

제2형 당뇨병 동물모델에서 항 혈관내피세포 성장인자(Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) 투여 시 췌장에 대한 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 내분비대사내과¹, 순환기내과², 생리학교실³, 경희대학교 의과대학 내분비내과⁴

김지원¹ · 함동식¹ · 박현석¹ · 안유배¹ · 송기호¹ · 윤건호¹ · 유기동² · 김명준³ · 정인경⁴ · 고승현¹

Effects of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Pancreatic Islets in Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus

Ji-Won Kim¹, Dong-Sik Ham¹, Heon-Seok Park¹, Yu-Bai Ahn¹, Ki-Ho Song¹, Kun-Ho Yoon¹, Ki-Dong Yoo², Myung-Jun Kim³, In-Kyung Jeong⁴, Seung-Hyun Ko¹

¹Division of Endocrinology & Metabolism, Department of Internal Medicine,

²Division of Cardiology, Department of Internal Medicine,

³Department of Physiology, The Catholic University of Korea,

⁴Division of Endocrinology & Metabolism, Department of Internal Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Abstract

Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with the development of diabetic complications. However, it is unknown whether systemic VEGF treatment has any effects on the pancreatic islets in an animal model of type 2 diabetes mellitus.

Methods: Anti-VEGF peptide (synthetic ATWLPFR, VEGF receptor type 2 antagonist) was injected into db/db mice for 12 weeks. We analyzed pancreatic islet morphology and quantified beta-cell mass. Endothelial cell proliferation and the severity of islet fibrosis were also measured. VEGF expression in isolated islets was determined using Western blot analysis.

Results: When anti-VEGF was administered, db/db mice exhibited more severe hyperglycemia and associated delayed weight gain than non-treated db/db mice. Pancreas weight and pancreatic beta-cell mass were also significantly decreased in the anti-VEGF-treated group. VEGF and VEGF receptor proteins (types 1 and 2) were expressed in the pancreatic islets, and their expression was significantly increased in the db/db group compared with the db/dm group. However, the elevated VEGF expression was significantly reduced by anti-VEGF treatment compared with the db/db group. The anti-VEGF-treated group had more prominent islet fibrosis and islet destruction than db/db mice. Intra-islet endothelial cell proliferation was also remarkably reduced by the anti-VEGF peptide.

Conclusion: Inhibition of VEGF action by the VEGF receptor 2 antagonist not only suppressed the proliferation of intra-islet endothelial cells but also accelerated pancreatic islet destruction and aggravated hyperglycemia in a type 2 diabetes mouse model. Therefore, the potential effects of anti-VEGF treatment on pancreatic beta cell damage should be considered. (Korean Diabetes J 33:185-197, 2009)

Key words: Diabetes Mellitus type 2, Islets of Langerhans, Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)

접수일자: 2009년 4월 8일, 통과일자: 2009년 5월 26일

교신저자: 고승현, 가톨릭대학교 성빈센트병원 내분비내과, E-mail: kosh@catholic.ac.kr

* 이 논문은 2007년도 당뇨병학회 추계 연구비 및 2007년도 정부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-531-E00030).

서 론

대표적인 당뇨병성 합병증인 당뇨병성 신증과 망막병증은 공통적으로 혈관내피세포 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)가 합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 당뇨병환자 및 동물모델에서 VEGF의 혈중 농도 및 신장과 안구 내 VEGF 발현이 증가되어 있으며, 항 VEGF 항체 치료 시 당뇨병성 신증이나 망막병증의 진행이 예방되어 항 VEGF 치료가 미세혈관 합병증 치료에 좋은 표적이 될 가능성을 시사하나¹⁻³⁾, 항 VEGF 치료가 췌도나 베타세포에 직접적으로 어떠한 영향을 주는지는 췌도이식 모델 이외에는 거의 알려진 바가 없다⁴⁻⁶⁾.

인슐린저항성 또는 고혈당 환경에 노출된 베타세포는 고혈당 상태를 극복하기 위하여 보상기전이 일어나는데, 베타세포가 양적으로 증가하는 베타세포의 증식(beta cell proliferation & islet hyperplasia), 신생(neogenesis)과 함께 아포토시스(apoptosis)의 감소가 대표적이다. 췌도 내 베타세포 증식에 따른 충분한 혈류 공급을 위해서는 혈관세포의 증식이 동반되어야 할 것으로 추정되며, 췌도 내 혈관망이 충분히 형성되어야 가능한데 이는 췌도 내 혈관밀도(vascular density)의 증가와 비례관계에 있다⁷⁻⁹⁾. 혈관세포의 증식과 관련되어 있는 여러 인자들 중에서 특히 VEGF는 강력한 혈관신생인자이다.

VEGF는 45-KD의 homodimeric glycoprotein으로써 6개 이상의 동종형(isoform)이 존재하며 혈관 내피세포에 있는 VEGF 수용체에 결합하여 강력한 혈관투과성 및 혈관확장, 혈관생성, matrix remodeling 작용을 나타낸다. VEGF 수용체는 VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1), VEGFR-2 (kinase domain receptor, KDR/Flk-1), VEGFR-3 세 가지 형태가 존재하는데, 내피세포를 통한 대부분의 VEGF 혈관생성 작용은 VEGFR-2 를 통해 이루어 진다^{10,11)}. 내분비세포에도 VEGF가 발현되며 VEGFR-1과 VEGFR-2 모두 췌도 내 내피세포에 존재하는데, 특히 VEGFR-2 는 췌관세포(pancreatic duct cell)에도 발현한다¹¹⁻¹³⁾. 따라서 VEGF와 수용체 간의 작용을 차단함으로써 당뇨병 발생 시 췌도에 대한 VEGF의 영향을 관찰할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 저자들은 당뇨병 동물모델인 db/db mouse에 12주간 VEGF와 VEGFR-2 수용체 간의 결합을 억제하는 합성 펩타이드(ATWLPPR)를 복강 내 투여하여 VEGF와 VEGF receptor와의 상호작용을 차단함으로써 혈당의 변화, 베타세포 질량 및 췌도의 형태적인 변화를 관찰하고 VEGF의 췌

도 내 발현 정도를 평가하고자 하였다. 이를 토대로 당뇨병성 합병증의 치료를 목적으로 하는 항 VEGF 치료가 췌장과 당뇨병의 경과에 미치는 영향을 관찰하고, 당뇨병이 진행되면서 나타나는 췌도 및 베타세포의 변화에 있어서 VEGF의 역할을 규명하여 추후 항 VEGF 치료에 응용하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 대상 및 항 VEGF 투여

당뇨병 동물모델인 db/db mouse와 정상 대조군인 db/dm mouse를 이용하였으며, 다음과 같이 3군으로 나누었다. 비당뇨 대조군(db/dm mouse, Non-diabetic control, n = 10), 당뇨 대조군(db/db mouse, Diabetic control, n = 10), 당뇨 항 VEGF치료군(db/db mouse, n = 10). 췌도 내 VEGF 수용체와 VEGF의 상호작용을 차단하기 위하여 항 VEGF 펩타이드 중 VEGF-VEGF-Receptor 2 결합에 대해 가장 특이한 antagonist로 알려진 항 VEGF 펩타이드(5 mg/kg, ATWLPPR, PEPTRON Inc., Daechon, Korea)를 제작하여 생후 6주부터 12주간 주 3회 복강 내 투여하였다^{14,15)}. 비당뇨 대조군과 당뇨 대조군에는 각각 식염수를 12주간 복강 내 주 3회 주사하였다. 관찰기간 동안 체중과 혈당, 먹이섭취 양을 매주 공복상태에서 측정하였다.

2. 복강 내 당부하검사

25% 포도당(2 g/kg)의 포도당을 복강 내로 투여하고 투여하기 전과 투여 후 30, 60, 90, 120분에 꼬리 정맥에서 채혈하였으며, 혈중 포도당 농도는 YSI 포도당 분석기(Beckman Instrument Co., Palo Alto)를 이용하여 glucose oxidase 방법으로 측정하였다.

3. 면역염색

연구 종료시점에서 당부하검사를 시행한 뒤 마취하고 췌장을 적출하여 무게를 측정한 후 전체 췌장의 1/3은 In situ hybridization을 위해 -70℃ 냉동고에 보관하고, 다른 1/3은 Western blot에 사용하며 나머지 1/3은 면역염색을 위해 고정 후 파라핀에 포매하였다. 베타세포 질량 및 췌도면적의 측정을 위해 7 µm 두께의 조직절편을 streptavidin-biotin-peroxidase (Vector Laboratories)법을 이용하여 항인슐린 항체(1:200, guinea pig anti-insulin antibody, Linc Research Inc., St. Charles, MO)와 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발

색한 다음 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하였다. 췌도 내 섬유화(Islet fibrosis)의 정량을 위해서 Masson's Trichrome stain을 시행 하였으며, 췌도 내 VEGF 발현을 측정하기 위하여 항 VEGF 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:200)로 염색하였다.

각 항체로 염색 후 Image analyzer (Optimas 6.51, Media Cybernetics)를 이용하여 관찰하였고, 췌도 내 섬유화 및 VEGF 발현의 정량은 전체 췌도 면적 중 Trichrome이나 VEGF 항체로 염색되는 면적을 구하여 상대적인 비율로 표시하였다.

4. 베타세포 질량 측정

각 군에서 췌장조직 내 베타세포의 상대적 양을 비교하기 위해 췌장조직을 항인슐린항체로 염색한 후 point counting법을 이용하였다¹⁶⁾. 베타세포의 췌장조직 내 비율은 췌장조직에 해당하는 점에 대한 베타세포가 차지하는 점의 비율로 구하며, 베타세포 질량은 잔여 췌장의 무게를 조직 내에서 point counting으로 측정한 베타세포의 상대적 용적을 곱하여 환산하였다.

5. 췌도 내 혈관내피세포 염색 및 혈관 밀도(Vascular Density) 측정

조직에서 내피세포와 미세혈관(microvessel)을 관찰하는 방법으로 biotinylated Bandereira simplicifolia-1 (BS-1, Sigma, 1: 1000)를 이용하여 염색하였다¹⁷⁾. 조직 슬라이드를 neuraminidase type X (Sigma)로 전 처리 후 biotinylated BS-1으로 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 뒤 세척하여 streptavidin complex (DAKO)로 실온에서 30분 배양 후 400배 배율로 현미경 관찰하였으며, 췌장 조직 내에서 췌도를 구분하기 위하여 인슐린 염색을 동시에 시행하였다. 췌도 내 혈관내피세포의 정량은 전체 췌도 면적 중 BS-1로 염색되는 부위의 상대적인 비율로 나타내었다.

6. In Situ Hybridization

췌장에서 VEGF와 VEGF receptor mRNA의 발현을 보기 위해 In Situ hybridization을 시행하였다. VEGF와 VEGF receptor의 탐침자는 역전사효소와 연쇄사슬증폭법을 이용하였고, 증폭산물을 pGEM-Teasy vector에 cloning 하고 sequencing을 통해 이들 유전자를 확인하였다. 합성된 탐침자를 DIG-labeling kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 표지하였다(VEGF R-1 (Flt-1); 5'-ccttg cagctgtgac ttccaggggt ccgagagtca gccaccacca atgtg-3'; VEGF R-2 (Flk-1); 5'-aaa ctggtgtgag tgattcgccc atgtggaccg

atgttgccctg tgagcca-3). 적출된 췌장을 4% PFA로 고정한 후 파라핀 포매하고 3 µm 두께로 박절하였다. 조직을 proteinase K (20 µg/mL)로 전처리하고, hybridization solution (4X SSC, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 2 mM EDTA, 50% deionized formamide, 500 µg/mL herring sperm DNA)에 탐침을 희석하여(1:500) 55℃에서 20시간 반응시켰다. 2x SSC, 1x SSC, 0.5X SSC 용액을 이용하여 수세한 후, Dig가 표지된 항체(1:10000)로 2시간 반응시킨 후 NBT/BCIP 용액(Roche)으로 발색하였다.

7. 췌도 분리

합성된 항 VEGF가 in vivo effect를 보이는지 확인하고 고혈당 처리군에서 VEGF 단백질의 발현이 증가되어 있는지 확인하기 위하여 각 실험군에서 collagenase법을 이용하여 췌도를 분리하였다^{18,19)}. Collagenase P (1 mg/mL, Roche)를 천천히 주입하여 췌장을 부풀린 후 떼어내어 37℃에 25분간 digestion한 후에 10% FBS가 포함되어 있는 차가운 M199 media를 첨가하여 20회 정도 hand shaking한 다음 500 µm mesh에 통과시키고 원심분리로 상층액을 완전히 제거한 후 histopaque1077를 넣고, M199 media를 넣은 후 원심분리하였다. 이렇게 해서 얻어진 중간층의 세포를 추출해서 10% FBS가 포함된 RPMI1640 media에 놓고 배양하였다. 항 VEGF peptide의 효과를 보기 위하여 배양한 췌도에 30분간 항 VEGF를 전처리 한 후 VEGF의 발현이 저하되는지를 Western blot으로 관찰하였다.

8. Western Blot Analysis

단백질은 Laemmli sample buffer로 녹여 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 젤을 0.45 µm hydrophobic polyvinylidene difluoride 막(PVDF, Amersham Co., Buckinghamshire, England)에 transfer시키고 PVDF는 3% skim milk를 함유한 Tris buffered saline (TBS; 20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7.5)으로 1시간 동안 blocking시킨 다음 blot들을 VEGF (Sigma, 1:1000) 일차 항체 용액에 넣어 약 2시간 상온에서 배양한 후 세척하고 HRP-conjugated anti-mouse 이차 항체 용액(희석비율, 1:1,000)으로 1시간 동안 상온에서 배양한 다음 세척한 후 발색하였다. β-actin 항체를 대조값으로 보정하고 단백질 발현강도는 densitometer VSD (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 측정하였다.

9. 통계

결과값은 평균과 표준편차로 표시하였고, 각 군 간의 차

이는 SPSS 10.0 프로그램을 이용하였다(Chicago). 각 군 간의 평균값의 비교는 independent *t* test와 one-way ANOVA 법으로 분석하였고, *P*값이 0.05 이하인 경우를 의미 있는 것으로 정의하였다.

결 과

1. 항 VEGF 투여 시 체중의 변화

항 VEGF를 투여한 db/db군이 투여하지 않은 db/db군에 비해 유의한 체중의 차이를 보였는데, 12주간 항 VEGF를 투여한 군이 db/db군에 비해 관찰기간 내내 체중이 적은 양

상을 보였다(45.4 ± 3.29 vs. 49.7 ± 3.0 g, $P < 0.05$, Fig. 1). 관찰기간 동안 평균 하루 먹이 섭취량은 마리 당 db/dm 군 9.3 ± 0.2 g, db/db군 11.1 ± 0.3 g, Anti-VEGF군 11.5 ± 0.8 g으로 군 간의 차이는 없었다.

2. 항 VEGF 투여 시 혈당의 변화

항 VEGF 투여 후 9주와 12주째 복강 내 당부하검사를 시행하여 혈당의 변화를 관찰하였다. 9주(공복 혈당, db/db vs. anti-VEGF, 321.0 ± 23.8 vs. 422.4 ± 134.2 mg/dL, $P < 0.05$; 2시간 혈당, db/db vs. anti-VEGF, 856.0 ± 79.5 vs. 1071.0 ± 87.1 mg/dL, $P < 0.05$, Fig. 2)와 12주째 공복

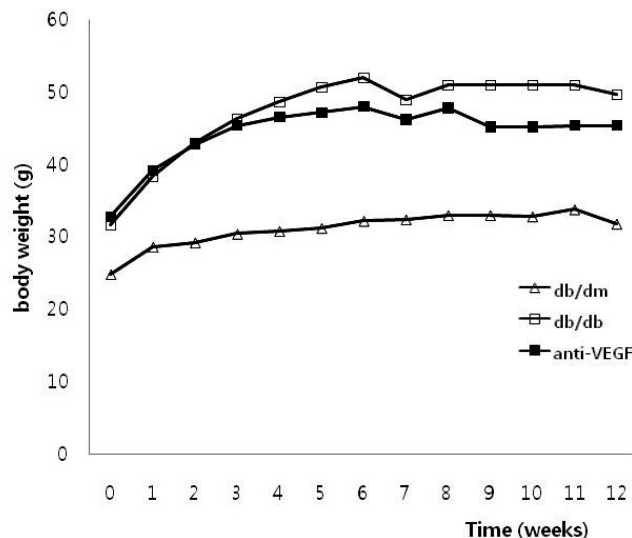


Fig. 1. Changes in body weight. Compared with the db/db group, the anti-VEGF-treated group had a significantly lower body weight after 3 weeks of anti-VEGF injections.

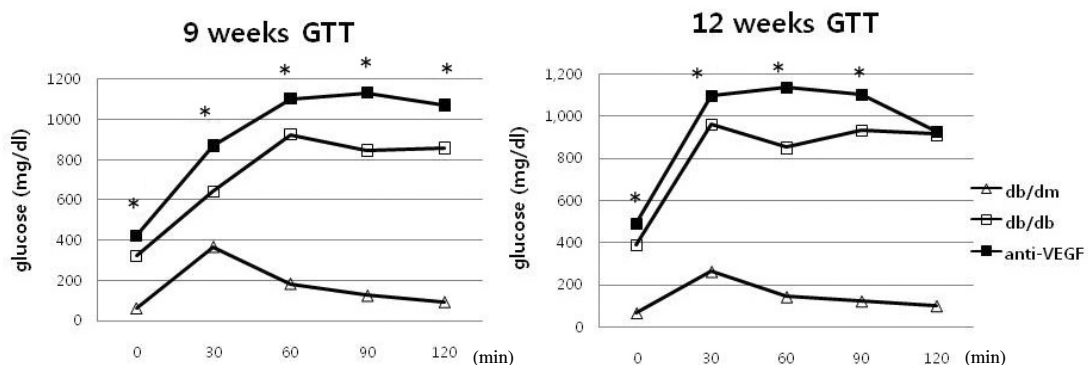


Fig. 2. The result of intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTTs). Glucose concentrations during IPGTTs conducted 9 and 12 weeks after the start of the trial showed remarkable differences between the anti-VEGF and diabetic control groups. The anti-VEGF group had greater hyperglycemia than that of the db/db group (* $P < 0.05$).

혈당(db/db vs. anti-VEGF, 386.7 ± 134.5 vs. 491.4 ± 45.0 mg/dL, $P < 0.05$)이 항 VEGF 투여군의 혈당수치가 당뇨 대조군에 비해 현저하게 높은 값을 보였다. 12주째 2시간 혈당은 비록 통계적인 차이는 없었으나 역시 항 VEGF군에서 더 높게 측정되었다(db/db vs. anti-VEGF, 913.0 ± 173.2 vs. 926.4 ± 124.8 mg/dL, $P > 0.05$, Fig. 2).

각 시점에서 포도당하 면적(AUCg, Area under the curve of glucose)값을 계산한 결과에서도 역시 항 VEGF 군에서 당뇨 대조군에 비하여 의미있게 높은 값을 보였다 (9 weeks, db/db vs. anti-VEGF, 2998.5 ± 271.6 vs.

3854.1 ± 712.2 mg/dL, $* P < 0.05$; 12 weeks, db/db vs. anti-VEGF, 3392.8 ± 522.4 vs. 4043.9 ± 349.4 mg/dL, $* P < 0.05$, Fig. 3).

3. 베타세포의 양적 변화 및 췌도의 형태 변화

췌장의 무게는 비당뇨대조군에 비하여 당뇨대조군과 항 VEGF 처리군에서 췌장무게가 의미있게 감소하였다(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 0.32 ± 0.1 vs. 0.21 ± 0.1 vs. 0.16 ± 0.1 g, $* P < 0.05$ vs. db/dm group) (Fig. 4, Left). 그러나 당뇨대조군과 항 VEGF 처리군 간의 유의한

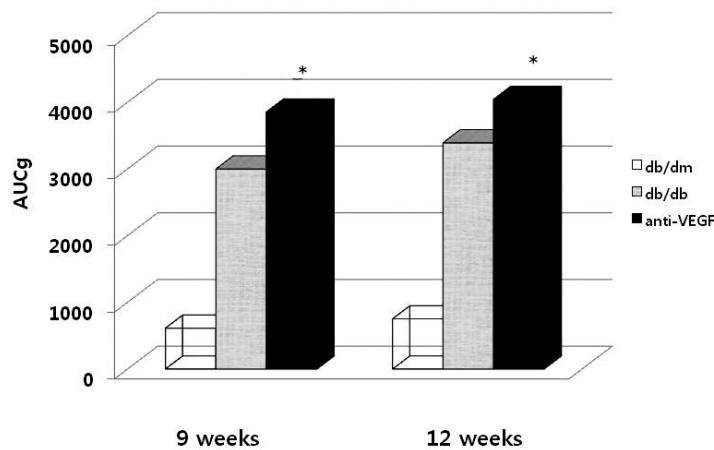


Fig. 3. The area under the curve (AUCg) of the intraperitoneal glucose tolerance test. Compared with the nondiabetic db/dm control group, the diabetic db/db and anti-VEGF-treated mice had significantly elevated AUCg values. Values are means (n = 10 per group). $* P < 0.05$ vs. nondiabetic control (db/dm) and diabetic control (db/db) mice.

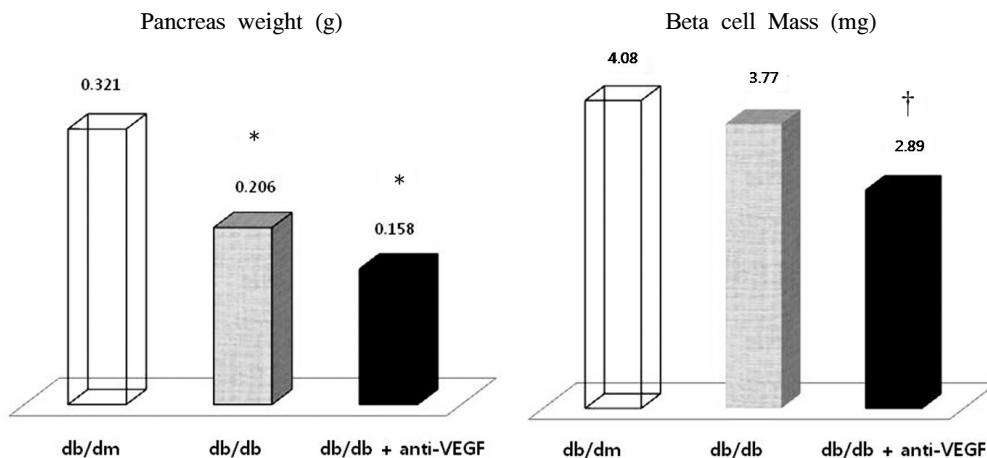


Fig. 4. Mean pancreas masses (left) and beta-cell masses (right) for the experimental groups. Compared with the db/db and db/dm groups, the anti-VEGF-treated group had decreased pancreas and beta-cell masses. Values are means (n = 10 per group). $* P < 0.05$ vs. nondiabetic controls, $† P < 0.05$ vs. diabetic control db/db mice.

차이는 보이지 않았다.

전체 췌장조직 중 베타세포의 상대적 비율값을 췌장의 무게에 곱하여 베타세포 질량을 비교한 결과, 췌장무게 결과와 유사하게 비당뇨대조군에 비하여 당뇨대조군과 항 VEGF 처리군에서 감소하는 경향을 보였다(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 4.08 ± 0.1 vs. 3.77 ± 0.2 vs. 2.89 ± 0.2 mg, $^{\dagger}P < 0.05$ vs. db/db group) (Fig. 4, Right). 특히 항 VEGF군에서 베타세포 질량이 당뇨군에 비해 의미있게 감소하였다. 이는 VEGF의 작용이 베타세포의 양적인 변화와 관련이 있음을 시사하는 결과로 생각되었다.

4. 췌도의 형태적 변화 및 췌도 섬유화

췌도와 베타세포의 형태적 변화를 관찰하기 위해 췌장을 인슐린항체로 면역염색하여 췌도의 변화를 관찰하였다. 정상 대조군에 비해 당뇨대조군과 항 VEGF 치료군 모두에서 심한 췌도 변형, 베타세포 염색면적의 감소, 췌도 내 초자체 양 물질 축적 등의 형태적인 변화가 관찰되었다(Fig. 5A-C). 췌도 변형의 관찰을 위해 췌장 조직을 Trichrome으로 면역

염색을 시행한 결과, 정상 대조군에 비하여 당뇨대조군과 항 VEGF 치료군에서 췌도 내 섬유화가 현저히 증가되었다 (Fig. 5D-F). 췌도 섬유화의 증가는 심한 췌도 변형 및 베타 세포의 양적인 감소와 관련이 있을 것으로 생각되었다.

5. 췌도 내 VEGF 발현

췌도에서 VEGF 단백질 발현을 관찰하기 위해 췌장을 VEGF 항체로 면역염색하여 관찰하였다. 보고된 바와 유사하게 VEGF는 췌도의 가장자리와 일부 혈관 내피세포에서 발현되었으며, 정상 대조군과 비교할 때 당뇨 대조군에서는 발현이 증가 되었으나, 항 VEGF 치료군에서는 감소되었다 (Fig. 6). 고혈당의 정도가 심한 군에서 췌도변형과 췌도 섬유화의 정도가 더 심한 것이 관찰되었는데, 특히 췌도변형이 심한 췌도에서는 VEGF의 발현이 췌도의 가장자리에 국한되지 않고 췌도 내에 불규칙적으로 흩어져 있는 양상을 보였다(Fig. 6C).

각 군에서 췌도 내 VEGF 발현 정도를 양적으로 비교하기 위하여, 전체 췌도 면적 중에서 VEGF로 염색되는 부위

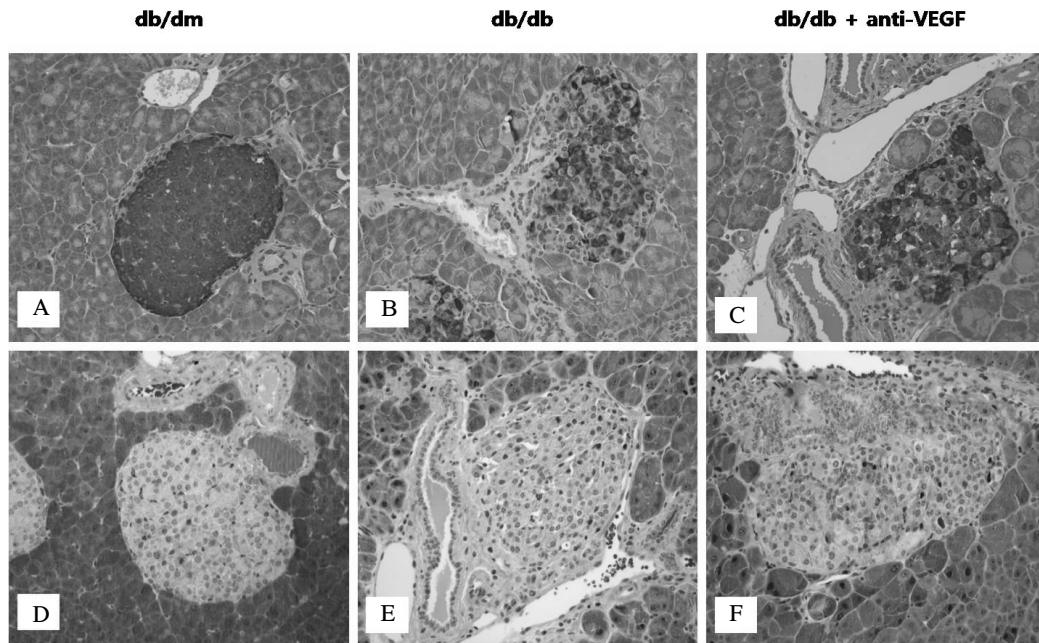


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of pancreatic islets using insulin (A-C) and trichrome (D-F) staining. Sections of paraffin-embedded islets from db/dm (A), db/db (B) and anti-VEGF-treated (C) mice were immunostained with anti-insulin antibody (brown color). Compared with the nondiabetic control group, the pancreatic islet architecture of the db/db (B) and anti-VEGF-treated (C) mice was severely disorganized and the area that stained positively for insulin was decreased ($\times 200$). The lower panel shows islet fibrosis as a blue stain. Compared with the nondiabetic control group (D), islet fibrosis was remarkably increased in both the db/db (E) and anti-VEGF-treated groups (F), which also showed islet destruction. Magnification is $200\times$ that of the original.

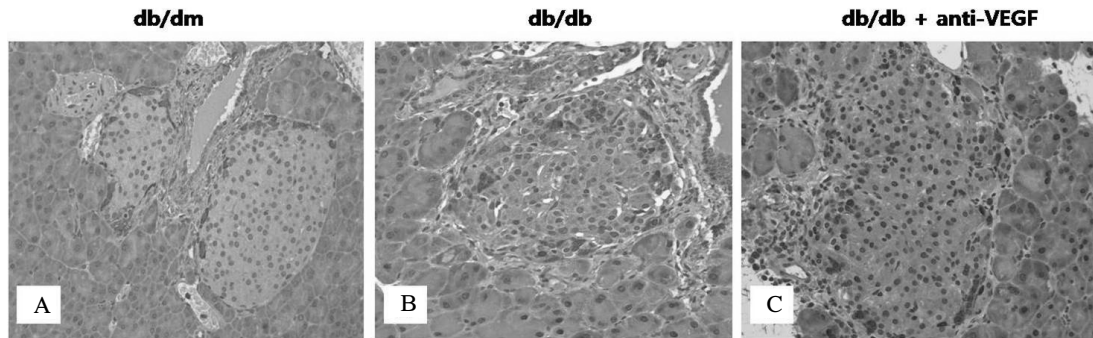


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of pancreatic islets using VEGF staining. Islets were stained with anti-VEGF antibody. VEGF protein (brown color) was expressed mainly in the periphery of the pancreatic islets. VEGF expression in anti-VEGF-treated tissue was significantly decreased. Magnification is 200 \times that of the original.

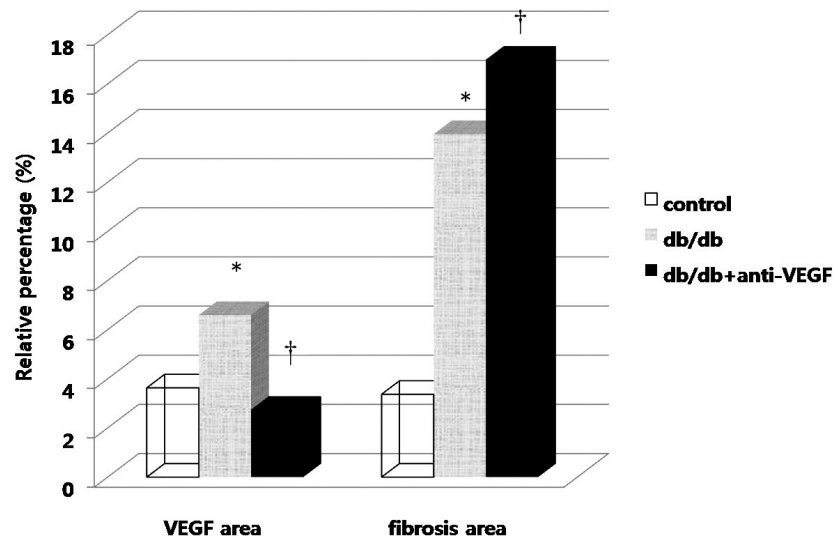


Fig. 7. Relative percentage VEGF expression and area of fibrosis. In anti-VEGF-treated mice, the relative percentage VEGF expression in the islets was decreased and the area of islet fibrosis was remarkably increased compared with the other two groups. * $P < 0.05$ vs. nondiabetic controls; † $P < 0.05$ vs. diabetic control db/db mice. Values are means (%).

를 계산하여 정량하였다. 각 군당 평균 111개의 췌도에서 측정하여 비교한 결과, VEGF 발현은 정상 대조군에 비하여 당뇨 대조군에서 더 증가되었으나, 항 VEGF 치료군에서 가장 감소되어 있었다(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 3.63 ± 2.86 vs. 6.60 ± 3.56 vs. $2.74 \pm 1.55\%$, * $P < 0.05$) (Fig. 7, left).

췌도 전체 면적 중에서 섬유화된 부분을 같은 방법으로 각 군 당 평균 140개 췌도에서 계산한 결과, 정상 대조군에 비해 당뇨 대조군과 항 VEGF 치료군에서 췌도 섬유화가 현저하게 증가되어 있었으며, 당뇨 대조군보다 항 VEGF 치료군에서의 췌도 섬유화가 더 진행된 양상을 보였다

(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 3.37 ± 1.51 vs. 13.96 ± 3.20 vs. $16.99 \pm 4.96\%$, * $P < 0.05$) (Fig. 7, Right).

6. BS-1 발현

항 VEGF 투여로 인한 췌도변화 과정에서 혈관증식과의 관련 여부를 알기위해 췌장 조직을 혈관내피세포 표지자인 BS-1로 면역염색을 시행하였다. 췌도 내 BS-1의 발현은 정상 대조군에 비하여 당뇨 대조군 췌도에서 증가되어 있었으나, 항 VEGF 투여군에서 현저하게 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 8A). BS-1의 발현정도를 각 군에서 정량했을 때

도 일치하는 결과를 보였다(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 0.89 vs. 1.79 vs. 1.13%, * $P < 0.05$ vs. non-diabetic controls; † $P < 0.05$ vs. diabetic control db/db mice) (Fig. 8B).

7. In Situ Hybridization Analysis

In situ hybridization법을 이용하여 VEGF수용체가 췌장 내 존재하는지 확인하였다. 이미 알려진 바와 같이 VEGF

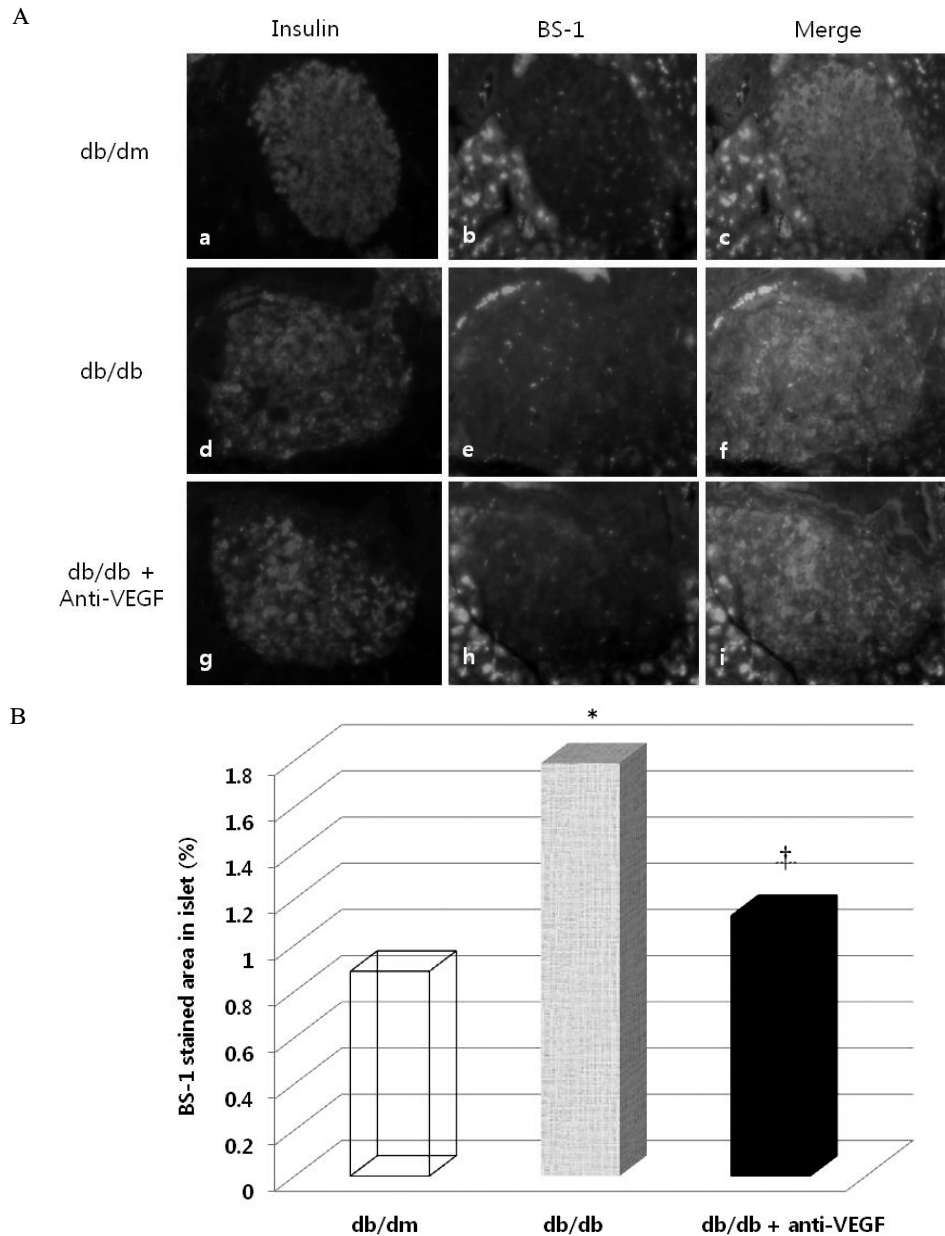


Fig. 8. (A) Visualization of vascular endothelial cells in the islets of db/dm (a-c), db/db (d-e) and anti-VEGF-treated (g-i) mice using immunohistochemical staining for BS-1 in islets. Co-staining for insulin (red), BS-1 (green) and DAPI (blue) are shown. Merged images are shown in c, f and i. BS-1 stained cells in the islets are evident as bright green dots (b, e, h). BS-1 expression was remarkably decreased in the anti-VEGF-treated group (h). Magnification is 200× that of the original. (B) Quantification of BS-1-positive cell numbers in islets of individual groups. Each bar represents counts from 10 to 15 sections from 10 mice per group. * $P < 0.05$ vs. nondiabetic controls; † $P < 0.05$ vs. diabetic control db/db mice. Values are means.

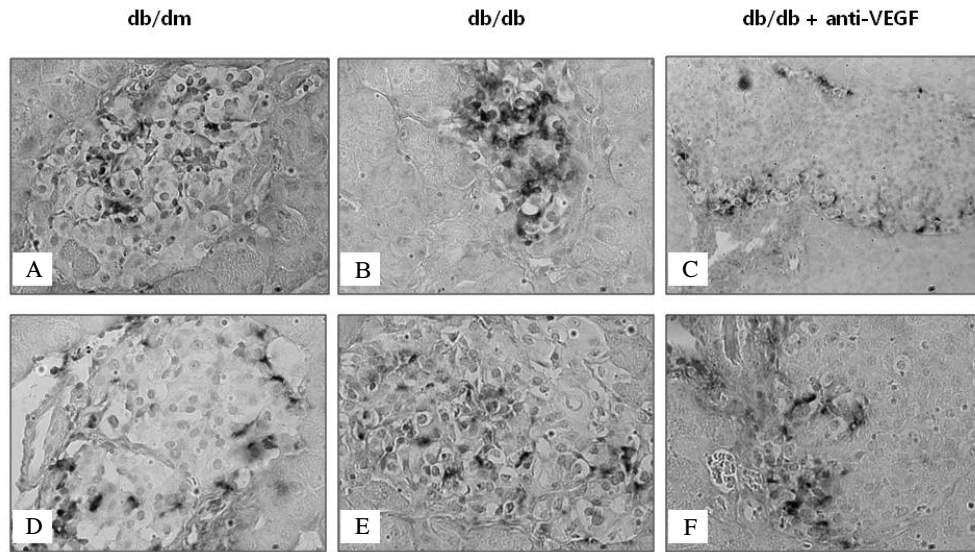


Fig. 9. In situ hybridization analysis of VEGF-R1 (A-C) and VEGF-R2 (D-F) expression in pancreatic islets. Both VEGF receptors were expressed in the pancreatic islets of all experimental groups, and at a lower level in exocrine tissue. In addition to VEGF R1, VEGF R2 expression was also decreased in the anti-VEGF-treated group (C, F). The magnification in A-F is 200 \times .

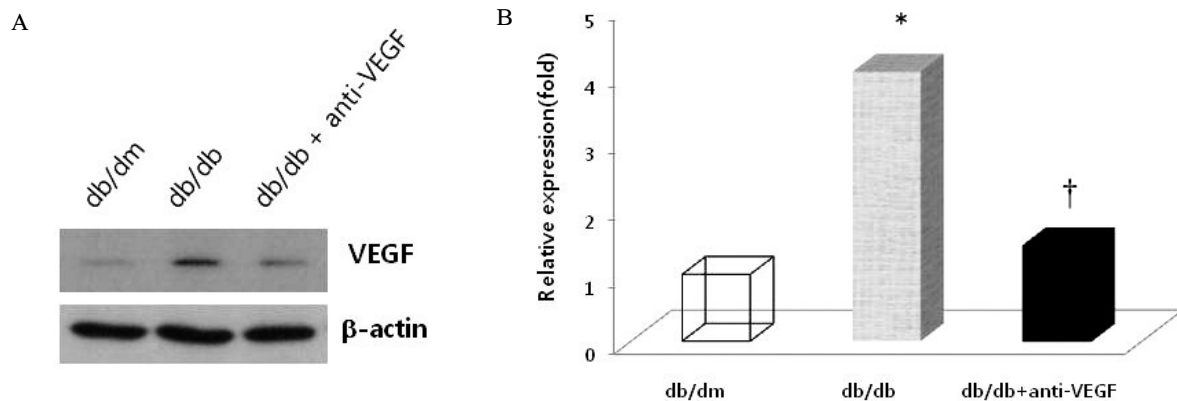


Fig. 10. Expression of VEGF in isolated islets from db/dm, db/db, and anti-VEGF-treated mice (A). VEGF expression was remarkably increased in the islets of db/db mice (* $P < 0.05$ vs. nondiabetic controls), but was decreased in the islets of VEGF-treated mice († $P < 0.05$ vs. diabetic control db/db mice) (B). Values are means.

Receptor-1 (Fig. 9 A-C), VEGF Receptor-2 (Fig. 9 D-F) 모두 exocrine tissue 보다는 주로 islet 내에서 관찰되었다.

8. 분리한 췌도에서 VEGF 발현

각 실험군에서 췌도를 분리한 후 VEGF 발현 여부를 Western blot으로 비교할 때, db/dm군보다 db/db군에서 VEGF 발현이 증가되었으며, 항 VEGF 펩타이드 투여 시 VEGF 발현이 감소하였다(Fig. 10).

고 찰

본 연구에서 당뇨병 동물모델에서 당뇨병 발생 이전에 항 VEGF를 투여하여 췌도의 형태적인 변화를 관찰하였다. 항 VEGF peptide의 투여로 췌도 내 혈관세포의 증식을 억제한 결과 췌도 내 VEGF 발현 및 내피세포 증식의 감소로 인하여 췌도 내 베타세포의 증가와 췌도 팽창을 억제하여 고혈당 상태가 더 심하였으며, 이에 따른 췌도 섬유화가 더

악화되는 결과를 관찰하였다.

췌도는 밀집된 모세혈관망을 가지고 있으며 정확한 혈당 감지(glucose sensing)와 정상 혈당을 조절하기 위한 혈중 인슐린을 조절하기 위하여 췌도 내 베타세포와 혈관 사이의 상호작용이 중요한 역할을 한다. 정상적으로는 태생기의 췌장 발생단계에서 베타세포가 췌도를 형성하는 동안 VEGF 발현이 증가되어 VEGFR-2를 발현하는 내피세포를 끌어들이 췌도 내 혈관망을 형성한다^{8,12}. VEGF-A가 결핍된 마우스에서 췌도 혈관망의 감소, 췌도의 베타세포에서 인슐린 분비능과 인슐린 mRNA 의 발현이 감소되어 있는 점은 이런 사실을 뒷받침한다²⁰.

VEGF는 혈관에 대한 강력한 작용을 나타내어 혈관확장, 혈관투과성을 증가시키고 혈관내피세포의 강력한 유발인자로서, 혈관내피세포에 위치한 tyrosine kinase domain을 가진 2개의 high affinity receptor 에 결합한다. VEGF에 대한 친화도(affinity)는 VEGFR-1이 VEGFR-2 보다 10배 이상 높지만 tyrosine kinase activity는 VEGFR-2가 10배 이상 높기 때문에 VEGFR-2가 VEGF 신호전달의 주된 매개체로 알려져 있다^{21,22}. VEGF 수용체 중 VEGFR-2가 췌관 세포나 췌도 내 혈관내피세포에 더 많이 분포한다.

당뇨병 모델에서 VEGF의 역할은 주로 당뇨병성 합병증을 중심으로 연구되어왔다. Streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 쥐와 당뇨병 동물모델인 db/db mouse에서 VEGF 항체를 투여하여 당뇨병성 신증의 발생 및 진행을 감소시킨 결과가 보고되었다^{1,2}. 또한 VEGF가 당뇨병성 망막병증의 발생기전에도 연관이 있으며, 항 VEGF 항체 투여 시 신생 혈관을 50% 정도 감소효과를 보였다³. 그러나 VEGF가 직접적으로 췌장에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 많지 않다.

VEGF의 췌장에 대한 효과는 주로 췌도이식 연구를 통해 이루어졌다. 췌도분리 과정 중 저산소 손상이 필연적으로 유발되는데 VEGF는 저산소에 의해 유도되는 가장 강력한 인자로서^{23,24}, 분리된 췌도 또는 저산소 조건에서 배양된 췌도에서 VEGF 발현이 증가되어 있었다⁴. 그러나 당뇨병 동물모델에서 췌도 및 베타세포에 대한 VEGF의 영향에 대하여는 밝혀진 바가 적다. 정상 췌도에서 VEGF와 VEGF 수용체인 flk-1, flt-1이 발현되고, VEGF 수용체의 mRNA나 단백질이 내피세포에서 발견되는 점, ZDF 쥐의 췌도를 고농도 포도당 배양 시 VEGF 발현이 증가하는 점 등이 당뇨병과 VEGF 발현과의 관련성을 시사하고 있다²⁵.

당뇨병 발생 시, 고혈당을 극복하기 위해서는 췌도 내 베타세포가 충분한 양의 인슐린을 생산할 수 있도록 증식해야

하는데, 베타세포의 충분한 증식을 위해서는 췌도 내 혈관의 발달이 필수적이다. 인슐린저항성 환경에서 베타세포로부터의 신호를 통해 혈관 팽창이 자극되어 고혈당 발생 전에 췌도 내 미세혈관의 변화, 조직 내 VEGF mRNA 발현의 증가가 선행되고, 고혈당 발생 시 베타세포와 혈관망의 손상 및 췌도 혈관 내피세포의 파괴가 이미 관찰된다²⁵. 췌도 내 혈관세포도 베타세포와 마찬가지로 초기에 hyperplasia를 보이다가 이후 궁극적으로는 내피세포가 소실되는 이상성 형태(biphasic pattern)을 보인다. 즉 인슐린저항성에 대한 췌도 증식(islet hyperplasia)은 내피세포의 증식과 관련이 있다. 이때 내피세포에서 VEGF의 발현의 증가가 췌도 증식에도 중요한 역할을 한다. Johansson 등의 보고에 의하면, 임신한 쥐에서 임신 중 베타세포 질량이 증가하는데, 내피세포의 증식(proliferation)과 내분비세포의 증식(endocrine proliferation)이 비례하였다²⁶. 한편 Kakizawa 등은 당뇨병 환자에서 혈중 VEGF 농도가 증가되어 있으며 혈당이 높을수록 증가하고 혈당을 조절한 후에 VEGF 농도가 감소하므로, VEGF를 감소시키는 치료법이 당뇨병성 합병증의 예방에 도움이 될 것이라고 추정하였다²⁷.

본 연구에서는 제2형 당뇨병 동물모델에 당뇨병 발생 이전부터 12주간 항 VEGF를 투여하여 고혈당이 진행되는 동안 VEGF의 작용을 억제하였으며, 그 결과 항 VEGF 투여군에서 고혈당의 정도가 더 심하였고 베타세포 질량이 더 감소하였으며 췌도 변형 및 췌도 섬유화의 정도가 더 심하였다. 또한 항 VEGF 투여군에서 VEGF 단백질 발현이 감소하였으며 췌도 섬유화가 심할수록 발현의 정도는 더 감소하였다. 내피세포의 표지자인 BS-1의 발현 역시 VEGF 발현과 비슷한 양상을 보였다. 실험동물의 일부에서 췌도를 분리하여 In vitro에서 고농도 포도당에 노출시킨 후 VEGF 단백질 발현을 관찰한 결과에서도 역시 당뇨군에서 VEGF 발현이 정상군에 비하여 증가되었으나 항 VEGF 투여 시 감소되었다. 따라서 당뇨병 발생 시 혈관세포의 증식이 고혈당에 대한 췌도의 보상기전에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 항 VEGF 처리 후 VEGF 수용체 이하 세포 내 신호전달 체계에 관련된 단백질 아닌 VEGF 자체의 감소에 대하여 고려해 볼 점은, VEGF가 췌도 내 내분비세포와 혈관에 주로 분포한다고 볼 때 항 VEGF 투여군의 췌도에서 투여하지 않은 당뇨군에 비해 심한 고혈당을 보이면서 췌도 섬유화가 더 심하여 췌도가 fibrosis 조직으로 대체된 부분이 많았고, BS-1 염색을 통해 관찰한 내피세포의 증식이 더 감소되었으므로, VEGF가 발현될 세포 자체가 항 VEGF군에서 더 줄었을 가능성과, 항

VEGF가 VEGF와 결합하여 VEGF 분석 과정에서 VEGF를 탐색하는 부위를 차단하여 상대적으로 VEGF 발현이 감소된 것처럼 보일 가능성도 고려해 볼 수 있으나, 이에 대하여는 추가 연구가 필요할 것이다.

분리한 췌도에서 내피세포의 증식을 관찰한 연구들을 보면, 배양액에 VEGF를 첨가한 경우 췌도 내 혈관신생(cords per islets)이 증가되었고 또한 고혈당에 노출 시에도 신생혈관의 평균 길이(mean cord length)가 43% 정도 증가하였다²⁸⁾. 반면에, VEGF 수용체 tyrosine kinase를 억제하는 AG-013736 (VEGFR-1, 2 모두 억제), soluble VEGFR-1과 soluble VEGFR-2 (즉 VEGFR 1, 2 각각의 리간드 결합을 억제)를 투여한 실험에서는 각각 intra-islet microvasculature의 60%, 54%, 14%가 감소하였다⁹⁾. 내피세포에 대한 고혈당 자극은 저산소 손상과 유사한 결과를 유도하는데, 활성 산소종의 미토콘드리아 내 과다 생성과 성장인자 자극으로 혈관확장인자의 분비를 일으켜 혈관 누출(leakage)을 증가시키는 효과를 나타낸다고 한다²⁹⁾. 따라서 당뇨병 모델에서 고혈당 상태를 극복하기 위한 충분한 양의 베타세포 증식을 위해서는 췌도 내 혈관의 신생 증식과 함께 VEGF도 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

당뇨병 모델에서 고혈당에 의한 산화물질(oxidants), 당화산물(glycation products), PKC- β 동종형 활성도의 증가 등을 통해 VEGF 발현이 조절된다고 추정하고 있다³⁰⁻³²⁾. 저산소 상태가 가장 강력한 VEGF유발인자이기는 하나 짧은 기간 동안 조직 내 저산소증의 증거가 없으므로 이는 주된 요인으로 보기는 어렵다는 것이 공통된 의견이다.

항 VEGF 작용을 임상적인 측면에서 보면, 당뇨병성 합병증 중 당뇨병성 망막증은 VEGF가 중요한 병인으로 알려져 있기 때문에 당뇨병성 망막증의 치료 목적으로 VEGF의 작용을 억제하는 치료가 시도되었는데 VEGF 전사억제제(bevasiranib), 세포 외 VEGF 억제제(pegaptanib), VEGF 수용체 억제제(aflibercept, VEGF-TRAP)나 VEGF의 세포 내 신호전달 기전 억제제(midostaurin) 등이 있다^{33,34)}. 따라서 당뇨병성 합병증이나 종양의 치료 목적으로 VEGF의 작용을 차단하는 약제의 전신투여는 이미 알려진 고혈압이나 동맥혈전증(arterial thromboembolic event) 등의 심각한 부작용 이외에도 췌장 자체에 대한 영향을 염두에 두어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 제2형 당뇨병 동물모델에서 혈관내피세포 성장인자(VEGF)는 정상 췌도보다 당뇨병이 발생한 췌도에서 발현이 증가되므로 당뇨병의 발병 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 베타세포의 증식 및 췌도 변형에 중요한

역할을 하므로 당뇨병의 치료에도 응용할 수 있을 것이다. 그러나 당뇨병성 미세혈관 합병증의 치료나 예방을 목적으로 제2형 당뇨병 모델에 항 VEGF를 투여할 경우 고혈당 상태를 더 악화시키고 베타세포 증식을 억제하며 췌도 파괴를 가속화 시키므로, 당뇨병성 합병증을 치료하기 위한 목적으로 항 VEGF를 투여할 경우 이에 대한 충분한 고려가 필요할 것이다.

요 약

연구배경: 대표적인 당뇨병성 합병증인 당뇨병성 신증과 망막병증은 공통적으로 혈관내피세포성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)가 합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것이 알려져 있으나 항 VEGF 치료가 췌도나 베타세포에 직접적으로 어떠한 영향을 주는지는 거의 알려진 바가 없다. 이에 당뇨병성 합병증 치료를 목적으로 하는 항 VEGF 치료가 췌장과 당뇨병의 경과에 미치는 영향을 관찰하고, 당뇨병이 진행되면서 나타나는 췌도 및 베타세포의 변화에 있어서 VEGF의 역할을 규명하고 치료에 응용하고자 하였다.

방법: 이에 당뇨병 동물모델인 db/db mouse에 12주간 VEGF 수용체 type 2 antagonist (ATWLPFR, 5 mg/kg)를 복강 내 투여하여 혈당의 변화와 함께 췌장의 면역염색을 통하여 베타세포 질량 및 췌도의 형태적인 변화를 관찰하고 VEGF의 췌도 내 발현 및 혈관신생 정도를 평가하였다.

결과: 12주간 항 VEGF peptide를 투여한 결과, 복강 내 당부하검사 시 db/db mouse에 비해 항 VEGF 투여군에서 현저한 고혈당을 보였으며 고혈당이 심해지면서 항 VEGF 투여군에서 체중의 증가가 적었다. 췌장의 무게(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 0.321 ± 0.05 vs. 0.206 ± 0.13 vs. 0.158 ± 0.12 g) 및 베타세포 질량(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 4.08 ± 0.1 vs. 3.77 ± 0.2 vs. 2.89 ± 0.2 mg, $P < 0.05$) 역시 db/db군에 비해 항 VEGF 군에서 더 감소되었다. 또한 정상 췌도에 비해 당뇨병이 발생한 군에서 췌도 내 VEGF 발현이 증가되었으나, 항 VEGF 투여시 췌도 내 VEGF 단백질의 발현이 감소하였고(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 3.63 ± 2.86 vs. 6.60 ± 3.56 vs. $2.74 \pm 1.55\%$, $* P < 0.05$) 췌도의 크기가 감소하였으며, 췌도 내 섬유화 진행이 더 심하게 관찰되었고(db/dm vs. db/db vs. anti-VEGF group, 3.37 ± 1.51 vs. 13.96 ± 3.20 vs. $16.99 \pm 4.96\%$, $* P < 0.05$) 췌도 내 내피세포의 증식이 더 감소되어 있었다.

결론: 제2형 당뇨병 동물모델에서 혈관내피세포 성장인자(VEGF)는 정상 췌도보다 당뇨병이 발생한 췌도에서 발현이 증가되므로 당뇨병의 발병 기전과 관련이 있을 것이며, 베타세포의 증식 및 췌도 변형에 중요한 역할을 하므로 당뇨병의 치료에도 응용할 수 있을 것으로 생각되고, 당뇨병성 미세혈관 합병증의 치료나 예방을 목적으로 제2형 당뇨병모델에 항 VEGF를 투여할 경우 고혈당 상태를 더 악화시키고 베타세포 증식을 억제하며 췌도 파괴를 가속화 시키므로, 항 VEGF 치료 시 이에 대한 충분한 고려가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Flyvbjerg A, Dagnaes-Hansen F, De Vriese AS, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R: *Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. Diabetes* 51:3090-4, 2002
2. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH: *Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. J Am Soc Nephrol* 12:993-1000, 2001
3. Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, Penary M, Clamens S, Malecaze F, Plouet J: *Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3393-400, 1994
4. Vasir B, Jonas JC, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: *Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. Transplantation* 71:924-35, 2001
5. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, Zhang H, Song K, Meseck M, Bromberg J, Dong H: *Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. Diabetes* 53:963-70, 2004
6. Stagner J, Mokshagundam S, Wyler K, Samols E, Rilo H, Stagner M, Parthasarathy L, Parthasarathy R: *Beta-cell sparing in transplanted islets by vascular endothelial growth factor. Transplant Proc* 36:1178-80, 2004
7. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med* 9:777-94, 2005
8. Konstantinova I, Lammert E: *Microvascular development: learning from pancreatic islets. Bioessays* 26:1069-75, 2004
9. Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norberg SM, O'Brien SM, Davis RB, Gowen LC, Anderson KD, Thurston G, Joho S, Springer ML, Kuo CJ, McDonald DM: *VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H560-76, 2006
10. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: *The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res* 65:550-63, 2005
11. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA: *Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. Curr Biol* 13:1070-4, 2000
12. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, Fässler R, Gu G, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA, Lammert E: *The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. Dev Cell* 10:397-405, 2006
13. Christofori G, Naik P, Hanahan D: *Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. Mol Endocrinol* 9:1760-70, 1995
14. Binétruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouët J, Derbin C, Perret G, Mazié JC: *Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth Factor (VEGF)-mediated angiogenesis. EMBO J* 19:1525-33, 2000
15. Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, Rousseau B, Hagedorn M, Costa F, Caronzolo D, Balke M, Canron X, Convert O, Lähn G, Gionnet K, Goncalves M, Bayle M, Bello L, Chassaing G, Deleris G, Bikfalvi A: *Structure and inhibitory effects on angiogenesis*

- and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem* 278:35564-73, 2003
16. Weibel ER: *Stereologic methods. In practical Methods for Biologic Morphometry. Vol. 1, London, Academic Press* 101-61, 1978
 17. Mattsson G: *The endothelial cells in islets of langerhans. Ups J Med Sci* 110:1-15, 2005
 18. Lacy PE, Kostianovsky M: *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes* 16:35 -39, 1967
 19. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP: *Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. Transplantation* 43:725-30, 1987
 20. Iwashita N, Uchida T, Choi JB, Azuma K, Ogihara T, Ferrara N, Gerber H, Kawamori R, Inoue M, Watada H: *Impaired insulin secretion in vivo but enhanced insulin secretion from isolated islets in pancreatic beta cell-specific vascular endothelial growth factor-A knock-out mice. Diabetologia* 50:380-9, 2007
 21. Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S: *Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. Cytokine Growth Factor Rev* 15:297-324, 2004
 22. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L: *VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci* 28:488-94, 2003
 23. Ferrara N, Davis-Smyth T: *The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev* 18:4-25, 1997
 24. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J* 13:9-22, 1999
 25. Li X, Zhang L, Meshinchi S, Dias-Leme C, Raffin D, Johnson JD, Treutelaar MK, Burant CF: *Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. Diabetes* 55:2965-73, 2006
 26. Johansson M, Mattsson G, Andersson A, Jansson L, Carlsson PO: *Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats. Endocrinology* 147:2315-24, 2006
 27. Kakizawa H, Itoh M, Itoh Y, Imamura S, Ishiwata Y, Matsumoto T, Yamamoto K, Kato T, Ono Y, Nagata M, Hayakawa N, Suzuki A, Goto Y, Oda N: *The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients. Metabolism* 53: 550-5, 2004
 28. Linn T, Schneider K, Hammes HP, Preissner KT, Brandhorst H, Morgenstern E, Kiefer F, Bretzel RG: *Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. FASEB J* 17:881-3, 2003
 29. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G: *Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. Diabetes* 47:401-6, 1998
 30. Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP: *Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. J Clin Invest* 1:1219-24, 1998
 31. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT, Adamis AP: *Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. J Clin Invest* 98:1667-75, 1996
 32. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL: *Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC-b inhibitor. Science* 272:728-31, 1996
 33. Pieramici DJ, Rabena MD: *Anti-VEGF therapy: comparison of current and future agents. Eye* 22:1330-6, 2008
 34. Nagpal M, Nagpal K, Nagpal PN: *A comparative debate on the various anti-vascular endothelial growth factor drugs: pegaptanib sodium (Macugen), ranibizumab (Lucentis) and bevacizumab (Avastin). Indian J Ophthalmol.* 55:437-9, 2007