hoechst staining and flow cytometric analysis with Annexin V for evaluation of apoptotic response. Corneal endothelial cells were preincubated in various concentrations of CPP32-like protease inhibitor (Z-VAD-FMK[®]), specific caspase-8 inhibitor(IETD-CHO[®]) and specific caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK[®]), then treated with 20 M of 4 types of ceramide. 12 hours later, LDH assay was done. Cytochrome c immunostaining was done after exposure to 4 types of ceramide.

Results: Shrinkage of cytoplasm, formation of apoptotic bodies, and nuclear fragmentation were observed on Hoechst staining. In flow cytometric analysis, early apoptotic responses were identified. Apoptotic response increased significantly at the concentration of 10M and more 12 hours later. CPP32-like protease inhibitor, caspase-8, 9 inhibitor reduced the LDH activity. Apoptotic endothelial cells induced by ceramide were stained with cytochrome c antibody.

Conclusions: Ceramide induced apoptosis in cultured corneal endothelial cells. This apoptosis developed via caspase and mitochondrial pathway.

J Korean Ophthalmol Soc 44(9):2128-2136, 2003

Key Words: Apoptosis, Caspase, Ceramide, Corneal endothelial cell, Mitochondrial pathway, Phytoceramide

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

Department of Ophthalmology, College of Medicine, University of Ulsan, 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