

2007년 2월
석사학위 논문

망막색소상피에서 생산된 VEGF에
대한 Bevacizumab의 영향

조선대학교 대학원

의 학 과

허 광 선

망막색소상피에서 생산된 VEGF에
대한 Bevacizumab의 영향

Anti-VEGF Effect of Bevacuzumab on retinal pigment
epithelial cells

2007년 2월 23일

조선대학교대학원

의 학 과

허 광 선

망막색소상피에서 생산된 VEGF에
대한 Bevacizumab의 영향

지도교수 최 광 주

이 논문을 의학 석사 학위신청 논문으로 제출함

2006년 11월

조선대학교대학원

의 학 과

허 광 선

허광선의 석사학위 논문을 인준함

위원장	조선 대학교 교수	지 남 철 인
위원	조선 대학교 교수	최 광 주 인
위원	조선 대학교 교수	양 남 응 인

2006년 12월

조선대학교 대학원

목 차

도목차

ABSTRACT-----1

서론-----3

대상과 방법-----4

결과-----7

고찰-----8

참고문헌-----10

도 목 차

Figure 1. Western blot of VEGF protein and densitometric analysis of its production in ARPE19 cells after treatment of bevacizumab on their media.-----13

Figure 2. Inhibition of tube formation by bevacizumab. The cells were cultured with the supernatant of ARPE19 cells and ECV-304 cell medium (1:1).-----14

Figure 3. Effect of the RPE-conditioned medium on ECV-304 cells in migration assay.-----15

ABSTRACT

Anti-VEGF Effect of Bevacuzumab on retinal pigment epithelial cells

Xu Guang-Shan

Advisor : Prof. Choi Kwang-Ju Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Purpose: To elucidate the mechanism of anti-Vascular endothelial growth factor (VEGF) effect of bevacizumab (Avastin) at the cultured media of human retinal pigment epithelium (ARPE-19 cells).

Methods: ARPE-19 cells were cultured for 24 hours in the hypoxic chamber and then media was treated with Avastin for an hour. Production of VEGF was checked by Western blot. The induction of the neoangiogenesis by the culture supernatant harvested after exposure to hypoxic status and Avastin was monitored by both tube formation in ECV 304 cell and migration assay of human dermal microvascular endothelial cells.

Results: Western blot showed that the production of VEGF protein in ARPE-19 cells was decreased by a dose dependent manner after exposure to Avastin ($p < 0.05$). With Avastin treatment on culture media, tube-like structures of ECV-304 cells are decreased ($p < 0.05$). The degree of migration activity of ECV-304 cells decreased according to Avastin concentration ($p < 0.05$).

Conclusions: These results suggest that Avastin inhibit the neoangiogenesis at age-related macular degeneration by the decrease of VEGF activity on the

cell migration and tube formation.

Key Words: Avastin, VEGF, Migration assay, Tube formation

서 론

노인에서 호발하는 나이관련황반변성(황반변성)은 망막의 황반부에 발생한 변성으로 서유럽에서 노인실명의 중요한 원인 중의 하나이다.^{1,2} 노인에서 호발하는 황반변성 중 삼출성 황반변성은 망막 또는 망막색소상피 아래에 발생하는 맥락막신생혈관에서 누출된 삼출물이나 혈액에 의해서나 병소에서 이차적으로 유발되는 허혈 및 섬유혈관조직에 의한 망막손상으로 시력이 상실된다.³ 혈관신생은 맥락막 모세혈관으로부터 시작되어 손상된 브루크막을 지나 망막색소상피와 망막 하로 생성, 침범한다.^{4,5}

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 병적인 여건에서 비정상적인 혈관을 형성하고 혈관의 투과성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다. VEGF의 작용을 억제하여 혈관형성과 혈관투과성을 감소시킬 목적으로 습성 황반변성의 치료에 anti-VEGF가 이용된다. 2004년 12월 미국 FDA에서 맥락막혈관신생(Choroidal neovascularization : CNV)의 치료를 위하여 anti-VEGF aptamer인 pegatanib의 유리체내 투여를 허가하였고, 또 다른 anti-VEGF인 ranibizumab의 사용이 인정되었다. Bevacizumab(Avastin)은 대장암의 치료목적으로 개발된 anti-VEGF이나, 근래에 접어들면서 CNV의 치료에 사용되고 있다. 실제로 Michels et al.⁶이나 Rosenfeld et al.⁷은 CNV환자에서 이의 투여로 Ocular coherence tomogram (OCT) 소견에서 중심망막의 두께가 감소하고 시력이 호전되었다고 보고한 바 있다.

이에 본 저자들은 Avastin이 습성 황반변성에서 주요병변인 CNV에 어떠한 방법으로 작용하는 지를 알아보고자 망막색소상피세포주(ARPE-19 cells)를 배양하여 VEGF의 분비를 유도하고 이의 작용에 대한 억제가 실제로 발생하는지와 이 결과 비정상적인 혈관형성의 유도가 억제되는 지를 실험적으로 규명하여 보고자 하였다.

대상과 방법

1. 세포주 배양

세포 주는 인체 망막 색소 상피 세포 주 (ARPE-19; ATCC CRL-2302)를 37°C, 95% air, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 배양액은 56°C에서 30분간 열처리한 Fetal Bovine Serum (FBS: Gibco BRL, Grand Island, NY U.S.A.) 10%와 penicillin(100U/ml), streptomycin(100µg/ml)과 amphotericin B(1 µg/ml)와 항진균제(antibiotic-antimycotic, Gibco BRL, NY, U.S.A.)를 함유한 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)배지를 사용하였다.

2. 세포주의 저산소에 노출 후 Avastin의 처리

망막상피세포주가 뻗뻗하게 자라면 저산소 용기(혐기상자, Y&Y Mdeipro, Gwangju, Korea)에 94% N₂ / 5% CO₂ / 1%의 O₂ 로 관류시켜 24시간 반응 후 즉시 배지를 교환하여 각각 아무것도 처리하지 않은 대조군과 Avastin 2.5mg/4 ml, Avastin 1.25mg/4ml, Avastin 0.62mg/4ml로 수준으로 약물 처리한 뒤 37°C, 95% air, 5% CO₂상태의 습윤화된 배양기내에서 한 시간 동안 배양 후 배지를 따로 모아 Western blotting과 맥관형성(tube formation), 세포이동능력(migration assay)를 시행하였다.

3. VEGF 생산의 측정

Avastin으로 처리된 세포의 배지를 모아 실험에 사용하였다. 배지안의 단백질을 protein assay kit (BCA assay, PIERCE, US)를 사용하여 정량한 뒤 Laemmli et al.의 방법을 이용하여 단백질 생산을 측정하였다.⁸ 50µg의 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에 100V로 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane(Gelman Laboratory, USA)에 40mA로 밤을 새워 전이시킨 후, membrane(Gelman Laboratory, USA)을 지방성분이 없는

0.5% 마른 우유(GibcoBRL, NY, USA)가 포함된 Tween-tris-buffered saline (TBS-T)로 1시간동안 실온에서 blocking한 후 10분씩 3회 TBS-T buffer로 씻어주었다. Primary antibodies (VEGF antibody(1:2000, Santacruz Biotechnology, USA)를 지방성분이 없는 0.5% 마른 우유가 든 TBS-T로 희석시켜 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 각각 10분씩 3회 TBS-T buffer로 씻어주었다. Secondary antibodies(HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody, Jackson ImmunoResearch, USA)를 1 : 2000 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 단백질의 발현 양상을 분석하였다.⁹

4. ECV 304 cell을 이용한 맥관형성(*tube formation*)

24-well plate(Iwaki, Japan)에 0.4ml의 matrigel(Gelman Laboratory, MI, USA)을 코팅시켜 30분간 실온에서 배양하였다. 이 well plate에 4시간 전에 serum free 상태로 배양된 ECV-304 세포에 0.05% trypsin-EDTA(GibcoBRL, NY, USA)를 처리하여 1×10^5 cell/well 수준으로 분주였다.^{10,11} ECV-304 세포 배양 배지와 실험 조건에 맞게 처리한 대조군과 저산소 환경에 노출된 농도별 Avastin의 처리를 거친 망막색소상피세포주의 conditioned medium (DMEM/F-12, 1% FBS)을 1:1로 섞어 6시간 배양하였다.⁹ 이들 세포를 PBS로 2~3회 세척 후 70% 에탄올로 4°C에서 30분 이상 고정된 뒤 현미경으로 사진을 찍었다.^{12,13} 이 사진에서 무작위로 세 곳을 선택하여 ECV-304 세포가 만나 혈관 모양을 형성한 부분의 수를 세어 평균값을 구해 통계 처리하였다.

5. 세포이동능력 검사

60mm² plate에 monolayer 로 ECV-304 세포와 human dermal fibroblast 1:1로 혼합해 뾰뾰하게 키운 후 배지를 제거한 뒤 면도날로 60mm² plate에 상처를 만든 뒤 한쪽의 세포를 제거하였다. PBS로 2회 세척 후 growth medium과 저산

소 환경에 노출 뒤 농도별 약물처리를 거친 망막색소상피세포주의 conditioned medium을 1:1로 섞어 24시간 배양하였다.¹⁴⁻¹⁶ 이 세포를 PBS로 2~3회 세척하여 에탄올로 4℃에서 30분 이상 고정한 뒤 현미경으로 사진을 찍었다.⁹ 이 사진에서 무작위로 세 곳을 선택하여 상처부위에서 세포가 제거된 부분으로 이동한 세포의 수와 가장 멀리 이동한 세포의 거리를 재어 평균을 낸 뒤 통계 처리하였다.

6. 통계분석

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

결 과

1. VEGF의 검출량

저산소의 환경에 24시간 노출한 배양한 후 배양액을 Avastin으로 처리하여 Western blot를 통하여 측정 한 혈관형성촉진인자, VEGF 단백질의 검출량은 Avastin을 투여하지 않은 대조군에 비하여 Avastin의 농도가 증가함에 따라 감소되었다(Fig. 1)($p < 0.05$).

2. 배양액의 맥관형성에 미치는 영향

Avstin에 노출시키지 않는 배양액으로 처리한 대조군에 비하여 Avastin을 투여한 배양액은 ECV 304 cell의 맥관 형성을 억제하였다(Fig. 2)($p < 0.05$).

3. 배양액의 세포 이동에 미치는 영향 확인

Avstin으로 처리하여 얻은 배양액은 Avstin으로 처리하지 않은 배양액에 비해서 세포의 이동거리와 이동숫자를 감소시켰다(Fig. 3)($p < 0.05$).

고 찰

인체에서 신생혈관의 발생은 기존에 있는 모세혈관이 다양한 자극에 의해 발아가 일어나서 새로운 혈관이 생성되는 과정으로 먼저 혈관벽이 이완되어 투과성이 증가되고, 혈관내피세포들 간의 결합이 끊어지고 세포의 수축이 일어난다. 다음 단계로 다양한 단백질 분해효소가 활성화되어 기저막을 분해하고 혈관내피세포들은 혈관 벽에서 자극이 있는 방향의 혈관주변 조직으로 이동, 증식하여 루프를 형성하며, 형성된 루프들이 분화되어 혈관망을 생성하게 된다.^{17,18} 혈관신생을 유도하는 저산소는 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)를 증가시켜 VEGF, bFGF, IGF-II와 이들 수용체의 발현을 일으켜 혈관신생을 유발시킨다고 한다.^{14,19} 또한 PEDF는 인체망막색소상피세포를 배양한 배지에서 처음 분리되었으며, VEGF를 포함한 혈관형성유도인자에 강력히 대항하여 혈관형성을 억제시키는 인자이다. PEDF는 신생혈관형성의 유도를 자극 받은 내피세포의 세포사를 일으켜 혈관신생을 억제한다고 알려져 있다.²⁰ 정상적인 안구조직에서의 혈관형성은 VEGF와 같은 촉진인자와 PEDF 등의 억제인자 사이의 균형에 의하여 유지되나, 저산소나 산화스트레스와 같은 자극이 가해지면 이들 인자간의 불균형이 발생하여 혈관신생이 유발된다.²⁰⁻²²

맥락막모세혈관과 망막의 시세포층 사이에 위치한 망막색소상피세포는 자체적으로 혈관형성유도인자인 VEGF와 혈관형성억제인자인 PEDF를 생산한다. 이러한 신생혈관 유도인자와 억제인자를 적절히 분비하여 외측으로는 맥락막모세혈관의 정상적인 기능상태를 유지하고 내측으로는 시세포층의 무혈관상태를 유지시킨다.²³ 그러나, 망막색소상피세포에 저산소나 산화스트레스 같은 비정상적인 환경에 노출될 때 혈관형성관련인자인 VEGF나 PEDF의 생산과 분비는 변화되고 이러한 변화가 맥락막신생혈관의 발생을 유도하며,^{9,24,25} 습성 황반변성에서 발견되는 CNV도 이러한 환경의 변화로 발생하여 시력을 상실시킨다. 만일 VEGF의 작용을 억제시킬 수 있는 약물이 있다면 신생혈관의 생성이 억제되고 과 혈

관의 투과성이 안정되어 황반변성의 치료에 이용될 수 있다.^{9,26,27}

현재까지 VEGF에 대하여 작용하는 약물로 황반변성의 치료에 이용되고 있는 약제로는 2004년 12월 미국 FDA에서 맥락막혈관신생(Choroidal neovascularization : CNV)의 치료를 위하여 anti-VEGF aptamer인 pegatanib의 유리체내 투여를 허가하였고, 또 다른 anti-VEGF인 ranibizumab의 사용이 인정되었다. Avastin은 대장암의 치료목적으로 개발된 anti-VEGF이나, 근래에 접어들면서 CNV의 치료에 사용되고 있으며, Michels et al.⁶이나 Rosenfeld et al.⁷은 CNV가 있는 황반변성 환자에서 이를 투여하였다고 보고하고 있다. 그러나, Avastin이 어떻게 작용하여 CNV의 치료에 긍정적으로 작용하는지는 명확하지 않다.

본 저자는 배양망막색소상피를 저산소환경에 노출시켜 VEGF의 생산증가를 유도하고 이때에 모아진 배지에 Avastin를 처치하여 VEGF의 양을 검출한 결과 Avastin의 투여량에 따라 VEGF 단백질이 감소하였고 이러한 변화는 신생혈관을 만들어 내는 과정에서 필수적으로 거치는 맥관형성과 세포이동을 억제한다는 사실을 확인하였다(Fig. 1-3). 결론적으로 Avastin을 습성 황반변성에 투여할 때 세포외 기질에 있는 VEGF의 작용을 억제하여 비정상적인 혈관형성을 감소시키는 방향으로 Avastin이 작용한다는 것을 알 수 있었고 이러한 결과가 황반변성의 치료에도 긍정적인 방향으로 작용할 수 있으리라 판단된다.

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* 1995;36:182-191.
- 2) Evans J, Wormwald R. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing. *Br J Ophthalmol* 1996;80:9-14.
- 3) Kim JW, Kim HK, Kim HC. Photodynamic Therapy for Choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration. *J Korean Ophthalmol Soc* 2002;43:1435-43.
- 4) Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 1993;100:1519-35.
- 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* 1994;14:114-24.
- 6) Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bavituzumab therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112:1035-47.
- 7) Resenfeld PJ, Moshifeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab for neovascularization age-related macular degeneration. *Ophthalmic Laser Imaging* 2005;36:331-5.
- 8) Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol*

Biol 1970;14:69-85.

- 9) Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;189:323-33.
- 10) Satoshi Matsuda, Fumi Gomi, Yusuke Oshima, Masaya Tohyama, and Yasuo Tano. Vascular endothelial growth factor reduced and connective tissue growth factor induced by triamcinolone in ARPE-19 cells under oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1062-8.
- 11) Song HS, Son MJ, Lee YM, et al. Oxygen tension regulates the maturation of the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:325-31.
- 12) Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin-8(CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003;278:8508-15.
- 13) Smith CL, Birdsey GM, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:984-9.
- 14) Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 1991;53:411-4.
- 15) Jung S, Kim HW, Lee JH, et al. Brain tumor invasion model system using organotypic brain-slice culture as an alternative to in vivo model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:469-76.
- 16) Shen WG, Peng WX, Dai G, et al. Calmodulin is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress in endothelial cells. *Cell Biol Int* 2006;28:
- 17) Yancopoulos G, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis,

- and growth factor: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998;93:661-4.
- 18) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
 - 19) Safarin M, Kaelin WJ Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* 2003;111:735-45.
 - 20) Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-48.
 - 21) Bussolio F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:251-6.
 - 22) Raymond L, Jacobson B. Isolation and identification of stimulatory and inhibitory cell growth factors in bovine vitreous. *Exp Eye Res* 1982;34:267-86.
 - 23) Schlingemann RO. Role of growth factor and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:91-101.
 - 24) Kim YD, Park YC, Choi GJ. Expression of angiogenesis-related factors in retinal pigment epithelial cells under hypoxia. *J Korean Ophthalmol Soc* 2006;47:629-36.
 - 25) Kim JM, Kim JY, Lee YH, Choi GJ. Angiogenesis according to expressive change of angiogenic related factor in human RPE under oxidative stress. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:366-76.
 - 26) Kaiser PK. Anti-vascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol* 2006;142:660-8.
 - 27) Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:328-35.

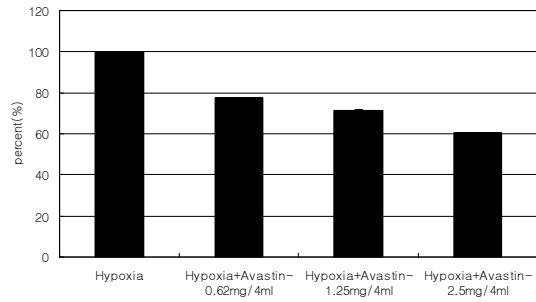
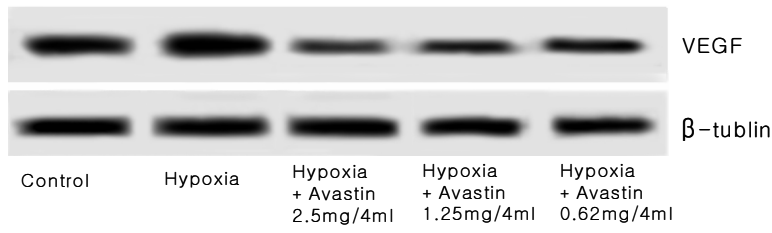
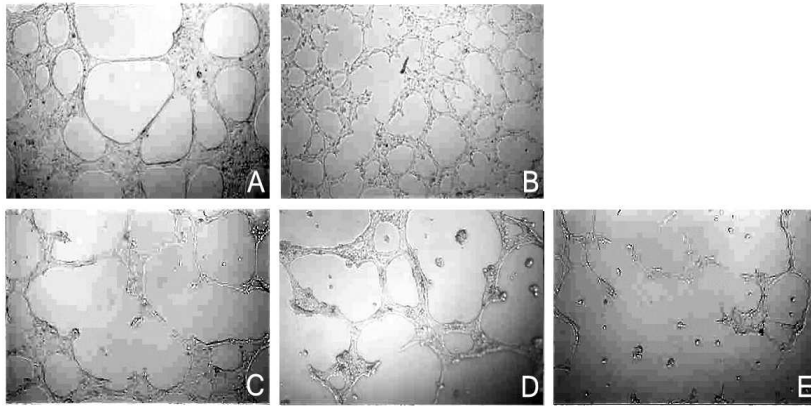


Figure 1. Western blot of VEGF protein and densitometric analysis of its production in ARPE19 cells after treatment of bevacizumab on their media. Quantitative analysis shows that production of VEGF protein in ARPE19 cells is decreased by a dose dependent manner after exposure to bevacizumab ($p < 0.05$).



A:Control B:Hypoxia C:Hypoxia+Avastin 0.62mg D:Hypoxia+Avastin 1.25mg E:Hypoxia+Avastin 2.5mg

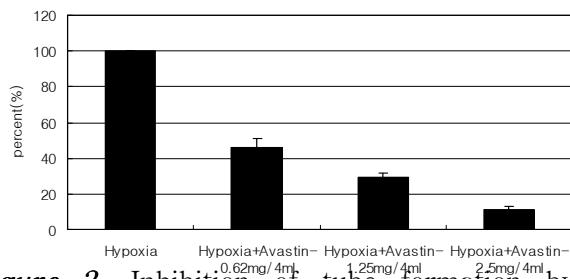
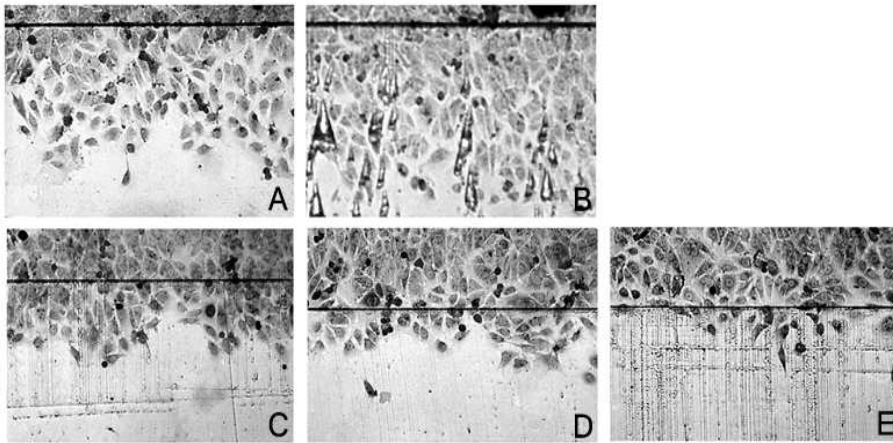


Figure 2. Inhibition of tube formation by bevacizumab. The cells were cultured with the supernatant of ARPE19 cells and ECV-304 cell medium (1:1). After 6 hours culture, tube like structure were analyzed. The supernatants of ARPE19 cells used were collected from the APRE19 conditioned media at hypoxia condition for 24 hours. With bevacizumab treatment on culture media, tube-like structures of ECV-304 cells are decreased as shown in A-E,(p<0.05).



A:Control B:Hypoxia C:Hypoxia+Avastin 0.62mg D:Hypoxia+Avastin 1.25mg
E:Hypoxia+Avastin 2.5mg

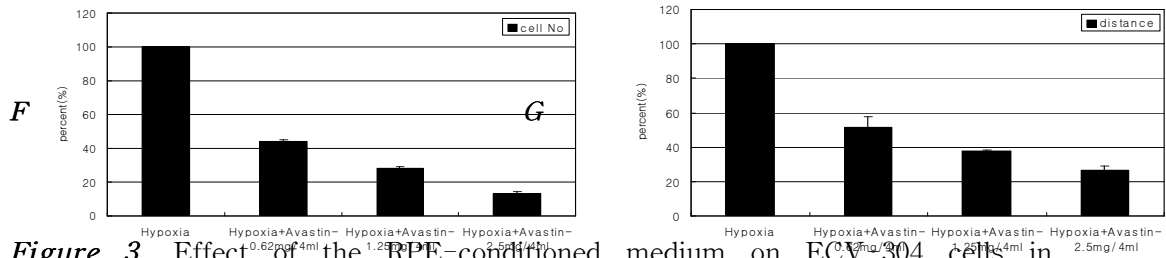


Figure 3. Effect of the RPE-conditioned medium on ECV-304 cells in migration assay. Conditioned medium was harvested from the culture dishes after ARPE 19 cells were cultured for 24 hours at hypoxia condition and then exposed to bevacizumab. After initial wound scraping, cells were cultured for 24 hours and then observed. The degree of migration activity of ECV-304 cells decreased according to bevacizumab concentration(A-D)($p < 0.05$).