

당뇨 쥐에서 Vitamin B6 (PLP)의 망막혈관누출 감소와 혈관내피성장인자의 억제 효과

홍인환¹ · 유형곤^{2,3} · 박성표¹

한림대학교 의과대학 안과학교실¹, 서울대학교 의과대학 안과학교실², 서울대학교병원 임상의학연구소 서울인공안구센터³

목적: STZ로 유발된 당뇨 쥐에서 Pyridoxal 5' phosphate (PLP)가 당뇨망막병증에 미치는 영향을 알아보고자 했다.

대상과 방법: Sprague-Dawley 흰쥐(n=20)를 대상으로 하여 정상군 2마리를 제외한 18마리에서 당뇨를 유발시키고, 그 중 10마리에 PLP를 투여하였다. PLP를 투여한 군 중 5마리에는 PLP 5 µg을, 5마리에는 50 µg를 각각 나누어서 투여하였다. PLP투여 3주 후 혈액 내 호모시스테인 농도와 유리체 내 플루레신 농도를 측정하고 안구를 적출하였다. 적출된 안구로 절편을 제작하여 혈관내피성장인자에 대한 면역조직화학염색을 시행하였고, 발현 양상을 비교하였다.

결과: 실험군에서의 호모시스테인과 플루레신 농도가 대조군에 비해서 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.01$). 혈관내피성장인자의 발현도 실험군의 망막에서 발현이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다. PLP의 투여 농도 변화에 대한 실험 결과에서는 유의한 상관관계를 보이지 않았다($p > 0.05$).

결론: STZ로 유발된 당뇨 쥐에서 PLP의 투여는 망막 혈관 누출과 혈관내피성장인자의 발현을 억제하는 효과가 있다.

〈대한안과학회지 2012;53(5):700-706〉

성인 실명의 가장 흔한 원인 질환 중 하나인 당뇨망막병증은 당뇨병에서 흔하게 일어나는 미세 혈관 합병증 중 하나로 당뇨 환자들의 유병기간이 길어지면서 중요한 문제로 대두되고 있다.^{1,2} 당뇨망막병증은 미세혈관류의 생성이나 망막혈액장벽의 붕괴와 같은 혈액학적 변화와 고혈당과 관련된 생화학적 변화, 그리고 호르몬 영향 및 유전적 요소 등과 같은 복합적인 요소들에 의한 것으로 생각되고 있다.³⁻⁵ 이러한 병태생리와 관련하여 기존에 알려진 위험인자인 당뇨의 유병기간, 고혈당, 고혈압 외에도 C-reactive protein (CRP)와 같은 염증수치, 혈액응고를 나타내는 지표인 섬유소원 수치 그리고 고호모시스테인 혈증 등이 새로운 위험인자로 대두되고 있다.⁶⁻⁸

최근의 연구에 의하면 당뇨 환자에서의 엄격한 혈당 조절은 당뇨망막병증의 진행과 발생의 예방에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.⁹ 하지만 엄격한 혈당 조절 자체의 어려움과 저혈당의 위험으로 최근에는 PKC (protein kinase C) 억제제, 항산화제, COX-2 (cyclooxygenase 2) 억제제, 스타틴(statins) 등이 당뇨망막병증의 치료제로 연

구되고 있다.^{10,11} 이 중, 항산화제인 Vitamin E는 당뇨와 관련된 망막혈류장애를 개선시키고 Vitamin C와의 조합으로 모세혈관세포의 괴사를 막는 것으로 밝혀졌고,¹² Vaccinium myrtillus라는 식물에서 추출된 물질인 anthocyanoside 또한, 항산화 기능을 통해 당뇨망막병증의 진행을 억제한다고 알려져 있다.¹³ 그리고 실험적으로 유도된 당뇨유발 쥐 망막에서 리보산은 신생혈관 증식에 관여하는 것으로 알려진 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth, VEGF)의 증가를 억제시킨 보고도 있었다.¹⁴

Vitamin B6는 피리독신(pyridoxine), 피리독살(pyridoxal), 피리독사민(pyridoxamine) 및 이들의 인산에스테르로 이들은 아미노산, 핵산, 지방과 글리코겐의 대사에 관여하고 vitamin B6의 결핍이 고혈당의 유발과 순환 인슐린의 감소와 연관이 있다고 알려져 있다.¹⁵ 실제로 동물 실험과 임상 시험을 통한 연구에서 Vitamin B6가 당뇨병 치료에 도움을 주며, 호모시스테인(homocysteine)을 분해해 당뇨로 인해 생길 수 있는 혈관 합병증의 예방에 도움이 되는 것이 밝혀졌다.^{16,17} 이에 저자들은 실험적으로 유발된 당뇨 쥐에서 Vitamin B6의 활성화 조효소인 pyridoxal 5' phosphate (PLP)가 당뇨병의 발생과 당뇨망막병증의 진행에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

■ 접수 일: 2011년 4월 25일 ■ 심사통과일: 2011년 8월 31일
■ 게재허가일: 2012년 4월 7일

■ 책임저자: 박 성 표

서울시 강동구 성안로 150
한림대학교 강동성심병원 안과
Tel: 02-2224-2274, Fax: 02-470-2088
E-mail: sungpyo@hanafos.com

대상과 방법

실험용 쥐에서 당뇨 유도

7주령, 180–230 gm 전후의 수컷 Sprague–Dawley 흰 쥐(n=20)를 사용하였다. 당뇨 유발은 streptozotocin (STZ, Sigma, USA) 70 mg/kg을 복강 내에 주사하여 당뇨를 유발하였으며, 당뇨병 유도 3일 후에 꼬리의 정맥혈을 채취하여 공복 시 혈당이 300 mg/dl 이상인 경우를 당뇨로 정의하였다. 흰쥐는 각각 당뇨를 유발시키지 않은 정상군(control group) 2마리와 STZ 투여로 당뇨를 유발시킨 당뇨군(DM group) 3마리, 같은 방법으로 당뇨를 유발한 후 PLP 5 µg/200 gm를 투여한 군(normal dose group) 5마리, PLP 50 µg/200 gm를 투여한 군(high dose group) 5마리 그리고 식염수 1.0 ml를 투여한(placebo group) 5마리로 나누었다. PLP는 당뇨 유도 후 2주 후부터 이틀에 한 번씩 복강 내로 투여하고, 1주일에 1회씩 혈당과 체중을 측정하였다. PLP 투여 후 3주 후 혈액 내 호모시스테인을 측정하였으며, 당뇨가 유발된 것을 확인하고 5주 후에 안구를 적출하였다. 모든 실험은 본원의 동물윤리위원회의 규정을 준수하였다.

유리체 내의 플루레신 농도 분석

PLP 투여 후 3주째 vitreous fluorophotometry (VF)를 사용하여 당뇨 쥐의 유리체 내의 플루레신 농도를 측정하였다. VF는 fluorophotometer (Fluorotron Master)를 사용하였고 쥐에게 맞게 특수 제작된 lens (Coherent)가 이용되었다. 모든 당뇨 쥐는 시술 전 xylazine hydrochloride

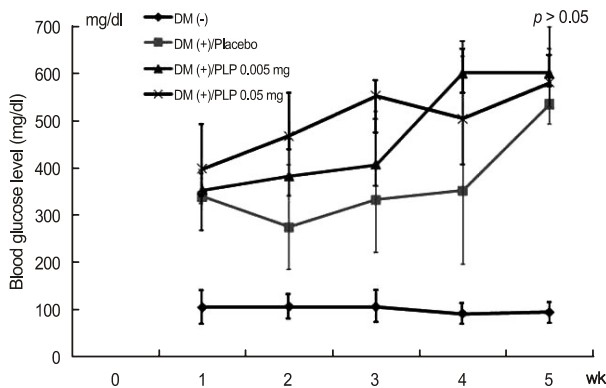


Figure 1. Normal and high dose pyridoxal 5'-phosphate-treated group shows no significant decrease in the blood glucose level compared to placebo-treated group ($p > 0.05$, chi-square test). DM = diabetes mellitus; PLP = pyridoxal 5'-phosphate.

(Rompun, 13 mg/kg)과 ketamine hydrochloride (87 mg/kg)을 근주하여 마취를 시행하였고, 동공 산동을 위해 2.5% phenylephrine (Mydrinfin)과 1% cyclopentolate hydrochloride (Cyclogyl)이 사용되었고 각막 보호를 위해 NaCl 0.9% 용액을 사용하였다. VF는 꼬리 정맥을 통해 2% fluorescein-Na (14 mg/kg)를 투여 후 1시간 뒤에 측정되었다.

면역조직화학 염색을 통한 조직 내 발현 조사

각 실험군에서 적출한 안구를 4% paraformaldehyde 용액에 12시간 고정시켰으며 파라핀 포매하였다. 포매된 조직을 5 µm로 절편한 뒤 xylene으로 파라핀을 제거하였고 단계적으로 에탄올에 처리한 후에 증류수로 함수시켰다. 단백질 차단제에 15분간 반응시킨 후, 내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3% 과산화수소용액에 10분간 처리한 후 phosphate-buffered saline (PBS)으로 5분간 세척하였다. 1:250으로 희석한 VEGF에 대한 일차항체 (VEGF147: sc-507 rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA)에 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 horseradish peroxidase kit (DAKO LSAB 2 System, HRP Kit cat no.K0675, Carpinteria, CA, USA)로 30분간 반응시켰다. PBS로 세척한 후 DAB-chromogen (Zymed cat no.00-2020 DAB substrate kit, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 적색으로 발색시키고 대조 염색을 하기 위해 0.5% methyl green에 3분간 반응시키고 광학 현미경을 통해 관찰하였다.

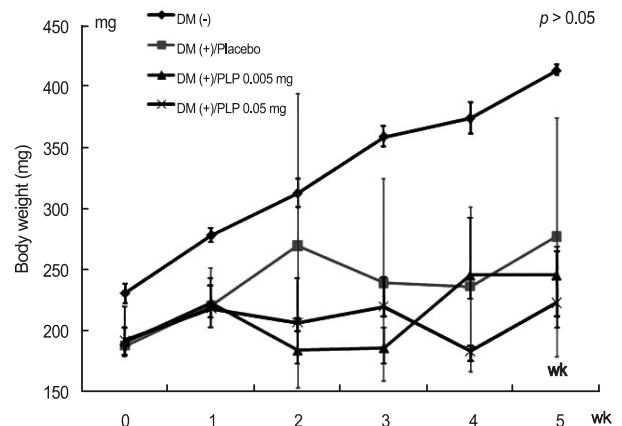


Figure 2. Normal and high dose pyridoxal 5'-phosphate-treated group shows poor body weight gain compared to the normal control and showed no difference compared to placebo-treated group ($p > 0.05$, chi-square test). DM = diabetes mellitus; PLP = pyridoxal 5'-phosphate.

결 과

혈당과 체중

5주 동안의 실험 기간 중 각 군의 혈당 변화는 Figure 1과 같았다. PLP를 투여한 군에서 PLP를 투여하지 않은 군을 비교했을 때, 통계적으로 유의한 혈당 감소는 보이지 않았다($p > 0.05$, chi-square test). 5주간 측정된 체중에서는 당뇨를 유발시키지 않은 군에 비해 PLP를 투여한 군에서 체중이 낮게 측정되었으나 투여하지 않은 군과의 비교에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$, chi-square test) (Fig. 2).

혈액 내 호모시스테인

PLP를 투여하지 않은 군과 PLP를 투여한 군에서 혈액 내 호모시스테인 농도를 비교했을 때, PLP를 투여한 군에

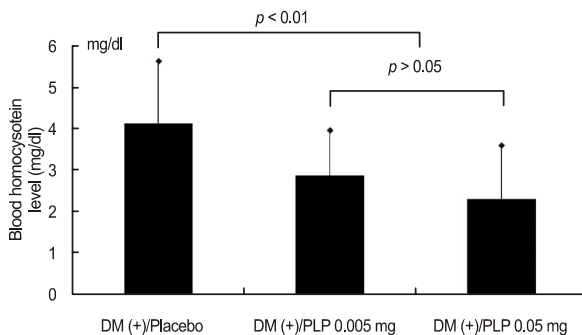


Figure 3. Normal and high dose pyridoxal 5'-phosphate-treated group shows lower blood homocysteine level than that of the placebo-treated group (Mann-Whitney *U* test). DM = diabetes mellitus; PLP = pyridoxal 5'-phosphate.

서 유의하게 호모시스테인 농도가 감소되어 있었다($p < 0.01$, Mann-Whitney *U* test) 50 μ g/200 gm을 투여한 군 (high dose group)에서 5 μ g/200 gm을 투여한 군(normal dose group)에 비해 호모시스테인 농도가 약간 감소되었으나, 통계적으로 유의하지 않았다($p > 0.05$, Mann-Whitney *U* test) (Fig. 3)

유리체내의 플루레신 농도

VF를 사용한 망막 혈관에서의 플루레신의 유출을 비교해보면, PLP를 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해서 통계적으로 유의하게 유출이 감소되어 있는 결과를 보였다($p < 0.01$, Mann-Whitney *U* test) (Fig. 4). 하지만 PLP의 농도를 다르게 한, 두 군 사이에서의 유리체 내 플루레신 농도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$, Mann-Whitney *U* test).

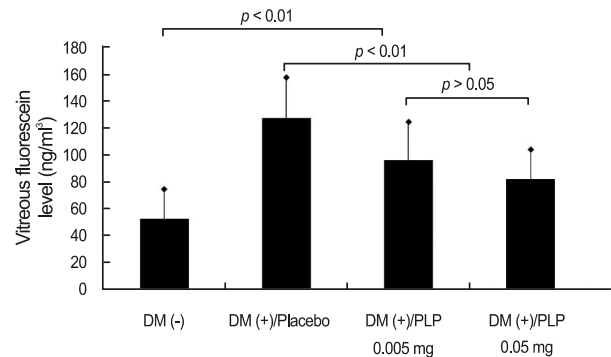


Figure 4. Fluorophotometry shows less leakage of the fluorescein from the retinal vessels in normal and high dose pyridoxal 5'-phosphate-treated group than placebo-treated group. However, pyridoxal 5'-phosphate-treated group shows more leakage compared to the normal control (Mann-Whitney *U* test). DM = diabetes mellitus; PLP = pyridoxal 5'-phosphate.

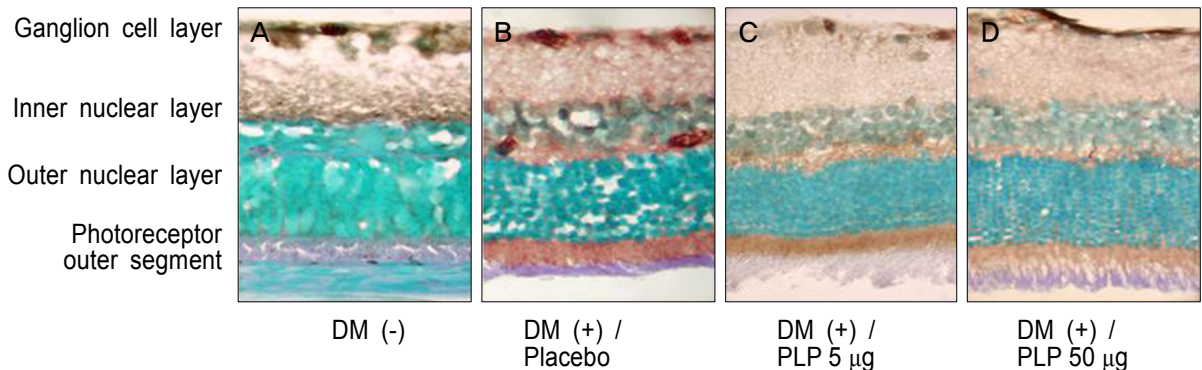


Figure 5. VEGF increased much more in the retina of the control group than in the normal and high dose pyridoxal 5'-phosphate-treated group. DM = diabetes mellitus; PLP = pyridoxal 5'-phosphate.

면역조직화학염색

혈관내피성장인자 단일클론항체를 이용한 면역조직화학 염색의 결과를 Figure 5에 제시하였다. Figure 5의 A는 당뇨를 유발시키지 않은 군으로 methyl green을 이용한 대조 염색으로 염색이 되지 않은 조직을 강조하였다. 결과에서 양성인 세포는 붉은색을 띄게 되는데, PLP를 투여하지 않은 당뇨 쥐의 망막(Fig. 5B)에서 발현을 나타내는 양성세포의 붉은 색 염색성이 당뇨를 유발하지 않은 군(Fig. 5A)에 비해 증가되어 있었다. PLP를 투여한 군(Fig. 5C, D)에서는 투여하지 않는 군에 비해 염색성이 감소되어 있었으며, PLP를 고용량으로 투여한 군(Fig. 5D)에서 좀 더 감소된 염색성을 볼 수 있었다.

고 찰

당뇨망막병증은 당뇨병의 중요한 합병증으로 성인 실명의 가장 흔한 원인이다. 그리하여 최근에는 당뇨망막병증의 발병원인과 기전뿐 아니라 초기 당뇨망막병증을 진단하고 치료하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.¹ 당뇨환자의 망막에서 망막혈액장벽의 붕괴, 혈관 투과성의 증가는 당뇨의 초기 합병증 중 하나로 당뇨병성 황반 부종의 중요한 원인이다. 초기 당뇨망막병증에서 혈관투과성의 증가는 망막 병변보다도 선행되어 초기에 나타날 수 있으며 당뇨망막병증의 진행 정도와 연관이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸ VF를 사용한 유리체 내의 플루레신 농도는 망막 혈관의 투과성을 나타내고 이것은 망막혈액장벽의 붕괴 정도를 반영한다고 알려져 있다.^{19,20} 이런 사실을 바탕으로 1991년 Anis et al²¹은 당뇨 쥐에서 PLP 투여 후 유리체 내의 플루레신 농도를 비교한 실험을 시행하였고, PLP가 혈관망막장벽의 투과성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 Anis et al²¹의 실험에서는 짧은 기간 동안의 PLP를 경구 복용시킨 뒤 플루레신 농도를 비교한 것으로 오랜 기간 사용 뒤에 결과에 대해서 비교할 수 없다는 한계점이 있었다. 이에 저자들은 당뇨 유발 뒤 2주 뒤부터 3주간 복강 내로 PLP를 주사한 후 플루레신의 농도를 비교하였고 이는 통계적으로 유의한 결과를 보였으나($p < 0.01$, Mann-Whitney U test), PLP의 투입 농도가 다른 두 군에서 유리체 내의 플루레신 농도에는 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$, Mann-Whitney U test).

호모시스테인은 설파기를 포함한 아미노산으로 필수 아미노산인 메티오닌(methionine)의 대사과정에서 생성되고 Vitamin B6가 관여하는 황전환작용(transsulfuration)을 통해 시스테인으로 변형된다.²² 고호모시스테인혈증은 MMP

(matrix metalloproteinase)의 활성화로 동맥혈전증과 죽상경화증을 일으킬 수 있어 뇌혈관 및 심장 질환의 위험 인자로 생각되고 있다.^{23,24} 정상인과 증식당뇨망막병증 환자의 혈액 내의 호모시스테인의 농도를 비교한 결과, 증식당뇨망막병증과 호모시스테인의 농도가 유의한 상관 관계가 있었고, 2형 당뇨병에 의한 당뇨망막병증 환자의 혈액 내 호모시스테인 농도를 측정된 연구에서도 정상인에 비해 호모시스테인 농도가 유의하게 증가되어 있었다. 이것은 호모시스테인에 의한 망막혈관의 투과성 증가에 의한 것으로 추정되고 있으며, 이러한 연구를 바탕으로 최근에는 호모시스테인이 당뇨망막병증에 대한 생물표지자와 위험인자로 제시되고 있다.^{25,26} 이런 사실을 바탕으로 본 연구에서는 STZ로 유발된 당뇨 쥐에서 PLP의 투여 후의 호모시스테인의 농도를 측정하여 비교하였다. PLP를 투여한 군에서 PLP를 투여하지 않은 군에 비하여 유의하게 호모시스테인의 농도가 감소하였음을 확인하였고($p < 0.01$, Mann-Whitney U test), 이 실험 결과를 통해 PLP가 당뇨망막병증에서 증가할 수 있는 호모시스테인을 분해하여 억제시키는 효과가 있음을 추정할 수 있다.

당뇨망막병증이 발생되면 망막의 미세혈관의 폐쇄가 일어나고 이로 인한 허혈로 혈관내피성장인자가 증가하는데, 초기 당뇨망막병증에서 혈관주위세포의 변화와 혈관 투과성 증가에 혈관내피성장인자가 관여한다고 알려져 있다.²⁷⁻²⁹ 이에 본 연구에서는 당뇨 쥐의 망막에서 혈관내피성장인자에 대한 일차항체를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 혈관내피성장인자의 발현을 비교하였고, PLP를 투여한 당뇨 쥐의 망막에서 혈관내피성장인자의 발현이 감소되어있는 것을 확인해 볼 수 있었다(Fig. 5). PLP는 생체 내에서 효과적인 최종당화산물(advanced glycosylation end product, AGE)의 억제제로 알려져 있다.³⁰ 당뇨 환자가 고혈당에 노출이 되면 최종당화산물이 증가하게 되고 증가된 최종당화산물은 혈관내피세포에 영향을 주어 미세혈관폐쇄를 유발시키고 혈관내피성장인자를 증가시켜 망막혈관벽의 이상을 유발하며 세포간 유착분자(intercellular adhesion molecule, ICAM)의 상향조절을 통해 망막 모세혈관 내의 백혈구의 침착과 망막혈관장벽의 붕괴를 일으켜 당뇨망막병증의 진행에 영향을 준다고 밝혀져 있다.³¹⁻³³ 본 연구에서도 PLP의 최종당화산물에 대한 억제 효과로 당뇨 쥐의 망막에서 혈관내피성장인자의 발현이 감소하였다고 추정해 볼 수 있으나, 혈액 내와 유리체 내 최종당화산물의 농도나 혈관내피성장인자의 농도 대한 정량적 연구가 이루어지지 못했다는 점에서 둘 간의 상관 관계를 밝히는 데는 한계점을 가진다. 하지만 PLP가 당뇨 쥐의 망막에서 VEGF의 발현을 억제한 것을 면역화학검사를 통해 최초로 증명

한 실험이라는 점에서 충분한 의의를 가질 수 있다고 생각한다.

최근 연구에서는 PLP가 생체 내에서 반응성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거하고 PLP 자체의 베타 세포의 보존 기능과 혈액 내 인슐린 농도 유지에 기여함으로써 고혈당의 조절에 긍정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.³⁴ 또한 PLP는 최종당화산물의 효과적인 억제제로 최종당화산물로 인한 혈관주위세포의 이상과 그로 인한 세포괴사를 억제해 당뇨병망막병증의 진행에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.^{35,36} Stitt et al³⁷이 STZ로 유발된 당뇨 쥐를 이용한 실험에서도 PLP가 최종당화산물의 축적을 막고 당뇨 쥐의 망막에서 혈관주위세포의 소실과 무세포 모세혈관 생성을 막는 것을 밝혀내 PLP의 최종당화산물 생성에 대한 억제가 당뇨병망막병증의 진행을 막는데 연관이 있다는 것을 알아냈지만 최종당화산물에 의한 당뇨병망막병증의 진행의 정확한 기전과 관련 인자에 대해서는 아직 많은 연구가 필요하다.

본 연구에서는 실험적으로 유도된 당뇨 쥐에서 당뇨병망막병증의 발생과 진행과 관련된 유리체 내의 플루레신, 혈관내피성장인자와 호모시스테인의 증가를 확인하였고, PLP의 투여가 이들의 증가를 억제한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 망막 혈관 누출과 혈관내피성장인자 발현 억제 효과를 가지는 PLP가 당뇨병망막병증의 진행에 영향을 주는 물질일 가능성을 확인할 수 있었다. 하지만 PLP가 어떠한 기전을 통하여 당뇨병망막병증과 관련된 인자들에 영향을 주는 지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며 PLP가 당뇨병망막병증에 영향을 주는 적정 투여량, 부작용, 투여시기 및 투여방법에 대한 연구가 필요하겠겠다.

참고문헌

- Amos AF, McCarthy DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997;14 Suppl 5:S1-85.
- Marshall SM, Flyvbjerg A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ* 2006;333:475-80.
- Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond)* 2009;23:1496-508.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
- Van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoom Study. *Diabetologia* 2005;48:1300-6.
- Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, et al. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:370-8.
- Brazionis L, Rowley K Sr, Itsiopoulos C, et al. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2008;31:50-6.
- Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53.
- Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, et al. Pigment-epithelium-derived factor suppresses expression of receptor for advanced glycation end products in the eye of diabetic rats. *Ophthalmic Res* 2007;39:92-7.
- Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 2004;53:3233-8.
- Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, et al. High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1245-51.
- Kim ES, Yu SY, Kwon SJ, et al. Clinical evaluation of patients with nonproliferative diabetic retinopathy following medication of anthocyanoside: multicenter study. *J Korean Ophthalmol Soc* 2008;49:1629-33.
- Yu SI, Jung HJ, Her DY, et al. Suppression of VEGF and STAT3 by lipoic acid in experimental diabetic rat retina. *J Korean Ophthalmol Soc* 2007;48:715-24.
- Okada M, Shibuya M, Yamamoto E, Murakami Y. Effect of diabetes on vitamin B6 requirement in experimental animals. *Diabetes Obes Metab* 1999;1:221-5.
- Toyota T, Kai Y, Kakizaki M, et al. The endocrine pancreas in pyridoxine deficient rats. *Tohoku J Exp Med* 1981;134:331-6.
- Araki A. Homocysteine and diabetic macroangiopathy. *Nihon Rinsho* 2006;64:2153-8.
- Cunha-Vaz JG, Gray JR, Zeimer RC, et al. Characterization of the early stages of diabetic retinopathy by vitreous fluorophotometry. *Diabetes* 1985;34:53-9.
- Van Schaik HJ, Benitez del Castillo JM, Cauberg MJ, et al. Evaluation of diabetic retinopathy by fluorophotometry. european concerted action on ocular fluorometry. *Int Ophthalmol* 1998-1999;22:97-104.
- Do carmo A, Ramos P, Reis A, et al. Breakdown of the inner and outer blood retinal barrier in streptozotocin-induced diabetes. *Exp Eye Res* 1998;67:569-75.
- Anis HH, Bahgat M, Peyman GA, et al. Effect of pyridoxine on the blood-retina barrier in experimentally induced hyperglycemia in rats. *Can J Ophthalmol* 1991;26:354-7.
- Castro R, Rivera I, Blom HJ, et al. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:3-20.
- Lominadze D, Roberts AM, Tyagi N, et al. Homocysteine causes cerebrovascular leakage in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1206-13.
- Moshal KS, Sen U, Tyagi N, et al. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C883-91.
- Aydemir O, Turkcuoglu P, Guler M, et al. Plasma and vitreous ho-

- homocysteine concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 2008;28:741-3.
- 26) Brazionis L, Rowley K Sr, Itsiopoulos C, et al. Homocysteine and diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2008;31:50-6.
- 27) Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-50.
- 28) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-7.
- 29) Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luttly GA. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2729-41.
- 30) Higuchi O, Nakagawa K, Tsuzuki T, et al. Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5'-phosphate as the inhibitor. *J Lipid Res* 2006;47:964-74.
- 31) Padayatti PS, Jiang C, Glomb MA, et al. High concentrations of glucose induce synthesis of argpyrimidine in retinal endothelial cells. *Curr Eye Res* 2001;23:106-15.
- 32) Canning P, Glenn JV, Hsu DK, et al. Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:51837.
- 33) Moore TC, Moore JE, Kaji Y, et al. The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4457-64.
- 34) Kiran SG, Dorisetty RK, Umrani MR, et al. Pyridoxal 5' phosphate protects islets against streptozotocin-induced beta-cell dysfunction--in vitro and in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011;236:456-65.
- 35) Chen BH, Jiang DY, Tang LS. Advanced glycation end-products induce apoptosis involving the signaling pathways of oxidative stress in bovine retinal pericytes. *Life Sci* 2006;79:1040-8.
- 36) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, et al. Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:353-7.
- 37) Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002;51:2826-32.

=ABSTRACT=

Suppression of VEGF and Decrease in Vascular Leakage by Pyridoxal 5'-Phosphate in Diabetic Rats

In Hwan Hong, MD¹, Hyeong Gon Yu, MD, PhD^{2,3}, Sung Pyo Park, MD, PhD¹

Department of Ophthalmology, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Seoul National University College of Medicine², Seoul, Korea

Seoul Artificial Eye Center, Seoul National University Hospital Clinical Research Institute³, Seoul, Korea

Purpose: The authors of the present study investigated whether pyridoxal 5'-phosphate (PLP), an active coenzyme of vitamin B6, could inhibit the development of diabetic retinopathy in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Methods: Seven-week-old Sprague-Dawley rats (n = 20) were used in the present study. STZ (70 mg/kg) was injected intraperitoneally to induce diabetes. Blood glucose and body weight were monitored. Intraperitoneal injections of 5 µg and 50 µg PLP were administered every two days from the second week of induced diabetes. During the third week of PLP injections, the concentration level of plasma homocysteine was measured. In addition, functional status was examined by vitreous fluorophotometer and anatomical status by vascular endothelial growth factor (VEGF) staining in the retina.

Results: Based on vitreous fluorophotometry examination, the PLP injection group proved to have a lower level of fluorescein concentration in the vitreous. Additionally, immunohistochemical staining revealed down-regulation of VEGF expression in the PLP group. In addition, the PLP group had a lower plasma homocysteine concentration. However, an over-dosage injection of PLP did not appear to have any noticeable impact on the treatment of diabetes.

Conclusions: PLP, an active coenzyme of vitamin B6, proved to have inhibitory effects on VEGF expression and vascular leakage in the diabetic rat retina.

J Korean Ophthalmol Soc 2012;53(5):700-706

Key Words: Diabetic retinopathy, Pyridoxal 5'-phosphate (PLP), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Vitreous fluorophotometry

Address reprint requests to **Sung Pyo Park, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Hallym University Kangdong Sacred Heart Hospital

#150 Seongan-ro, Gangdong-gu, Seoul 134-701, Korea

Tel: 82-2-2224-2274, Fax: 82-2-470-2088, E-mail: sungpyo@hanafos.com