

Blue-light Induces the Selective Cell Death of Photoreceptors in Mouse Retina

Seo-young Kang^{1,3}, Ji Eun Hong², Eun jung Choi^{1,2}, and Jungmook Lyu^{1,3*}

¹Dept. of Medical Science, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

²Dept. of Optometry, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

³Myung-Gok Eye Research Institute, Konyang University, Seoul 07301, Korea

(Received October 24, 2015; Revised December 23, 2015; Accepted February 29, 2016)

Purpose: The study was conducted to determine that photoreceptors of mouse having pigment in RPE(retinal pigment epithelium) can be damaged by blue-light and apoptosis of specific cells among photoreceptors are induced by blue-light, and to assist the investigation of AMD(Age-related macular degeneration) mechanisms and development of AMD drugs. **Methods:** C57Black mice were injured by irradiating 2800 ± 10 lux of 463 nm LED for 6 hours after 24 hours dark adaptation and eyes were enucleated 1, 3, 7 days. Damage of retina induced by blue-light was determined by western blotting GFAP(Glial fibrillary acidic protein) expression. In the light-injured retina, cell death of photoreceptors was determined by TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay. ERK(Extracellular signal-regulated kinases), JNK, and SRC(sarcoma) expression were assessed by western blotting to determine regulated pathway. Blue light-injured retina were immunostained with antibodies against Opsin and Rhodopsin as markers of photoreceptors to compared the damage cone cells with rod cells. **Results:** After 1, 3 and 7 days from exposure to blue-light, thickness of retina was more decreased than control, and more decreased at nuclear layer than at outer plexiform layer and GFAP expression was increased day 1 after blue-light injured. While phosphorylated ERK and SRC protein expressions at day 1 were increased after blue-light injured, phosphorylated c-JUN was decreased. Fluorescence intensity analysis showed that markers of cone and rod cells were decreased after blue-light injured and Opsin was more decreased than Rhodopsin. **Conclusions:** The study suggests possibilities that the blue-light promotes retinal damage and causes apoptotic cell death via ERK and SRC pathway in mouse retina, and blue-light retinal damage is more induced cone cells apoptosis than rod cells directly.

Key words: Blue-light, Retinal photoreceptor cells, Apoptotic cell death, Opsin, Rhodopsin

서 론

망막에 도달할 수 있는 빛의 파장대는 400 nm에서 1400 nm 이고, 이 중 우리가 인식할 수 있는 빛의 파장영역(가시광선 Visible light)은 약 400 nm에서 700 nm 파장대의 빛이다.^[1] 망막에는 가시광선을 인식하기 위해 빛을 받아들이는 광수용세포가 존재하며 특성화된 발색단(chromophore)들이 분포되어있다. 광수용세포 중 원뿔세포의 발색단은 S-옵신(S-Opsin), M-옵신(M-Opsin), L-옵신(L-Opsin)이고, 막대세포의 발색단은 로돕신(Rhodopsin)이라 불린다.^[2] 망막은 빛을 받아들이기에 최적화되어 있지만, 망막에 대한 빛의 독성 연구도 활발히 이루어져왔다. 빛에 대한 독성은 열손상, 기계적손상, 광화학손상 등 3종류의 손상으로 분류할 수 있는데, 열손상은 강한 빛을 망

막에서 흡수하여 국부의 온도 상승으로 나타나며, 기계적 손상은 레이저 등의 짧은 파장의 빛을 단시간 동안 조사함으로 인해 망막이 기계적으로 파괴되는 것이고, 광화학 손상은 가시광선을 장시간 조사함에 따라 발생하는 것이다.^[2] 본 연구에서는 푸른빛을 띠는 가시광선인 청색광의 독성을 망막의 광화학손상과 연결 지어 밝히고자 하였다.

가시광선 중에서도 파장이 짧고 에너지가 큰 파장대의 빛은 망막에 치명적인 손상을 입힐 수 있는데, 이에 해당하는 빛 중 ‘청색광’이라고 불리는 푸른색의 380-480 nm 파장대 영역이 망막에 대한 광독성 연구에 많이 이용되었다.^[1-5] 청색광은 일반적으로 디스플레이에 포함된 LED(Light emitting diode)에서 많이 방출되는데 그 범위는 손바닥만한 스마트폰에서부터 차의 전조등과 대형 LED 전광판 스크린까지 다양한 기기를 통해 접할 수 있

*Corresponding author: Jungmook Lyu, TEL: +82-42-600-6335, E-mail: lyujm5@gmail.com

다.^[3,5] 심지어는 해외에서 교통신호로 쓰이고 있는 이 청색광이 최근 연구들에서 노인성 황반변성(AMD: Age-related macular degeneration)의 발생 과정을 촉진한다고 보고된 바 있다.^[2,5]

노인성 황반변성은 나이가 들면서 황반에 드루젠, 망막색소상피 위축, 맥락막 신생혈관 등 변화가 생겨 시력상실을 초래하는 질환이며 우리나라를 포함한 선진국에서 60세 이상 성인의 중심시력 상실을 초래하는 가장 흔한 원인 중 하나이다.^[1,3] 연구에 따르면 청색광으로 인해 증가된 산화스트레스가 망막색소상피세포를 악화시키고 사멸을 유도하여 밀접해있는 광수용세포의 사멸까지 유도한다고 보고하고 있다.^[1,3] 해부학적 측면으로 접근한 논문들에서는 청색광을 조사했을 때 특히 광수용세포가 포함된 외핵층의 전체적인 두께가 감소한다고 밝히고 있어,^[6] 안경원에서 청색광을 차단하는 안경렌즈까지 판매가 되고 있지만, 청색광이 망막에 손상을 주는 명확한 기전은 아직 불분명하다.

빛을 받아들이는 세포인 광수용세포는 막대세포와 원뿔세포로 이루어져 있는데, 원뿔세포는 각각 Red(Long wavelength), Green(Medium wavelength), Blue(Short wavelength) 파장대를 받아들이는 발색단을 가진 세포로 나누어진다.^[3,4,5] 각 원뿔세포의 구성 단백질 중 L-옵신은 564-580 nm, M-옵신은 534-545 nm, S-옵신은 420-440 nm 파장대의 빛에 반응한다.^[3,6,7,8] 이는 청색광이 망막색소상피세포의 손상과는 독립적으로 광수용세포에 직접적인 손상을 줄 수 있으며, 손상을 입는 정도는 각 광수용세포마다 다를 수 있다는 가능성을 보여준다. 본 연구에서는 이와 같은 가설을 망막색소상피층에 색소가 존재하는 마우스의 망막을 사용하여 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 청색광 조사

실험동물은 망막색소상피층에 색소가 존재하는 생쥐(C57black mice, 8주, 수컷, 20-23 g)를 사용하였으며, 모든 동물과 관련된 실험은 건양대학교의 IRB 승인에 따라 시행되었다. Rhodopsin 양을 일정하게 하고 다른 광원의 영향을 최소화하기 위해서 실험군과 대조군 모두(n=24)를 24시간 암순응 시킨 후 산동제인 아트로핀을 2방울씩 점안하였다. 청색광이 망막에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험군만 463 nm 파장대의 광원을 2800±10 lux 로 6시간 조사하였고, 청색광의 lux와 파장은 IM-1000(TOPCON, Japan)로 측정하였다. 청색광 조사 날을 기준으로 24시간 동안 암순응을 시킨 후, 시간에 따른 망막의 변화를 확인하기 위해 암순응 시킨 날을 포함하여 1일, 3일, 7일째 안

구를 적출하였다.

2. 면역염색

산동제만 점안한 대조군과 청색광 조사 후 1일, 3일, 7일이 지난 실험군의 안구를 적출한 후 eye cup상태로 분리하여 4% paraformaldehyde(Wako, Japan)에 24시간 고정하고, 15% sucrose 용액에서 4시간, 30% sucrose 용액에서 overnight하였다. 다음 OCT compound(Sakura, Japan)에 2시간정도 넣어두었다가 포매(embedding) 과정 후 -18°C에서 15 µm로 절편(section)을 만들었다.

절편들은 PBS로 washing하여 OCT compound를 제거하고 4% paraformaldehyde에 20분 고정한 후 0.1% Triton X-100(Sigma, USA)을 처리하여 permeabilization 시켰다. 그리고 PBS로 washing 후 1% BSA, 2.5% normal goat serum(Jackson Immunoresearch, USA), 2.5% normal donkey serum(Jackson Immunoresearch, USA)이 들어있는 PBS에 1시간 Blocking 후 Primary antibody인 mouse monoclonal anti-GFAP(1:300, Merck Millipore, Germany), rabbit polyclonal anti-opsin red/green(1:500, Merck Millipore, Germany), mouse monoclonal anti-Rhodopsin(1:500, Merck Millipore, Germany)를 Blocking buffer에 넣어 4°C에서 shaking하며 overnight 하였다. Secondary antibody (Invitrogen, USA)인 Cy2와 Cy3를 Blocking buffer에 넣어 상온에서 1시간 두고, Hoechst 33258(Sigma, USA)과 PBS를 1:1000으로 만든 용액을 15분 처리하였다. TUNEL assay는 blocking 과정 대신 TUNEL kit(ROCHE, Germany)를 1시간 30분 처리하고 Hoechst 33258 순서부터 위와 동일한 과정으로 진행하였다. 커버글라스로 덮은 뒤 형광현미경(Imager D2, Zeiss, Germany)을 사용하여 관찰하였고, Zen blue edition(Zeiss) 프로그램으로 일정범위의 intensity와 positive-cell 개수를 측정하였다.

3. 단백질 동정

안구를 적출하여 얻은 망막조직을 RIPA lysis buffer(ATTO, Japan)로 분해시켜 PAGE gel에 전기영동 하였고, transfer 과정으로 polyvinylidenedifluoride membrane에 이동시켰다. 이 membrane을 5% skim milk(Duchefa, USA)와 0.05% Tween-20(Georgiachem, USA)이 섞인 PBS 용액에 1시간동안 Blocking 하였다. 5% skim milk에 mouse monoclonal anti-GFAP(1:300, Merck Millipore, Germany), mouse monoclonal anti-phosphorylated ERK1/2(1:1000, Santacruz, USA), rabbit polyclonal anti-ERK1/2(1:1000, Cellsignaling Technology, USA), rabbit polyclonal anti-phosphorylated SRC(1:1000, Cellsignaling Technology, USA), rabbit polyclonal anti-SRC(1:1000, Cellsignaling Technology, USA), rabbit polyclonal

anti-phosphorylated c-JUN(1:1000, Cellsignaling Technology, USA), rabbit polyclonal anti-c-JUN(1:1000, Cellsignaling Technology, USA), Actin HRP(1:2000, Santacruz, USA) 등 항체를 각각 처리한 후 4°C에서 overnight 하였다. 그 다음 5% skim milk에 secondary antibody(Invitrogen, USA)를 1시간 처리하여 washing 후 chemi-doc(Bio-Rad, Germany)으로 분석하였다.

4. 통계

본 실험에서의 모든 측정치는 평균±표준편차로 표기하였다. 통계학적 분석은 Microsoft사의 EXCEL 2010버전을 사용하여 t-test합수를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 청색광 조사로 인한 망막의 손상 자극과 망막의 두께 감소

신경아교증(gliosis)은 중추신경에 외상 등으로 손상을 입었을 경우 복구나 손상기전에 관여하여 그 주위에 신경아교세포의 분열 증식이 일어나는 것을 가리킨다. 손상 주위에 증식하는 신경아교세포에는 성상교세포와 미세교세포가 있다. 보통 조직에 상처가 생기면 빈번히 나타나는 것으로, 성상교세포의 표지인자인 GFAP의 증감을 확인하여 조직에 손상자극이 주어졌는지 확인할 수 있다.^[9] 본

연구에서는 마우스를 24시간 동안 암순응 시키고 6시간 동안 2800±10 lux의 청색광을 조사하였다. 청색광으로 인해 망막에 손상자극이 가해지는지 확인하고 시간에 따른 변화를 알아보기 위해 청색광 조사 후 1일, 3일, 7일째 망막의 GFAP 단백질을 면역염색을 하였다. Fig. 1에서 청색광 조사 후 1일째 망막에서 신경절세포층과 속열기층에 GFAP가 확연히 증가하였고, 시간이 갈수록 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

GFAP 단백질 증감을 Western blotting을 이용하여 정량적 분석을 한 결과, 대조군을 기준으로 청색광을 조사 후 1일째 망막에서 GFAP 단백질 발현량이 1.44±0.07배 증가했고, 청색광을 조사 후 3일, 7일째 망막은 대조군과 같은 수준의 GFAP 발현량을 보였다. 이 결과는 망막에서 청색광의 자극은 조사 후 1일째 가장 높다는 것을 보여준다.

세포가 감염되거나 손상을 받은 경우, GFAP의 증가뿐만 아니라 세포 스스로에 의해 세포사멸(apoptosis)이 일어난다. 이 과정 동안 DNA가 잘라지며, 세포 내 소기관들과 세포질 성분이 조각나게 된다. 세포는 수축되고 갈라져 막으로 둘러싸인 조각으로 나누어지며, 이들은 특수한 식세포에 의해 흡수되고 소화되어 흔적을 남기지 않고 사라지게 된다.^[10] 이를 바탕으로 청색광에 의해서 세포가 손상을 입는지 확인하기 위해 망막의 각 층의 두께를 측정하였다. 24시간 암순응 후 2800±10 lux 를 조사하여 망막의 두께를 확인한 결과, 산동제만 점안한 대조군보다 청색

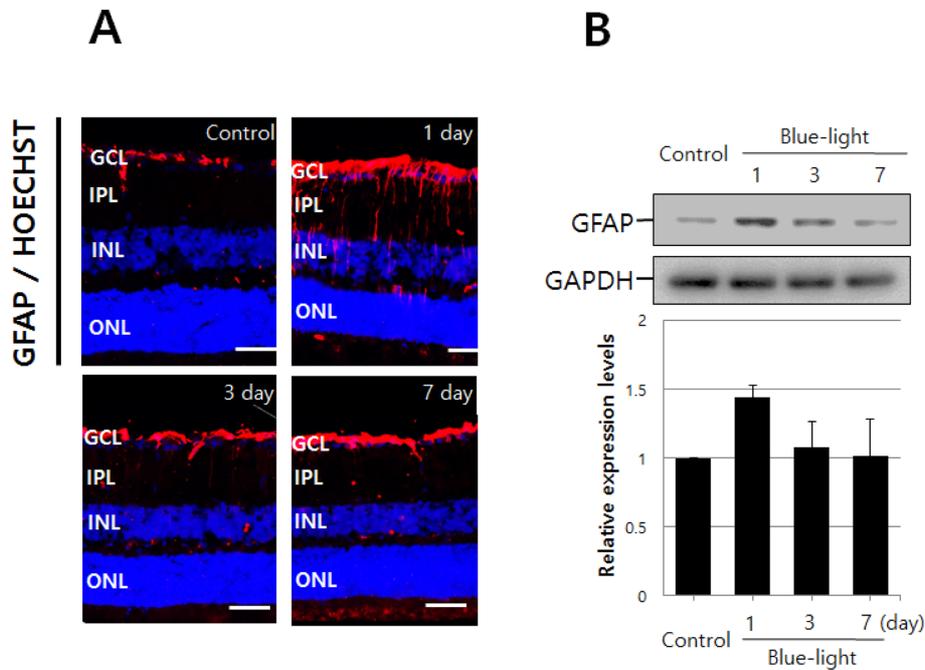


Fig. 1. Blue-light promotes retinal gliosis. (A) GFAP expression in mouse retina is shown. Sagittal sections from non-exposed or blue-light exposed retina were immunostained with GFAP antibody. Scale bars are 50 μm. (B) GFAP protein expression was changed in blue-light exposed retina. GFAP protein level was increased at day 1 after blue-light injury, and reduced at day 7. Quantitative analysis of GFAP protein levels is shown in the bottom. Error bars represent the mean ± SD of triplicate tests.

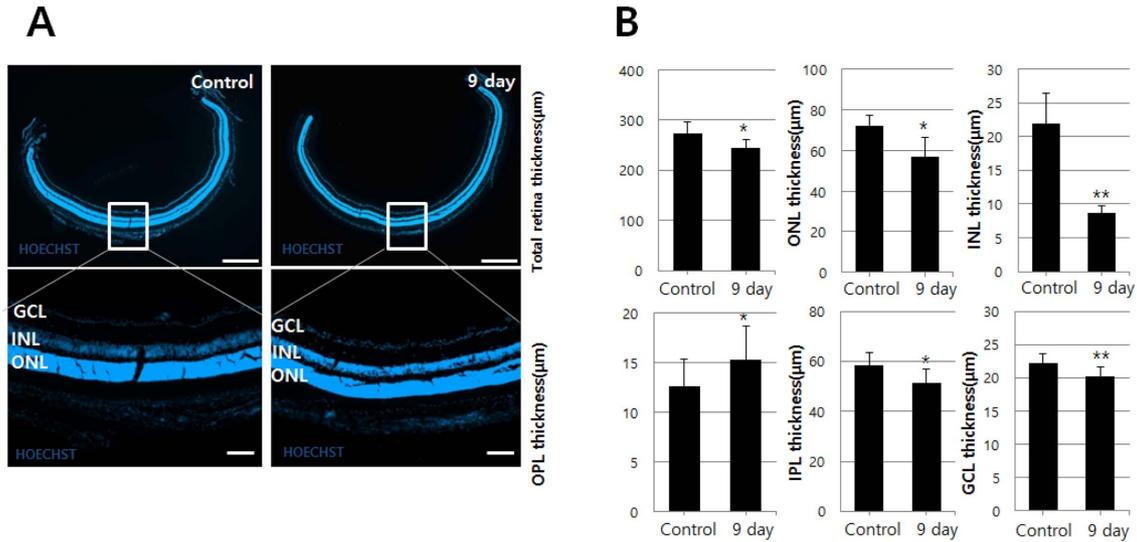


Fig. 2. Blue-light injury leads to the reduction of retinal thickness. (A) Representative immunostaining images of Hoechst 33258 in blue-light exposed retina and non-exposed retina as control. Scale bars are 500 μm (top) and 100 μm (bottom). (B) Quantitative analysis of retinal thickness in control and blue-light injured retina. Error bars represent the mean \pm SD of triplicate tests. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

광을 조사한 후 9일째 망막의 두께가 평균적으로 약 $28.00 \pm 20.60 \mu\text{m}$ 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2A).

Fig. 2의 B를 참고하여 전체적인 망막의 두께는 대조군보다 청색광을 조사한 망막의 두께가 평균적으로 $28.00 \pm 20.60 \mu\text{m}$ 감소하였고 외핵층은 대조군보다 청색광을 조사한 망막에서 평균적으로 $16.00 \pm 9.82 \mu\text{m}$ 감소하였으며 속핵층은 $13.00 \pm 4.16 \mu\text{m}$ 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 2B). 바깥겉기층과 속겉기층, 신경절세포층은 $5.00 \pm 2.21 \mu\text{m}$ 내외의 증감폭을 보였다($n = 5$, $p < 0.05$). 이 결과는 외핵층에 존재하는 광수용세포의 죽음이 활발히 일어났다는 것을 의미한다.

2. 세포 사멸기전과 관련된 western blotting과 TUNEL assay를 통한 망막 광수용세포의 사멸 확인

광수용세포의 죽음이 세포사멸(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)에 의한 결과인지를 확인하기 위해 세포사멸 기전에 관련한 단백질들인 phosphorylated ERK, JNK, SRC의 변화를 확인하였다(Fig. 3).

청색광 자극을 받은 망막과 그렇지 않은 대조군 망막으로부터 추출한 단백질에서 phosphorylated ERK의 발현을 비교하였을 때 그림에는 없지만 청색광 조사 후 1일째에 phosphorylated ERK가 약 1.89배 증가 하였다. phosphorylated SRC 또한 약 1.59배 증가하였다. 그러나 phosphorylated c-JUN은 반대로 청색광 조사 후 1일째는 미미하지만 약 1.01배 감소하였다. 따라서 청색광에 의한 망막손상은 ERK와 SRC가 포함된 세포사멸 기전과 관련이 있다는 가능성을 제시할 수 있다.

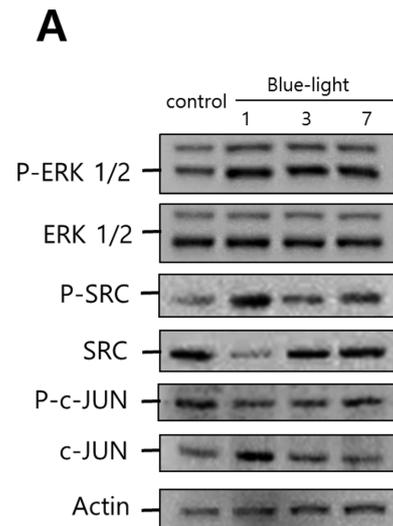


Fig. 3. Blue-light can activates the apoptotic signaling pathways. (A) Western blot analysis showed changes in levels of phosphorylated ERK, SRC, and JUN. At day 1 after blue-light injury, the phosphorylated ERK and SRC was increased, whereas phosphorylated c-JUN was decreased.

TUNEL 면역염색은 잘라진 DNA조각에 항체가 붙어 형광물질을 발광하게 되는 것으로, 세포사멸의 최종단계라고 할 수 있다.^[10,11] 청색광을 조사 후 1일, 3일, 7일째 망막에 TUNEL 면역염색을 한 결과(Fig. 4A), 대조군에서는 TUNEL로 염색된 세포가 보이지 않지만, 청색광을 조사 후 1일째 망막에서는 오직 외핵층의 광수용세포에서만 TUNEL 면역염색된 세포들이 나타났다.

청색광 조사 후 3일, 7일째 망막은 대조군과 비슷하게

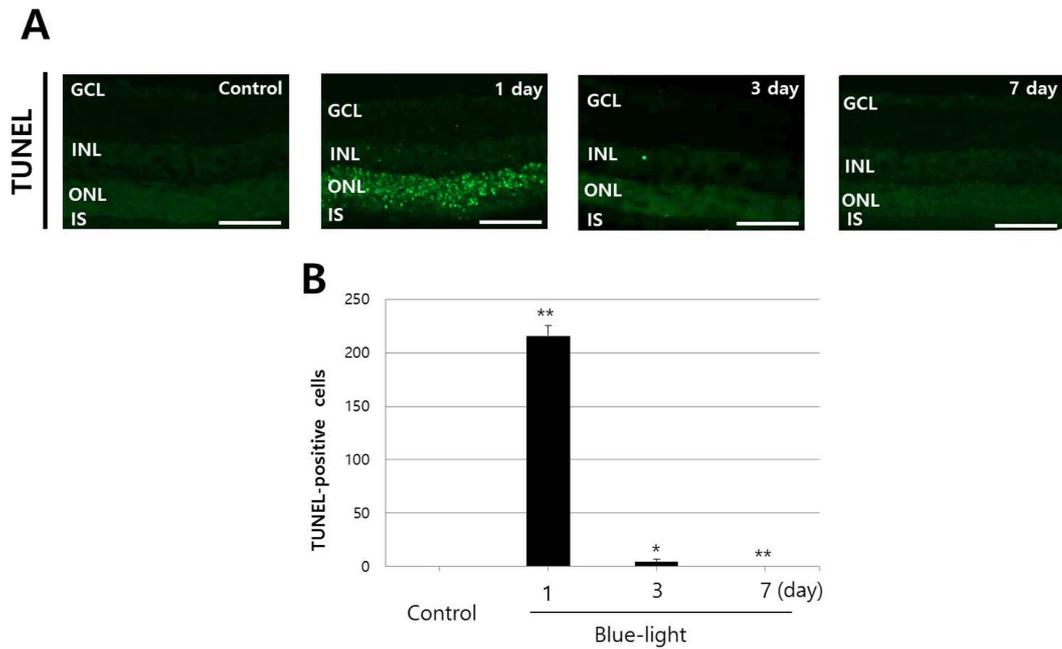


Fig. 4. Blue-light promotes the cell death of photoreceptors. (A) TUNEL-positive photoreceptor cells were detectable at day 1 after blue-light injury. Quantitative analysis of TUNEL-positive cells in 150000 μm^2 was shown in B. The number of TUNEL-positive cells was significantly increased one day after blue-light injury compared to control. Scale bars represent 100 μm . Error bars represent the mean \pm SD of triplicate tests. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

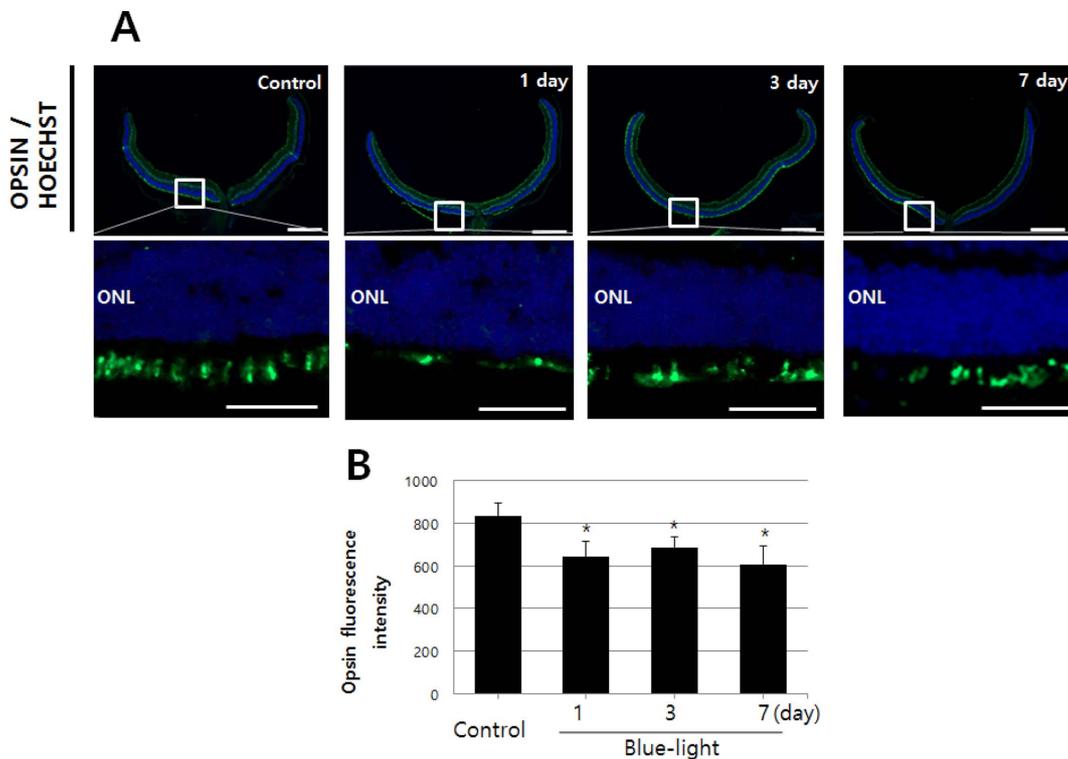


Fig. 5. Blue-light reduces the opsin expression. (A) Representative immunostaining of Opsin in sagittal sections from blue-light exposed retina and non-exposed retina, counterstained with and Hoechst 33258. Scale bars are 500 μm (top) and 100 μm (bottom). (B) Quantitative analysis of fluorescence intensity in 111000 μm^2 . The fluorescence signal for opsin was significantly decreased in blue-light exposed retinas compared with that of control. Error bars represent the mean \pm SD of triplicate tests. *, $P < 0.05$

TUNEL 면역염색 된 세포들이 감소하였다. TUNEL 면역염색 된 세포들의 수는 청색광 조사 후 1일째 망막만 대조군과 비교하여 215.00 ± 10.02 개 증가를 보였다($n=3$, $P<0.01$)(Fig. 4B). 이는 다른 세포가 아닌 광수용세포가 특징적으로 세포사멸이 일어난다는 것을 보여준다.

3. 광수용세포 원뿔세포와 막대세포의 손상 비교

TUNEL을 이용하여 청색광으로 유도된 순수한 광수용세포의 세포사멸을 관찰할 수 있었는데, 이 광수용세포는 크게 막대세포와 원뿔세포로 나뉜다. 막대세포는 원뿔세포보다 빛에 대해 굉장히 민감하지만 주로 명암을 구분하기 때문에 색상을 구분하기는 어렵고, 원뿔세포는 막대세포보다 민감도는 떨어지지만 황반부에서 흡수하는 파장대에 따라 빛의 색상을 구분하여 민감하게 인식할 수 있다.^[7,8] 따라서 청색광 조사 후 원뿔세포와 막대세포 간 세포사멸 차이가 있는지를 밝히고자 하였다. 이를 위해 암순응 24시간 후에 청색광을 2800 ± 10 lux로 조사하여 1일, 3일 7일째 망막에서 원뿔세포의 표지인자인 Opsin 단백질과 막대세포의 표지인자인 Rhodopsin 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역염색 한 후 광수용세포층에서 이들의 intensity를 비교 분석하였다. Opsin 단백질의 발현에서

청색광 조사 후 1일째에서 대조군과 비교하여 intensity가 $23.00 \pm 5.30\%$ 감소했으며 3일째에서는 미미하게 증가하는 것 같아 보였으나 7일째에서는 대조군과 비교하여 $28 \pm 7.40\%$ 까지 감소한 것을 확인할 수 있었다($n=3$, $P<0.05$)(Fig. 5A, B).

Rhodopsin 단백질의 intensity에서는 대조군과 비교하여 청색광을 조사한 마우스의 1일째 망막에서 $20.00 \pm 7.30\%$ 감소하였다($n=3$, $P<0.05$)(Fig. 6A, B). Opsin과 Rhodopsin의 감소량을 비교한 결과 청색광 조사 후 1일까지는 Opsin과 Rhodopsin의 intensity는 큰 차이가 없었지만 3일째에서 Opsin이 약 4.00%, 7일째에서 약 16.00% 만큼 Rhodopsin보다 더 감소하였다(Fig. 6C).

이 결과들은 청색광이 광수용세포 중 막대세포보다 원뿔세포에 더 큰 손상을 줄 수 있다는 가능성을 보여준다.

기존 연구에 따르면 청색광으로 유도된 산화스트레스가 망막색소상피층을 악화시켜 부르크막에서 드루젠과 지방갈색소의 축적이 이루어지는데, 이것이 광수용세포의 세포사멸을 야기한다고 보고하고 있다.^[1,3,6] 연령관련 황반변성의 초기 단계이기도 한 이 과정을 거치면 망막색소상피세포의 사멸 때문에 산화스트레스가 광수용세포까지 영향을 미치게 되므로 광수용세포의 세포사멸을 유도하게 한

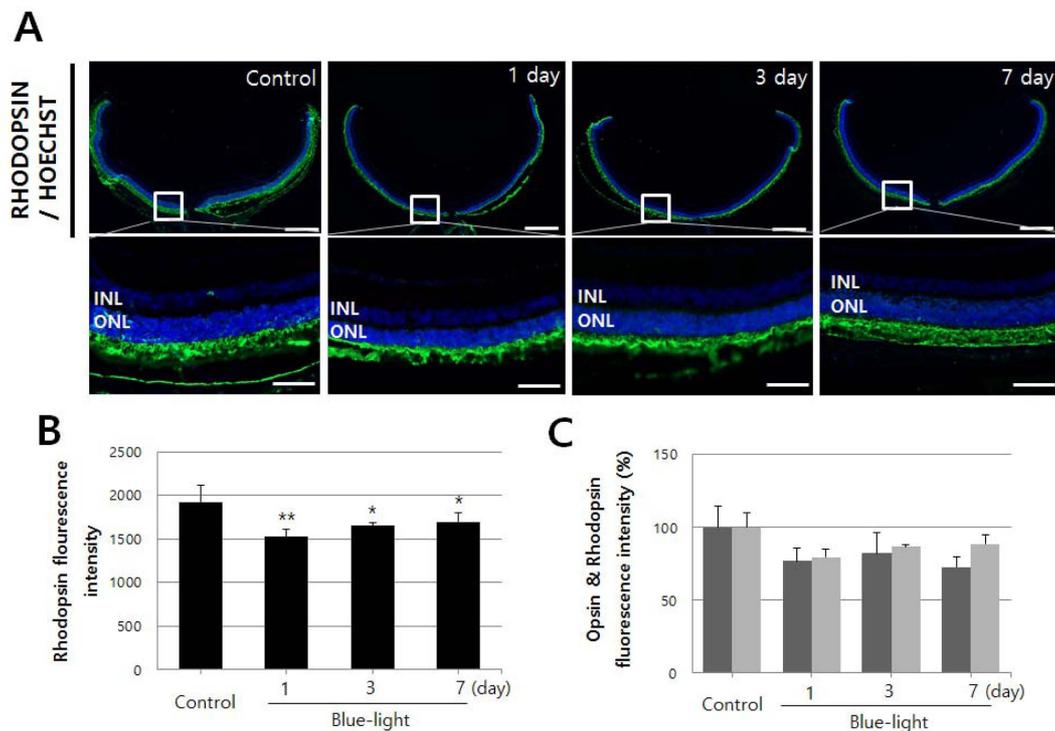


Fig. 6. Blue-light can lead to selective damage between Opsin- and Rhodopsin-positive cells. (A) Rhodopsin expression in the sections described in Fig. 5A was determined by immunostaining analysis with Rhodopsin antibody. Scale bars are $500 \mu\text{m}$ (top) and $100 \mu\text{m}$ (bottom). (B) Quantitative analysis shows the significant decrease in the Rhodopsin fluorescence intensity in blue-light injured retina compared to that of control in $2000000 \mu\text{m}^2$. (C) Quantification of the fluorescence intensity shows a significant difference in the expression levels between Opsin(black) and Rhodopsin(grey) after blue-light injury. Error bars represent the mean \pm SD of triplicate tests. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$.

다고 보고하고 있다.^[3] 그러나 본 연구에서는 망막색소상피세포의 형태 및 분자적 손상은 관찰되지 않았다. 특히, 청색광이 조사된 망막에서 TUNEL 반응 세포는 광수용세포가 존재하는 외핵층에서 유일하게 관찰되었다. 따라서 청색광에 의한 망막손상은 황반변성 유발 기전과는 다른 손상기전이 존재할 수 있음을 확인하였다. 그리고 세포사멸 기전과 관련한 단백질들로 ERK와 SRC 단백질 동정 결과를 보았는데, ERK는 산화스트레스에 의해 인산화가 증가하는 경향을 보이기도 한다.^[3] 이에 따라 기존 연구는 청색광이 산화스트레스를 유도하여 ERK와 SRC가 증가한다고 보고한 바 있다.^[2,3] 본 연구 결과에서도 인산화된 ERK가 증가한 것으로 보아 빠른 인산화 증가로 인해 면역염색 결과 민감도가 높은 막대세포에 우선 반응한 것으로 볼 수 있다. 그러나 기존 연구처럼 청색광이 산화스트레스를 유발하여 망막색소상피세포 악화의 결과로 광수용세포가 감소한다면 막대세포와 원뿔세포가 균등하게 감소해야 하는데, 전체적인 표를 봤을 때는 Opsin의 양이 Rhodopsin보다 더 감소한 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 청색광에 대한 손상 반응이 광수용세포들 사이 제한적인 특정 세포에서 더 잘 일어날 수 있음을 의미한다.

본 연구에서는 청색광의 유해성을 증명하고 그 기전을 밝히는데 기여하고자 심각한 망막 손상을 야기하도록 실험을 설계하고 진행하였으나, 실생활에 쓰이는 청색광이 사람의 망막에 손상을 줄 수 있다고 정확하게 밝히기 위해서는 일반적인 환경에서 청색광으로 인한 인간 망막 조직 손상을 확인하는 연구가 많이 이루어져야 할 것이다.

결 론

청색광은 가시광선 중 짧은 파장대 영역의 빛으로, 우리가 매일 사용하는 가전제품 스크린에 많이 사용된다. 최근 이 청색광이 망막에서 산화스트레스를 유도하여 질병을 야기한다는 연구 결과들이 보고된 바 있다. 하지만 정확한 기전은 밝혀지지 않았으므로 본 연구는 명확한 기전 규명과 관련 질환의 치료제 개발에 도움을 주고자 청색광을 이용하여 마우스로 망막 손상 실험을 수행하였다. 그 결과, 청색광 손상을 받은 망막의 광수용체세포가 손실되었고, TUNEL 면역염색에서는 망막색소상피세포보다 광수용세포에 특이적으로 세포사멸이 일어났다. 단백질 동정 분석은 인산화(phosphorylation) ERK의 증가를 보여주었다. 관련 연구들과 함께 청색광에 의한 광수용세포의 세포사멸은 ERK 신호전달 경로를 통해 일어날 수 있으며 망막색소상피세포의 손상에 영향을 받는 것이 아니라 광수용세포에 직접적으로 손상을 미칠 수 있다는 가능성을 확인하였다. 막대세포와 원뿔세포의 손상을 비교하기 위해서 각각의

발색단인 로돕신과 옵신 단백질을 면역염색 한 결과, 청색광으로 인해 막대세포보다 원뿔세포의 손상이 크다는 것을 확인할 수 있었고 청색광은 막대세포보다 원뿔세포에서 큰 광독성을 야기할 수 있음을 확인하였다.

망막에서 청색광의 유해성과 이들의 손상기전은 아직까지 명확하지 않다는 점에서 본 연구는 망막색소상피세포의 손상에 의해서가 아닌, 청색광이 선택적으로 광수용세포 손상을 유도하여 망막손상을 야기할 수 있다는 새로운 기전 존재의 가능성을 확인하였다. 이 연구결과를 토대로 청색광의 광독성, 인간 망막 조직에서 광화학 손상반응, 명확한 손상기전 등의 많은 연구들이 진행되어 관련 질환 치료에 보탬이 될 수 있기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NO. 2015R1D1A1A01059277).

REFERENCES

- [1] Nakanishiueda T, Majima HJ, Watanabe K, Indo HP, Suenaga S, Hisamitsu T. Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Res.* 2013;47(10):774-780.
- [2] Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye.* 2011;25(1):1-14.
- [3] Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep.* 2014; 4:5223.
- [4] Sung CH, Chuang JZ. The cell biology of vision. *J Cell Biol.* 2010;190(6):953-963.
- [5] Kim CJ, Choi SW, Yang SJ, Oh SY, Choi EJ. Evaluation of blue-light blocking ratio and luminous transmittance of blue-light blocking lens based on international standard. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2014;19(2):135-143.
- [6] Wu J, Seregard S, Spangberg B, Oskarsson M, Chen E. Blue light induced apoptosis in rat retina. *Eye.* 1999; 4(1):577-583.
- [7] Hunt RWG. *The Reproduction of Colour*, 6th Ed. Chichester: Wiley. 2004;11-14.
- [8] Wyszecki G, Stiles WS. *Colour* 2nd Ed. New York: Wiley. 1982;1-968.
- [9] de Melo J, Miki K, Rattner A, Smallwood P, Zibetti C, Hirokawa K. Injury-independent induction of reactive gliosis in retina by loss of function of the LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A. 2012;109(12):4657-4662.
 [10] Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. Campbell biology, 9th Ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2011;223-227.
 [11] Martinez-Fernandez de la Cmara C, Hernandez-Pinto AM,

Olivares-Gonzalez L, Cuevas-Martn C, Snchez-AragM, Hervs D. Adalimumab reduces photoreceptor cell death in a mouse model of retinal degeneration. Sci Rep. 2015; 14(5):11764.

청색광에 의한 마우스 망막손상에서 선택적 광수용세포의 사멸

강서영^{1,3}, 홍지은², 최은정^{1,2}, 류정목^{1,3*}

¹건양대학교 의과학과, 대전 35365

²건양대학교 안경광학과, 대전 35365

³건양대학교 명곡안연구소, 서울 07301

투고일(2015년 10월 24일), 수정일(2015년 12월 23일), 게재확정일(2016년 2월 29일)

목적: 본 연구는 망막색소상피층에 색소가 존재하는 mouse에서 청색광으로 인해 광수용세포 손상이 일어날 수 있는지 확인하고, 광수용세포 중 특이적 세포에서 세포사멸이 유도되는지 조사하여 청색광에 의해 야기될 수 있는 연령관련 황반변성의 기전 규명과 치료제 개발에 도움이 되고자 진행되었다. **방법:** C57black mice를 24시간 암순응 시켜 463 nm의 청색광을 2800 ± 10 lux로 조사한 후 1일, 3일, 7일째에 안구를 적출하였다. 청색광의 자극은 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)단백질의 발현을 이용하여 확인하였고, 광수용세포의 세포사멸은 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)을 사용하여 분석하였다. Western blotting으로 ERK(Extracellular signal-regulated kinases), c-JUN, SRC(Sarcoma) 단백질 발현을 확인하였고, 막대세포와 원뿔세포의 손상 정도를 비교하기 위해 면역염색으로 분석하였다. **결과:** 청색광을 조사한 후 1, 3, 7일이 지난 망막은 대조군 보다 전체적으로 두께가 감소하였고, 각 얼기층보다 핵층에서 두께 감소를 확인할 수 있었다. 또한 청색광을 조사한 후 1일 지난 Muller glia에서 GFAP 단백질이 증가하는 것을 확인하였다. TUNEL 염색에서는 청색광을 조사한 후 1일 지난 망막의 광수용세포에서 가장 많은 발현을 보였다. 세포사멸 기전 과정 중 하나임을 확인하기 위해 ERK, c-JUN, SRC 단백질 활성을 확인한 결과 청색광을 조사한 망막에서 phosphorylated ERK는 증가하였고 phosphorylated SRC는 조사 후 1일에서만 증가를 나타내었으며, 반대로 phosphorylated c-JUN은 조사 후 1일에서만 감소하였다. 청색광을 조사한 망막에서 막대세포 발색단인 로돕신과 원뿔세포의 발색단인 옵신이 감소하였으며, 옵신의 감소량은 로돕신의 감소량보다 큰 것을 확인하였다. **결론:** 본 연구는 청색광이 망막에 손상자극을 주고, ERK와 SRC 신호전달과 관련하여 광수용세포의 세포사멸을 일으킬 수 있으며 청색광이 광수용세포 중 원뿔세포의 세포사멸을 직접적으로 유도하여 망막 손상을 야기할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

주제어: 청색광, 망막광수용세포, 세포사멸, 옵신, 로돕신