[UCI]I804:24011-200000231747

2005년 2 월
박사학위논문

산화스트레스하의 망막색소상피세포에서 VEGF 증가와 PEDF의 감소에 의한 혈관신생

조선대학교 대학원

의 학 과

김 정 용

산화스트레스하의 망막색소상피세포에서 VEGF 증가와 PEDF의 감소에 의한 혈관신생

Human Retinal Pigment Epithelium Increasingly Produces VEDF and Decreasingly PEDF under Oxidative Stress, Leading to Neoangiogenesis

2005년 2 월

조선대학교 대학원

의 학 과

김 정 용

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY
100312325 2005-06-23

산화스트레스하의 망막색소상피세포에서 VEGF 증가와 PEDF의 감소에 의한 혈관신생

지도교수 최 광 주

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함

2004년 10 월

조선대학교 대학원

의 학 과

김 정 용

김정용의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 용

위원 성균관대학교 교수 강 세 웅

위원 가톨릭의과대학 교수 이 원 기

위원 조선대학교 교수 지 남 철

위원 조선대학교 교수 최 광 주

2004年 12月 日

조선대학교 대학원

빈 면

목 차

Abstract · 10

Ⅰ. 서 론 · 12

Ⅱ. 대상 및 방법 · · · · · · · · · · · · · · · · · 14

Ⅲ. 결 과 · 20

Ⅳ. 고 찰 · 22

참고문헌 · 25

표목차

Table 1. Primer sequences used for PCR · · · · · 29

Table 2. PCR conditions of VEGF, PEDF and β-actin
· 30

도목차

Fig 1. Human retinal pigment epithelial(HRPE) cell mortality · · · · · · · · · · · · · · · · · · 31

Fig 2. Flow cytometric analysis for intracellular ROS using 2' -7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) · 32

Fig 3. RT-PCR of VEGF mRNA and densitometric analysis of RT-PCR in RPE cells under oxidative stress · · · · · · · · · · · · · · · 33

Fig 4. RT-PCR of PEDF mRNA and densitometric analysis of RT-PCR in RPE cells under oxidative stress · · · · · · · · · · · · · · · · · · 34

Fig 5. Western blot of VEGF protein and densitometric analysis of its production in HRPE cells under oxidative stress · · · · · · · · · · · · · · · · 35

Fig 6. Western blot of PEDF protein and densitometric analysis of its production in HRPE cells under oxidative stress · · · · · · · · · · · · · · · · 36

Fig 7. Development of tube-like structures in ECV-304 cells · 37

Fig 8. Effect of the HRPE-conditioned medium on human dermal microvascular endothelial cell in migration assay · · · · · · · · · · · · · · · 38

ABSTRACT

Human Retinal Pigment Epithelium Increasingly Produces VEDF and Decreasingly PEDF under Oxidative Stress, Leading to Neoangiogenesis

Jeong-Yong Kim

Advisor : Prof. Gwang-Ju Choi, M.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

This study is to aim to elucidate the mechanism of neoangiogenesis in human retinal pigment epithelium under oxidative stress. Paraquat was added to cultured human retinal pigment epithelium (HRPE) for 72 hr to induce oxidative stress milieu. Expression and production of angiogenic factors including vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment endothelial derived factor (PEDF) was checked by RT-PCR and Western blot, respectively. Whether or not induction of the neoangiogenesis was monitored by both tube formation in ECV 304 cell and migration assay of human fetal dermal microvascular endothelial cells. The

competitive RT-PCR showed that PEDF gene in paraquat-treated RPE was significantly lower expressed than in non-treated HRPE. But Western blot showed the significant increase of VEGF production ($p<0.05$) and the decrease of PEDF production ($p<0.05$). Moreover, angiogenesis was dose-dependently increased when the various concentrations of paraquat were added to HRPE. Taken together, oxidative stress by addition of paraquat causes HRPE to produce VEGF more and PEDF less, leading to neoangiogenesis, suggesting that the neovasculization in age-related macular degeneration (AMD) be caused by breaking the balance of angiogenic factors in HRPE such as VEGF and PEDF-that is, in oxidative stressed HRPE, VEGF releases higher and PEDF lower, as compared to the normal HRPE.

I 서 론

노인에서 호발하는 황반변성은 망막의 황반부에 발생한 변성으로 서구유럽에서 노인실명의 중요한 원인 중의 하나이다.[1,2] 노인에서 호발하는 황반변성 중에서 삼출성 황반변성은 망막 또는 망막색소상피 아래에 발생하는 맥락막 신생혈관에서 누출된 삼출물이나 혈액에 의해서 그리고 이러한 병소에서 이차적으로 유발되는 허혈 및 섬유혈관조직에 의한 망막손상으로 시력이 상실된다.[3] 혈관신생은 맥락막 혈관으로부터 시작되어 손상된 브루크막을 지나 망막색소상피와 망막 하로 생성, 침범한다.[4,5]

일반적으로 노화에 따른 황반부를 비롯한 변화는 산화적 손상이 축적된 결과이며[6,7] 황반변성의 병인도 색소상피나 맥락막 모세혈관에 가해진 산화스트레스와 관련이 있다고 알려져 있다.[7-9] 그러나, 산화스트레스에 의한 망막조직의 신생혈관의 생성에 대한 기전에 대해서는 명확히 보고된 바가 아직 없다.

혈관신생은 기존에 있는 모세혈관으로부터 여러 단계를 거쳐 형성된다. 시작 단계는 미세혈관세포가 국소적으로 하방의 기저막과 주위의 세포외 물질을 분해하고, 다음 단계로는 혈관 내피세포가 증식하여 조직으로 이동, 혈관이 생성 된다. 이 과정에 관여하는 성장촉진 인자로는 혈관형성 성장인자(angiogenic growth factors)와 MMPs(matrix metalloproteinase), vascular endothelial growth factor(VEGF)와 basic fibroblast growth factor(bFGF) 등이 있으며, 이들 성장인자는 혈관내피세포의 증식과 이동을 촉진한다고 알려져 있으며 이 중 MMPs는 새로이 자라나는 모세혈관주위의 기저막과 세포외물질을 분해한다.[10,11] 그

러나, 정상적인 안구조직에서의 혈관형성에 대한 조절은 VEGF와 같은 혈관형성 성장인자와 PEDF(Pigment epithelium-derived factor)등의 혈관형성 억제인자 사이의 균형에 의하여 유지된다.[12-14] 본 저자는 연령의 증가에 따라 호발되는 산화스트레스에 의한 황반변성에 있어 맥락막 신생혈관의 발생의 기전을 규명하고자 다음과 같은 실험을 시행하였다. 즉 체외 배양한 망막색소상피세포에 paraquat을 가하여 산화스트레스를 유도하고, 이들 세포에서 지금까지 알려진 혈관형성 성장인자인 VEGF와 혈관형성 억제인자인 PEDF의 발현의 변화를 확인하고자 하였다. 더불어 이들 혈관형성 성장 혹은 억제인자의 변화가 곧바로 맥락막 신생혈관형성에 어떠한 변화를 초래하는 지를 tube test와 migration assay를 통하여 확인, 산화스트레스에 의한 황반부 맥관형성에 관여하는 기전을 밝히고자 하였다.

Ⅱ 대상 및 방법

1. 세포주 배양

Cell line은 인체 망막색소상피세포(이하 색소상피)주(ARPE-19; ATCC No. CRL-2302)를 37°C, 95%air-5% CO_2가 공급되는 습윤화된 배양기에서 배양하였다. 배양액은 56℃에서 30분간 열처리한 FBS (Gibco BRL,Grand Island, NY U.S.A.) 10%와 penicillin (100 U/㎖), streptomycin (100㎍/㎖)과 amphotericin B (1 ㎍/㎖)를 포함한 항생제 (antibiotic-antimycotic, Gibco BRL, NY, U.S.A.)를 함유한 DMEM:F-12 (1:1) 배지 (Gibco BRL. Grand Island, NY, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 산화스트레스 유도

망막상피세포주를 1×105cell/㎖ 수준으로 하루 배양 후 산화스트레스를 유도하기 위하여 paraquat(Sigma. St Louis, U.S.A.) 50, 100, 500uM 농도로 3일간 처치 배양 하였다. 산화스트레스에 사용된 배지를 serum free media로 교체하여 48시간동안 반응시킨 후의 배지를 모아 -70℃로 보관하여 Western과 tube formation 실험에 이용였고, RT-PCR을 위해서는 동일한 처치 후 serum free media로 교체하여 6시간 반응 후에 TRIzol Reagent(Invitrogen, California, U.S.A.)을 이용하여 총 RNA를 추출하여 VEGF와 PEDF 유전자의 발현을 정량, 비교하였다.

3. 세포활성도 검사

세포를 죽이지 않으면서 세포 변형을 일으킬 수 있는 산화제인 H_2O_2와 paraquat의 적정 농도를 정하기 위해서 Pieters등[15]의 방법을 사용하

여 이들 산화제에 의한 실험세포주의 활성도를 측정하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. 96 well microplate(Falcon, Lincoln Park, NJ, U.S.A.)에 망막상피세포를 $0.5x10^4$/ml로 희석시키고 세포부유액 90 ㎕씩을 각각 넣었다. 그리고 18 시간 후에 측정하고자 하는 paraquat를 농도별로 10 ㎕씩 넣고 이때 약물대신 PBS를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 잘 흔든 후 2일간 CO_2 배양한 후 모든 well에 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 용액(5 mg/ml PBS, Sigma, St Louis, U.S.A.) 10 ㎕를 가해주고 다시 37℃, 5% CO_2에서 4-5시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에서 80 ㎕씩 버린 다음 150 ㎕ DMSO를 넣고 10 min동안 흔들어서 생성된 formazan 결정을 잘 녹여서 microplate reader(Bio-Tek, Cambridge, MA, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포내 산화스트레스 유발 측정

산화제인 H_2O_2 와 paraquat 에 의한 망막상피세포내의 산화 스트레스를 유발 유무를 반응성 산소라디칼의 생성을 형광광도 방법을 이용하여 측정, 확인하였다. $1x10^5$/ml의 망막상피세포에 500 μM, 1000 μM농도의 H_2O_2; 그리고 200 μM, 500 μM 농도의 paraquat를 각각 1 μM의 2-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 함께 투여 후 37℃에서 2시간 동안 5% CO_2 배양기에서 배양 후 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 형광강도를 측정하였다. 항산화제의 oxidative stress 억제기능은 세포를 $1x10^5$/ml로 도포한 후 N-acetyl cysteine(NAC), pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)를 30 분 동안 미리 처리한 후 H_2O_2, paraquat, 그리고 1 μM DCFH를 함께 처치한 후 2시간 동안 반응시킨 후 동일한 파장에서 측정하였다.[16]

5. 망막 색소상피세포에서의 VEGF, PEDF의 유전자 발현의 측정

혈관형성관련인자의 발현측정을 위하여 역전사중합효소연쇄반응을 시행하였다. 산화제를 처리한 후 모은 세포를 TRIzol Reagent (Invitrogen. California, U.S.A.)을 이용하여 분리 추출한 총 RNA로 RT-PCR(GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, CT, U.S.A.)을 시행하였다. 정량을 위하여 5 μCi [α-^{32}p] dCTP(Amersham, London, U.K.)를 PCR 반응 혼합물에 첨가 하였다. First strand cDNA를 1 U/㎕ RNasin (Promega. Madison. U.S.A.), oligo(dT) 450 ng, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT(Gibco BRL. Grand Island, NY, U.S.A.)와 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen. California. .USA) 200 U가 함유된 20 ㎕의 용액에서 총 RNA 1 ㎍으로부터 합성하였다. PCR은 1×PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl2, 100 ㎍/ml gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 primers 10 pmole, 50 μM dNTP와 *taq* DNA polymerase (Perkin Elmer, CT, U.S.A.) 2.5 unit가 함유된 25 ㎕의 반응액에서 시행하였다. 정량을 위하여 5 μCi [α-^{32}p] dCTP(Amersham, London, U.K.)를 반응 혼합물에 첨가하였다.[17] PCR 산물 25 ㎕로부터 VEGF, PEDF 10 ㎕와 β-actin 5 ㎕를 7% 비변성 polyacrylamide gel 상에서 100 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 1시간 30분 동안 80℃에서 건조한 후 X-ray 필림에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다. VEGF, PEDF과 β-actin cDNA 의 정량은 IMAGERTM 와 1D MAIN(Bioneer, Korea)로 semi-quantification 하였으며 β-actin cDNA를 기준으로 비교하였다.[18] 실험은 최소 2회 이상 반복하였다.

6. 망막 색소상피세포에서의 VEGF, PEDF의 생산의 측정

산화스트레스가 가해진 망막색소상피세포에서 생산된 혈관형성관련인자를 측정하기 위하여 Western blot를 시행하였다. 산화제처리 후 48시간동안 반응시킨 serum free media를 모아 실험에 사용하였다. 모아둔 배지는 protein assay kit(BCA assay. PIERCE, U.S.A.)를 사용하여 정량한 뒤 50ug의 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에 100V로 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride transfer(PVDF) membrane (Gelman Laboatory, MI, U.S.A.)에 40mA로 밤을 새워 전이시킨 후, membrane 을 5% non fat dry milk(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)가 포함된 Tween-tris-buffered saline(TBS-T)로 1시간동안 실온에서 blocking한 후 10분씩 3회 TBS-T buffer로 씻어준다. rabbit anti-VEGF antibody(1:2000. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U.S.A.)와 rabbit anti-PEDF antibody(1:2000, BD, San Diego. CA, U.S.A.)를 0.5% non fat dry milk가 든 TBS-T로 희석시켜 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 각각 10분씩 3회 TBS-T buffer로 씻어주었다. HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, U.S.A.) 2차 항체를 1: 2000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 각각 10분씩 3회 TBS-T buffer로 씻어주었다. HRP 활성은 chemiluminescent substrate(EPD western blot detection kit, ELPIS BIOTECH.INC, Korea)를 사용하여 X-ray film(Fujifilm, Japan)에 노출시켜 현상한 후 VEGF와 PEDF의 발현 양상을 분석하였다.[19] 이상의 실험은 최소 2회 이상 반복하였다.

7. ECV 304 cell을 이용한 맥관형성(tube formation)

산화스트레스를 받은 망막색소상피에서 얻은 배양액이 맥관형성을 유도하는 지를 알아보기 위하여 Paraquat처치 후 망막색소상피를 48시간동안 다시 반응시켜 얻은 serum free media를 모아 맥관형성 유도 실

험에 사용하였다. 산화제를 처리한 배양액에 VEGF와 PEDF에 대한 1차 항체, anti-VEGF antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U.S.A.), anti-PEDF antibody(BD, San Diego. CA, U.S.A) 10㎍/㎖를 각각 처리하여 4℃에서 밤을 새워 반응시켜 VEGF와 PEDF의 효과를 각각 제거하였다. 또한 일차 항체를 처리하지 않은 배양액도 함께 모아 Protein-A agarous bead(Oncogene, La Jolla. CA, U.S.A.), 200㎕/㎖를 넣어 다시 4℃에서 6시간 반응 후 4℃ centrifuge에서 12,000rpm으로 10분간 처리하여 상청액을 ECV-304 growth media와 1:1로 mix하여 본 실험의 tube 형성 실험의 배지로 사용하였다.[20]

Tube formation을 직접 확인하기 위해서, 먼저 250㎕의 Matrigel(BD, San Diego. CA, U.S.A)을 24 well plate에 분주 후 37℃에서 30분 반응시켰다.[21,22] 이 well plate에 0.5×10^5cell/㎖의 ECV 304 cell을 넣고 7일간 배양하였다. 이때 다른 성장인자를 제거하기위해 neutralization bFGF (R&D Systems. INC, USA), 30㎍/㎖을 같이 넣어주었다. 7일이 지난 후 PBS로 2~3회 세척 후 70% ethanol로 4℃에서 30분 이상 고정한 뒤 PBS를 넣어 현미경으로 사진을 찍었다.

8. 세포이동능력 검사

Paraquat 처리 후 48시간 동안 반응시킨 serum free media를 모아 실험에 사용하였다. 단층으로 빽빽하게 키운 human dermal microvascular endothelial cell에서 실험용 tip을 사용하여 살짝 그어 300 ㎛ 직경의 크기로 세포를 제거하였다. PBS로 2회 정도 세척 후 growth medium과 paraquat 처리한 serum free media를 1:1로 섞어 배양하였다. 이때 다른 성장인자를 제거하기 위해서 20㎍/㎖농도의 neutralization bFGF(Santacruz Biotechnology. California, U.S.A.)을 같이 넣어주었다. 24시간 뒤 PBS로 다시 2~3회 세척 후 100% ethanol

로 4℃에서 30분 이상 고정한 뒤 PBS로 세척하여 현미경으로 사진을 찍어 세포이동현상을 확인하였다.[19]

9. 통계분석

실험 결과는 평균±표준편차 형태로 나타내며 통계적인 분석은 SPSS program으로 Kruskal-wallis test를 이용하였다. $p<0.05$인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ 결 과

1. 세포 활성도 측정을 통한 적정 산화제 농도의 확인

여러 H_2O_2 와 paraquat 농도의 산화제를 망막 색소상피세포에 가하여 이들 산화제에 의한 세포치사율을 확인하였다. 산화제의 농도가 증가할수록 세포 치사율은 높았으며, H_2O_2 와 paraquat는 모두 농도가 1000 uM 이상인 경우 모두 세포 생존율이 10% 이하였다. H_2O_2 의 농도가 500 uM인 경우에 세포 생존율이 50% 이며 paraquat는 농도가 500 uM인 경우에 세포 생존율이 50% 이하였다.(Fig. 1). 본 실험에서는 50% 이하의 세포 생존율을 일으키지 않을 농도인 500 uM을 실험에 적합한 산화제의 농도로 산화스트레스를 유발하는 모든 경우에 사용하였다.

2. 산화제에 의한 망막상피세포의 산화스트레스 유발

산화제인 H_2O_2 와 paraquat 에 의한 망막상피세포내의 산화 스트레스를 유발 유무는 반응성 산소라디칼 생성을 형광광도 방법을 이용하여 측정, 확인하였다. 대조군을 100%로 하여 비교하였으며, H_2O_2 와 paraquat 모두 농도 의존적으로 반응성 산소종의 생성이 증가하였다. 특히 paraquat는 200 uM의 농도에서 대조군에 비해 150%정도의 반응성 산소종을 생성하였다. 또한 항산화제를 paraquat와 같이 동시에 처치한 경우에는 반응성 산소라디칼의 생성이 역시 항산화제 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다(Fig. 2).

3. 산화 스트레스에 의한 VEGF와 PEDF의 유전자 발현의 변화

Paraquat 3일 처리 후 혈관형성 유도인자인 VEGF의 유전자의 발현

은 paraquat농도에 차이가 없었다(Fig. 3). 그러나 paraquat 3일 처치 후에 항혈관형성 인자인 PEDF 유전자는 산화제의 농도에 따라 농도 의존적으로 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 4).

4. 산화 스트레스에 의한 VEGF와 PEDF의 생산의 변화

Western blot를 통하여 산화스트레스 하의 망막 색소상피세포에서 혈관생성결정인자, VEGF, PEDF의 단백질의 생산의 변화를 확인 결과, paraquat 처리 후 망막색소상피세포에서 paraquat 농도 의존적으로 VEGF 단백질의 생산이 증가하는 것을 확인하였다($p<0.05$)(Fig. 5). 또한 PEDF단백질의 생산은 paraquat 농도 의존적으로 감소하였다 ($p<0.05$)(Fig. 6),

5. 생산된 VEGF, PEDF의 tube formation에 대한 영향 확인

Paraquat를 처리한 conditioned medium으로 처리 시, paraquat의 농도가 증가함에 따라 더 많은 tube-like structure를 형성하였다(Fig. 7 A~D). 그러나 anti-VEGF antibody를 넣어 VEGF를 제거한 배지에서는 tube-like structure 형성에 변화가 없었다(Fig. 7 E~H). 그러나 anti-PEDF antibody를 넣어 PEDF를 제거한 배양액은 더 많은 tube-like structure 형성하였으며, paraquat 농도에 따라서는 변화가 없었다(Fig. 7 I~L).

6. 산화스트레스 배양액의 세포 이동에 미치는 영향 확인

Human fetal dermal microvascular endothelial cells에 paraquat를 가하여 얻은 conditioned medium으로 처리한 경우, 단지 growth medium으로 처리한 경우에 비교해서 그 세포 이동능력이 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig 8. A~E).

Ⅳ 고 찰

연령관련황반변성은 50세 이상에서 일어나는 황반의 변성질환으로 연성드루젠과 망막색소상피의 과색소침착, 저색소침착, 그리고 망막색소상피의 지도형 위축의 형태를 보이는 위축성 황반변성과 맥락막신생혈관의 발생에 따른 감각신경망막박리, 망막출혈, 그리고 망막섬유성 반흔 등을 보이는 삼출성으로 대별된다. 심한 시력장애는 대부분 맥락막 혈관신생을 동반한 삼출성 황반변성에서 생긴다.[23] 연령의 증가와 함께 발생빈도가 증가하는 황반변성은 색소상피에 가해진 산화스트레스와 관련된다고 알려져 있다.[24] 그러나 누적된 산화스트레스가 직접 망막색소 상피세포내의 어떠한 기전을 통하여 맥락막 혈관신생을 유도하는 지는 정확히 밝혀져 있지 않다.

정상적인 안구조직에서의 혈관형성은 VEGF와 같은 촉진인자와 PEDF 등의 억제인자 사이의 균형에 의하여 유지되나, 산화스트레스가 가해진 비정상적인 상태에서는 이들 인자간의 불균형이 발생하여 혈관형성이 유지된다.[12-14] 이들 보고에서는 VEGF의 생산증가보다는 PEDF의 발현감소에 의한 혈관신생인자의 불균형이 초래되어 혈관신생으로 이어진다고 보고하고 있다. 이러한 불균형의 상태를 Holekamp 등[25]은 황반변성으로 인한 맥락막 신생혈관이 있는 환자의 유리체에서 PEDF와 VEGF의 량을 검출 비교하여 입증하였고, Mori 등[26]도 유전자조작으로 PEDF을 과도하게 발현시킨 쥐에서 망막 및 맥락막신생혈관의 발생이 없었다는 사실을 보여주었다. 산화스트레스의 축적에 의한 노인성 변화가 실제적으로 망막 색소상피에서 작용하여 혈관신생을 유도할 수 있다는 인과관계를 직접 보여준 것은 아니다.

저자는 일차적으로 사람 망막 색소 상피세포주에 산화스트레스를 가하기 위하여 paraquat를 사용하여 산화스트레스의 상태를 유도하여 이

들 세포주에서 산화스트레스 상태가 유지되었음을 확인하였다(Fig. 1,2). 다음 단계로 신화스트레스가 입증된 세포들에서 혈관신생 유도인자로 알려진 VEGF와 혈관신생 억제인자인 PEDF를 역전사중합효소반응과 Western blot을 실시하여 조사한 결과 paraquat를 처치하지 않은 대조군에 비하여 약물처치 군에서 PEDF 유전자와 단백질의 발현이 paraquat 농도에 맞추어 감소됨을 확인하였다(Fig. 4,6). VEGF의 경우, 유전자의 발현의 변화는 확인 할 수 없었으나(Fig. 3), Western blot상에서는 paraquat 농도가 증가됨에 따라 VEGF 단백질의 생산이 의미있게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5). 이는 VEGF 유전자의 발현 후, 이들 유전자의 transcriptional modification 등에 의해서 단백질 발현이 다시 조절되는 것으로 추측할 수 있다.

저자의 실험결과는 실제 세포에 산화스트레스가 발생한 결과 혈관형성에 관여하는 인자의 생성에 변화가 발생하며 이는 세포내 혹은 외적 변화를 초래하여 결국에는 혈관신생이 야기됨을 실험적으로 입증하였다고 하겠다. 또한 혈관신생의 몇 가지 단계가 명확하게 밝혀져 있지는 않지만 기존의 노인 호발 황반변성의 경우, 혈관형성 억제인자의 감소에 의해서 정상 혈관생성의 균형이 깨져 혈관신생이 가능하다는 여러 실험결과와도 부합된다. 그러나 이러한 기존의 실험과는 달리, 직접 인체 망막 색소상피세포에 paraquat에 의한 산화 스트레스를 주어 이들 망막색소상피세포에서 직접 VEGF 단백질의 생산 증가를 확인하였고, 또한 맥관 형성 억제인자인 PEDF의 생산의 감소를 함께 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 VEGF의 생산의 변화를 확인하지 못했던 기존의 보고[18] 와는 달리 본 실험에서는 VEGF의 생산이 증가됨을 확인하여 이들 맥관 형성 중요한 두 인자의 불균형이 혈관신생에 관여함을 증명하였다. 또한 산화스트레스를 받은 사람 망막 상피세포에서 생산되는 혈관형성의 촉진인자, VEGF의 증가, 그리고 억제인자인 PEDF의 감소

와 같은 두 중요한 인자의 변화가, 결국은 혈관신생을 촉진함을 직접 확인하였고(Fig. 7) 또한 이들이 생산된 배양액이 혈관생성세포의 이동을 촉진시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

황반변성의 원인이 확실하게 규명되지 못하고 치료방법이 미진한 현 시점에서 산화스트레스를 받은 색소상피에서 혈관형성 유도인자와 혈관형성 억제인자간의 불균형이 신생혈관의 형성을 유도하는 본 연구의 결과는 연령관련황반변성의 원인을 이해하고 치료해법을 찾는데 의미를 주는 결과라 생각된다.

참고문헌

1) Klein R, Wang Q, Klein BE, Moss CE, Meuer SM. The relationship of age related maculopathy, cataract and glaucoma to visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci **36**:182-91, 1995.

2) Evans J, Wormwald R. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing. Br J Ophthalmol **80**:9-14, 1996.

3) 김재욱, 김하경, 김형찬. 연령관련황반변성에서 생긴 맥락막신생혈관에 대한 광역학요법. J Korean Ophthalmol Soc **43**(8):1435-43, 2002.

4) Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. Ophthalmology **100**:1519-35, 1993.

5) Chang TS, Freund KB, Cruz Z, Yannuzzi LA, Green WR. Clinicopathologic correlation of choroidal neovascularization demonstrated by indocyanine green angiography in a patient with retention of good vision for almost four years. Retina **14**:114-24, 1994.

6) Harman D. The aging process. Proc Natl Acad Sci USA **78**:7124-8, 1982.

7) Zarbin MA. Current concept in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol **122**:598-614, 2004.

8) Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of agerelated macular degeneration. Surv Ophthalmol **5**:115-134, 2004.

9) Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P Jr, Jones DP. Oxidative

damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res **19**:205, 2000

10) Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A. Matrix metalloproteinases and metalloproteinases inhibotors in choroidal neovascular membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci **39**:2194-200, 1998.

11) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell **86**:353-64, 1996.

12) Bussolio F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends Biochem Sci **22**:251-6, 1997.

13) Dawson DW, Volpert OV, Gillis P. et al. Pigment epithelium -derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. Science **285**:245-8, 1999.

14) Raymond L, Jacobson B. Isolation and identification of stimulatory and inhibitory cell growth factors in bovine vitreous. Exp Eye Res **34**:267-86, 1982.

15) Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. Cancer Lett. **41**:323-32, 1988.

16) Christopher A, Hathaway CA, Heistad DD, et al. Regression of atherosclerosis in monkeys reduces vascular superoxide levels. Circ Res **90**:277-83, 2002.

17) O'Connor KA, Hansen MK, Rachal Pugh C, Deak MM, Biedenkapp JC, Milligan ED, Johnson JD, Wang H, Maier SF, Tracey KJ, Watkins LR. Further characterization of high

mobility group box 1(HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. Cytokine. **24**:254-65, 2003.

18) Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. Proc Natl Acad Sci USA **82**:6133-7, 1985.

19) Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, Hayano M, Murota SI, Mochizuki M. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. J Cell Physiol **189**:323-33, 2001.

20) Song HS, Son MJ, Lee YM, Kim WJ, Lee SW, Kim CW, Kim KW. Oxygen tension regulates the maturation of the blood-brain barrier. Biochem Biophys Res Commun. **290**:325-31, 2002.

21) Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Lugering N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8(CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem **278**:8508-15, 2003.

22) Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell pheno-type. Biochem Biophys Res Commun **308**:984-9, 2003.

23) Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv phthalmol **31**:291-306, 1987.

24) Proctor PH. Free radicals and human disease, In CRC handbook

of free radical and antioxidants in biomedicine. vol I , Miquiel J, Quintanilha AT and Weber H ed. Florida: CRS Press 1989:209.

25) Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol **134**:220-7, 2002.

26) Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibit retinal and choroidal neovascularization. J Cell Physiol **188**:253-63, 2001.

Table 1. Primer sequences used for PCR

Gene	S&AS[b]	Nucleotide sequences	References[C]
VEGF	S	5′-TGCCTTGCTGCTCTACCTCC	Kyoko O, 2001
	AS	5′-TCACCGCCTCGGCTTGTCAC	
PEDF	S	5′-GGACGCTGGATTAGAAGGCAG	Kyoko O, 2001
	AS	5′-TTGTATGCATTGAAACCTTACAGG	
β-actin[a]	S	5′-GACTATGACTTAGTTGCGTTA	Nakajimalijima et al., 1985
	AS	5′-GTTGAACTCTCTACATACTTCCG	

[a] PCR control (house keeping gene).

[b] Sense and antisense.

[C] References for primer sequences.

Table 2. PCR conditions for VEGF, PEDF and β-actin

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle	72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에 보관
VEGF	94℃, 12min	94℃, 30sec	62℃, 30sec	72℃, 1min	28 cycles	
PEDF		94℃, 30sec	64℃, 30sec	72℃, 1min	31 cycles	
β-actin		94℃, 30sec	53℃, 30sec	72℃, 1min	19 cycles	

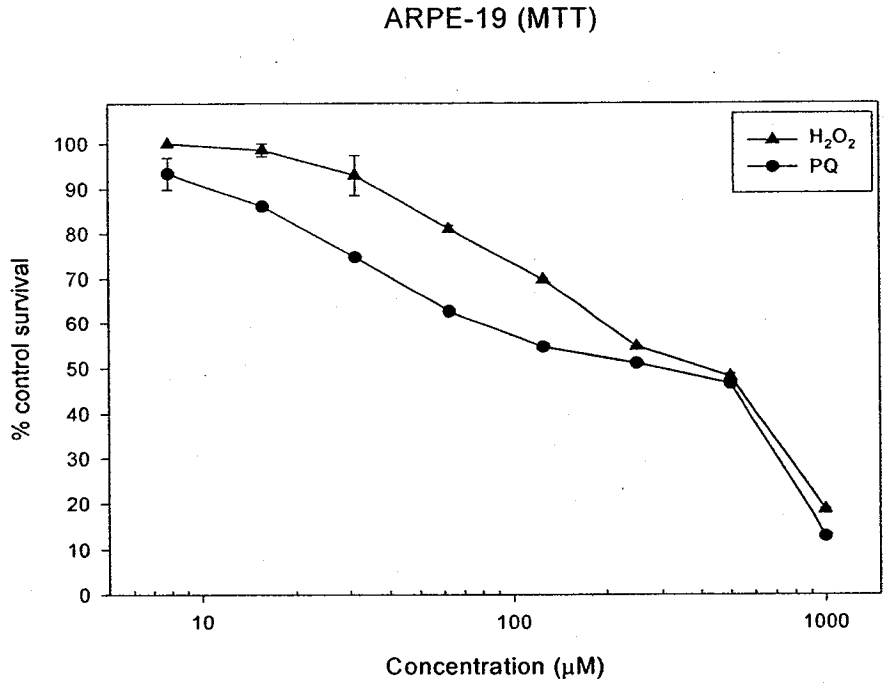


Figure 1. Human retinal pigment epithelial(HRPE) cell mortality according to various concentrations of oxidants such as hydrogen peroxide and paraquat.

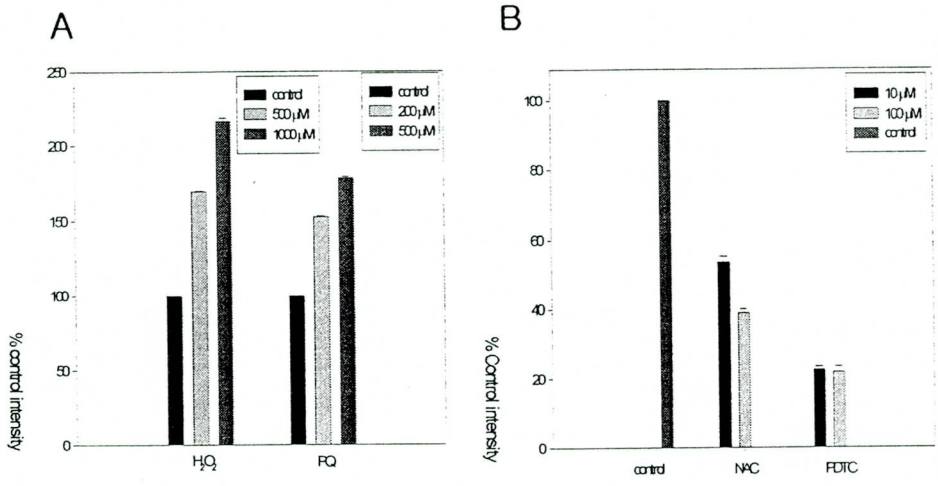


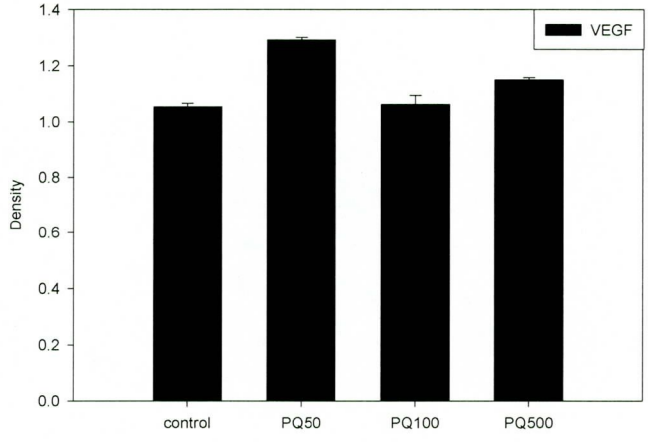
Figure 2. Flow cytometric analysis for intracellular ROS using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) indicates a significant increase after challenge with oxidized hydrogen peroxide and paraquat(A). Antioxidant effects of NAC and PDTC on the paraquat-treated ARPE-19 cells(B). Error bars indicate standard error of the mean.

ROS : reactive oxygen species

NAC : N-acetyl cysteine

PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate

ARPE : adult retinal pigment epithelium



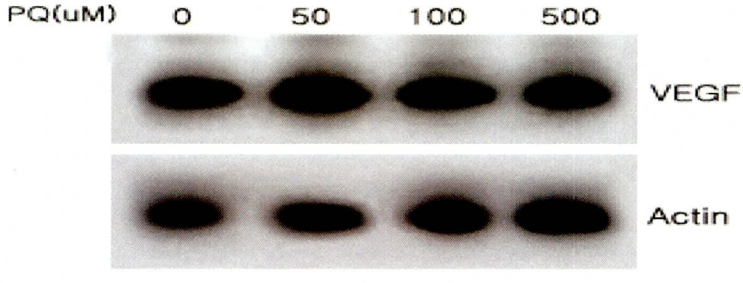
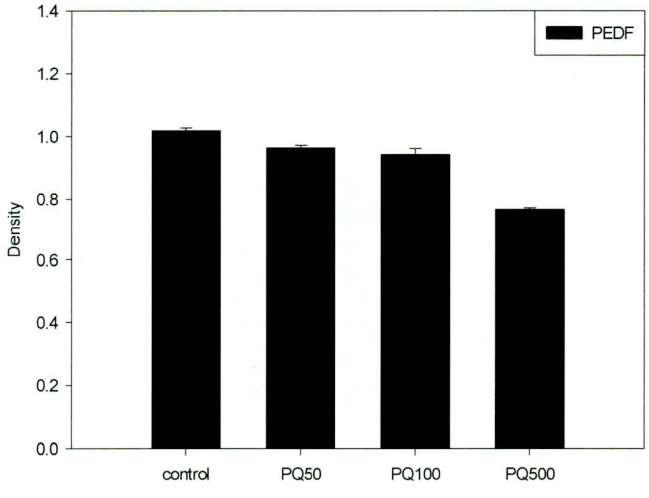


Fig 3. RT-PCR of VEGF mRNA and densitometric analysis of RT-PCR in RPE cells under oxidative stress. ARPE-19 cells were either exposed or not exposed to paraquat for 72 hr, as indicated. The expression pattern of VEGF is unchanged even after the cells are exposed to oxidative stress. Error bars indicate standard error of the mean.

ARPE : adult retinal pigment epithelium



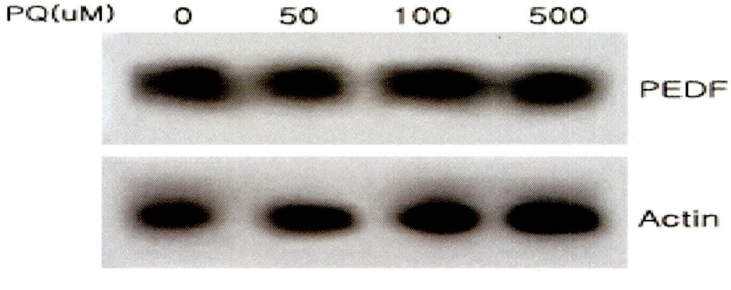
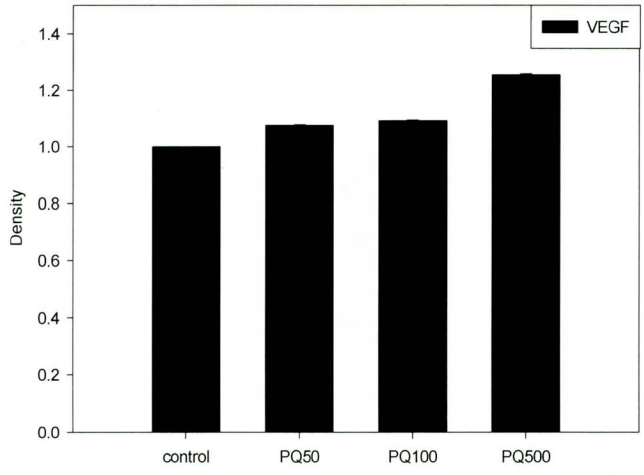


Fig 4. RT-PCR of PEDF mRNA and densitometric analysis of RT-PCR in RPE cells under oxidative stress. HRPE cells were exposed or not exposed to paraquat for 72 hr, as indicated. Quantitative analysis shows that expression of PEDF gene in HRPE cells is decreased by a dose-dependent manner after exposure to paraquat ($p \leq 0.05$). Error bars indicate standard error of the mean.



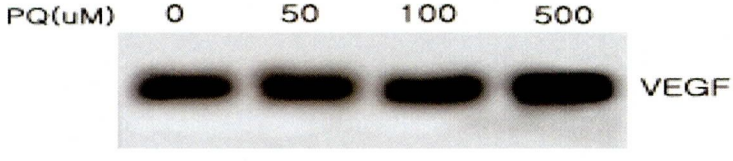
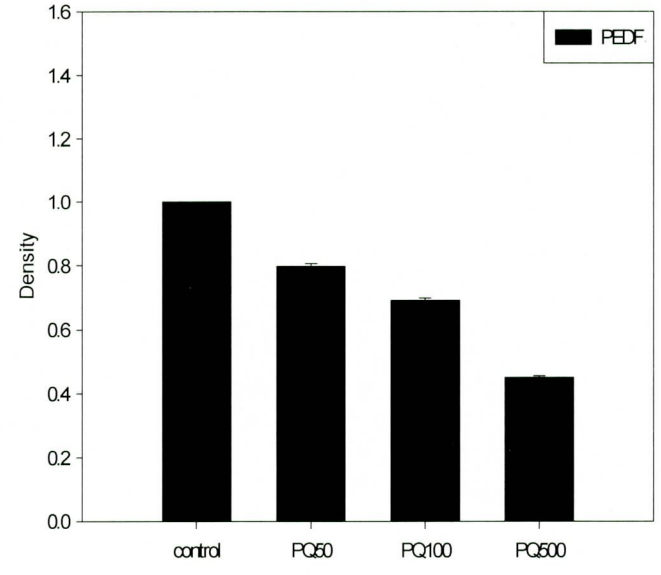


Fig 5. Western blot of VEGF protein and densitometric analysis of its production in HRPE cells under oxidative stress. HRPE cells were exposed or not exposed to paraquat for 72 hr. Quantitative analysis shows that production of VEGF protein in HRPE cells is increased by a dose dependent manner after exposure to paraquat ($p \leq 0.05$). Error bars indicate standard error of the mean.



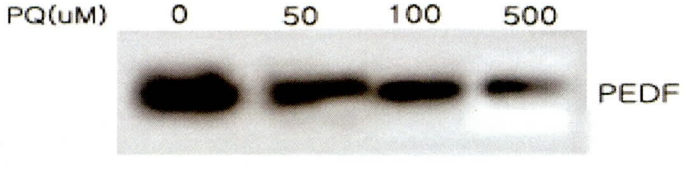


Fig 6. Western blot of PEDF protein and densitometric analysis of its production in HRPE cells under oxidative stress. HRPE cells were exposed or not exposed to paraquat for 72 hr. Quantitative analysis shows that production of PEGF protein in HRPE cells is decreased by a dose dependent manner after exposure to paraquat ($p \leq 0.05$). Error bars indicate standard error of the mean.

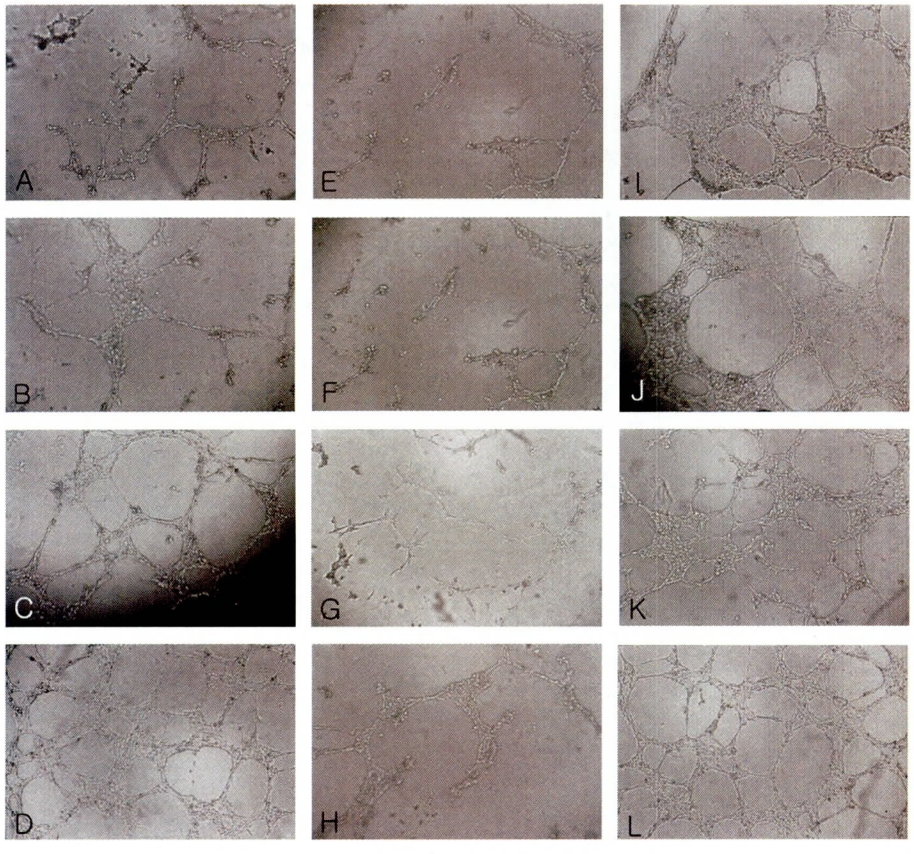


Fig 7. Measurement of change of tube-like structures on Matrigel caused by secreted VEGF and PEDF. Conditioned medium (A~D). Anti-VEGF antibody-treated conditioned medium (E-H) and anti-PEDF antibody-treated medium(I~L) were used for tube formation test as indicated in Materials and Methods. The concentration of the added paraquat increase from top to bottom. With the addition of paraquat on HRPE cells, tube-like structures are dose-dependently increased as shown in A-D. Removal of VEGF can not form tube-like structures anymore(E-H) whereas removal of PEDF form tube-like structures more, compared to the conditioned medium, irrespective of paraquat concentrations.

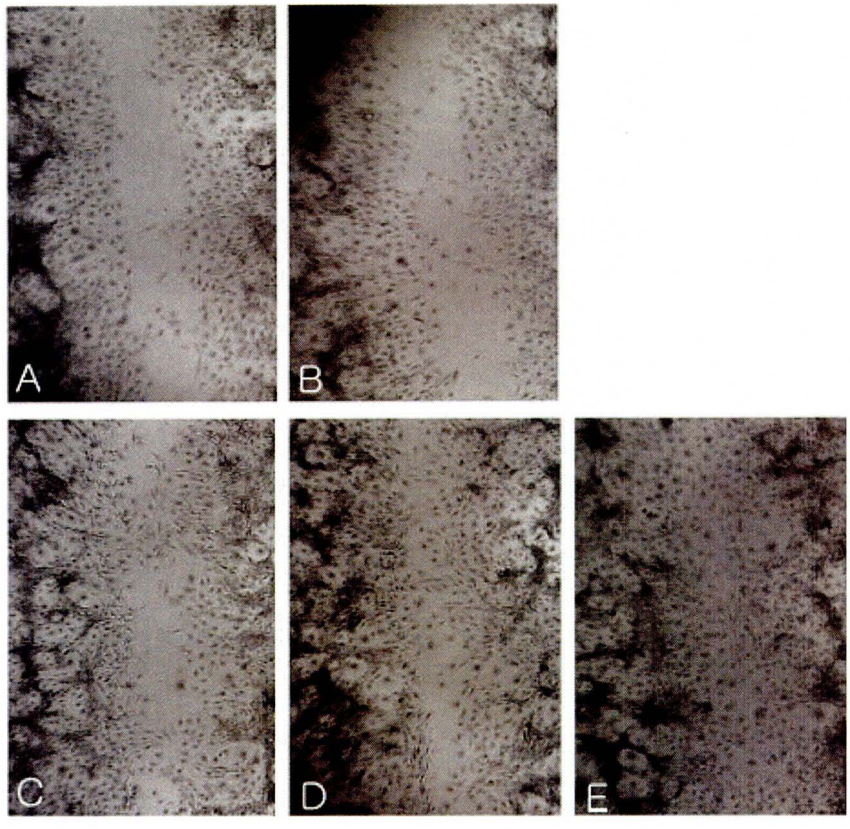


Fig 8. Effect of the HRPE-conditioned medium on human dermal microvascular endothelial cell in migration assay. A : HDMEC cell growth medium. B~E : Medium used was conditioned by HRPE cells with or without addition of paraquat(B : 0 uM, C : 50 uM, D : 100 uM, E : 500 uM). Neutralizing bFGF antibody was added to each well to exclude the migratory effect caused by bFGF contained in medium conditioned by HRPE cells.