

Protective Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Focal Cerebral Ischemia in Rats

Yong Rae Noh¹, Won Suk Lee² and Chang Hwa Choi^{1†}

¹Department of Neurosurgery, ²Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea

This study aimed to investigate the cerebroprotective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on permanent focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. Right middle cerebral artery (MCA) was occluded for 6 and 24 hours by an intraluminal monofilament technique. An open cranial window was made on the right parietal bone for determination of continuous changes in regional cerebral blood flow (rCBF) by laser-Doppler flowmetry. The infarct size was morphometrically determined using the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride technique. Brain edema was determined by measuring brain water content. In normal rats, rCBF was significantly increased by intravenous infusion of VEGF for 10 minutes. The VEGF-induced increase in rCBF was significantly inhibited by pretreatment with suramin, a heparin-binding growth factor inhibitor as well as N^o-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor. In focal cerebral ischemic rats, the amplitude of decrease in rCBF during ischemic period was significantly less in VEGF-treated group, compared with that in vehicle-treated group. The cerebral infarct size was reduced by VEGF in a dose-dependent manner. The brain edema formation was dose-dependently reduced by VEGF in 24-hour MCA occlusion group but not in 6-hour MCA occlusion group. It is suggested that VEGF not only improves the rCBF during cerebral ischemic period but also reduces the brain edema formation, and thereby exert a protective effect on focal cerebral ischemia in rats.

Key Words: Vascular endothelial growth factor, Focal cerebral ischemia, Regional cerebral blood flow, Cerebral infarct, Brain edema

서 론

뇌허혈이 초래되면 뇌조직으로의 혈류량이 감소되고 산소와 포도당이 뇌세포에 원활하게 공급되지 못하여 세포내 ATP가 고갈되고, 이후 일련의 과정을 거쳐서 세포의 탈분극이 일어나 흥분독성 (excitotoxicity)이 유발되며 (Choi et al., 1990) 결국 세포 사망이 초래된다 (Hara et al., 1993).

이와 동시에 허혈 주변의 조직에서 유리되는 여러 성장인자와 사이토카인이 세포내 및 세포외 신호전달경로를 활성화시켜 신경변성과 신경사망으로부터 보호해 줌으로써 허혈성 뇌손상을 억제시키려고 하는데 (Mattson, 1997), 특히 허혈로 인하여 야기된 반음영 (penumbra) 부위의 정상 회복 정도는 혈관신생 (angiogenesis) 능력과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다 (Krupinski et al., 1993, 1994).

혈관신생은 정상적으로는 혈관계가 활발히 발달되는 시기에 여성 생식기에서 일어나고 (Reynolds et al., 1992; Kamat et al., 1995; Cao et al., 1996), 병적 상태에서는 종양 (Folkman and Shing, 1992), 당뇨병망막병증 (Folkman and Shing, 1992; Smith et al., 1997), 류마티스 관절염 (Colville-Nash and Scott, 1992; Koch et al., 1994), 폐쇄성 혈관질환 (Eisenstein, 1991) 등의 경우에 일어난다. 따라서 후자의 경우 새로운 혈관의 형성을 감소시키는 것이 혁신적인 치료 방법이 될 것으로 주목받고 있다 (Hammes et al., 1996; van Royen et al., 2001). 한편, 후지 (hindlimb) 허혈이나 심근경색증과 같은 질환시 허혈 조직은 결순환 혈류를 필요로 하므로 (Isner et al., 1995) 이런 질환의 실험동물 모델에게 혈관신생인자들을 투여함으로써 결혈관 형성이 증강되고 조직 손상이 감소됨이 많이 보고되었다 (Bannai et al., 1994; Takeshita et al., 1994a, b; Bautés et al., 1995a, b). 그러나 뇌경색의 경우에 있어서 혈관신생의 역할에 관하여 자세히 밝혀진 바가 거의 없다. 다만 Krupinski et al. (1994)에 따르면 뇌허혈 부위 주변의 반음영 부위내 새로운 혈관의 수가 뇌경색 환자의 생존기간 연장과 관련이 있을 것으로 보고되어, 뇌경색 부위에서 혈관신생이 활발히 일어난다면 허혈 상태의 조직에 매우 유익할 것이라고 추측

*논문 접수: 2005년 8월 23일

수정재접수: 2005년 9월 20일

†교신저자: 최창화 (우) 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10,

부산대학교 의과대학 신경외과학교실

Tel: 051-240-7254, Fax: 051-244-0282

e-mail: chwachoi@pusan.ac.kr

되고 있지만 현실적으로 치료적 혈관신생이 뇌허혈 손상을 감소시킬 수 있을지는 아직 확실하지 않다 (Engler, 1996).

혈관신생을 유도한다고 알려진 많은 성장인자들 중에서 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)는 내피세포에 대하여 특이하게 분열촉진물질 (mitogen)로 작용하는 것으로서 다른 내피세포성 분열촉진물질 (acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor 등)와는 달리 분비성 당단백이므로 (Leung et al., 1989; Shweiki et al., 1992; Wang et al., 1996) 허혈성 질환에 있어서의 치료적 혈관신생을 위하여 많은 관심을 모으고 있다 (Bannai et al., 1994; Takeshita et al., 1994a,b; Bauters et al., 1995a, b). 뿐만 아니라 VEGF는 모세혈관의 폐색을 방지하고 내피세포를 사멸로부터 보호해 주는 작용 (Alon et al., 1995) 과 함께 신경보호작용 (Silverman et al., 1999)을 가지고 있어 반드시 혈관신생에 의하지 아니하더라도 뇌허혈에 대하여 유의한 효과를 가질 것으로 기대되고 있다. 그러나 VEGF가 가지고 있는 또 하나의 특징인 혈관투과성 증가 작용 (Connolly et al., 1989; Bates and Curry, 1996; Ferrara et al., 1998; Bates et al., 1999)은 뇌부종을 악화시킬 수 있기 때문에 뇌경색에 대한 치료적 응용이 매우 어려운 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 국소 뇌허혈을 일으킨 실험동물에서 뇌허혈 이후에 초래되는 국소 뇌혈류의 변동과 뇌조직 손상에 대한 VEGF의 효과를 관찰함으로써 대뇌허혈시 VEGF의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 300~350 g의 Sprague-Dawley계 숫쥐를 사육장 (실내 온도 20~25°C) 내에서 물과 사료를 제한없이 섭취하게 하면서 사육하였다가 실험에 사용하였다. 사용된 실험동물의 수는 대조군 26 마리와 국소 뇌허혈이군 59 마리 그리고 정상 실험동물 13 마리로서 총 98 마리이었다.

2. 일반 수술 조작

실험동물을 urethane (1 g/kg, i.p.)으로 마취시키고 체온을 37°C로 유지시키기 위하여 소동물용 자동 보온 전기방식 (homeothermic blanket system, Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) 위에 놓고 양와위로 고정하였다. 기관절개술을 행하여 14G catheter로 기도를 확보하고 gallamine (3~5 mg/kg, i.m.)을 투여하여 골격근을 마비시켰다. 동물용 호흡기 (model 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 사용하여 체중을 기준으로 분당 50~60 회의 호흡을 유지시켰다. 양측 대퇴동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽입하고 이를 통하여 혈액 가스 및 pH를 측정하여 (i-STAT Portable Clinical

Analyzer, i-STAT Corporation, East Windsor, NJ, USA) 전 실험 기간 동안 PaCO₂의 변화가 기저치의 3~4% 이내에서 이루어지도록 호흡을 조절하여 유지시켰다.

3. 혈압 변동 측정

전신혈압의 변동을 관찰하기 위하여 실험동물의 대퇴동맥에 삽입되어 있는 polyethylene 관을 압력변환기 (pressure transducer: Statham P23D, Gould, Cleveland, OH, USA)에 연결하고, MacLab (4s, ADInstruments, Castle Hill, Australia)과 Macintosh computer (Power Macintosh 7500/100, Seoul, Korea)로 구성된 자료획득시스템 (data acquisition system)에 기록하였다.

4. 개방 두개창 설치

일반적인 수술 조작이 끝난 후 실험동물의 체위를 복외위로 변경시키고 머리를 정위기구 (900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 두피를 정중선을 따라 절개하여 양측으로 벌린 후 입체현미경 (Stemi SV6, Carl Zeiss, Jena, Germany) 하에서 관상봉합의 미측에 위치한 우측 두정골에 saline-cooled drill (395, Dremel, Racine, WI, USA)을 사용하여 개두술 (5×5 mm)을 시행하고 뇌경막과 지주막을 온전하게 보존시켰다. 그 후 미리 37°C로 가온한 인공 뇌척수액을 관류시켰다. 사용한 인공 뇌척수액의 조성은 다음과 같다: Na⁺ 156.5 mEq/L, K⁺ 2.95 mEq/L, Ca²⁺ 2.5 mEq/L, Mg²⁺ 1.33 mEq/L, Cl⁻ 138.7 mEq/L, HCO₃⁻ 24.6 mEq/L, dextrose 66.5 mg/dL, urea 40.2 mg/dL (pH 7.4).

5. 국소 뇌혈류 변동 측정

실험동물의 머리를 정위기구에 고정시키고, 개방 두개창을 통하여 laser-Doppler flowmeter (BLF21, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)용 needle probe (type NS)를 정위 미세 조작장치 (stereotactic micromanipulator)를 사용하여 대뇌겉질 표면에 수직이 되도록 뇌경막동맥 또는 뇌연막동맥에 조심스럽게 접근시켰다. 일정 시간 동안 안정시킨 후 실험 protocol에 따라 국소 뇌혈류의 변동을 측정하였다. Laser-Doppler flowmeter에 의하여 측정된 국소 뇌혈류의 변동은 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 자료획득시스템에 기록하였다.

6. 국소 뇌허혈

뇌경색의 실험동물 모델로서 널리 사용하는 중간대뇌동맥 (middle cerebral artery, MCA) 폐색은 Longa et al. (1989)의 방법에 따라 시행하였다. 실험동물을 pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 배쪽 중간선을 따라 목 부위를 절개하여 오른바깥목동맥 (right external carotid artery)의 가지를 전기소작시켜 절단하고, 속목동맥 (internal carotid artery)

의 가지인 나비입천장동맥 (sphenopalatine artery)의 기시부를 7~0 나일론 봉합사로 결찰하여 온목동맥 (common carotid artery)의 분지 중 두개 외에 존재하는 것은 오로지 속목동맥만이 남아 있도록 하였다. 그 후 바깥목동맥의 기시부 주위를 6~0 견봉합사로 느슨하게 묶은 다음 온목동맥을 6~0 견봉합사로 결찰하고, 속목동맥에 미세혈관용 클립을 장치하여 혈류를 차단시키고, 미세수술용 가위로 바깥목동맥에 작은 구멍을 만들어 그 내강을 통하여 말단부를 등글게 만든 길이 약 2 cm의 3~0 단선조 나일론 봉합사를 속목동맥 내로 삽입하였다. 출혈을 방지하기 위하여 혈관 내의 나일론 봉합사 주위를 바깥목동맥 기시부 주위에 느슨하게 있던 견봉합사로 줄라면 후 미세혈관용 클립을 제거하였다. 나일론 봉합사를 천천히 진입시켜 그 끝이 MCA의 기시부에 도달되도록 하여 MCA를 폐색시켰다. 그 후 목의 절개 부위를 봉합하고 마취가 깰 때까지 보온상자 내에서 회복토록 한 후 일반 사육상자 내로 옮겨 실온에서 사료와 물을 마음대로 섭취하도록 하였다.

7. 뇌경색 크기 측정

MCA 폐색 6 시간 및 24 시간 후에 과량의 마취제를 투여한 후 단두 치사시키고, 전체 뇌를 머리뼈로부터 적출하였다. 적출한 뇌를 뇌주형 (RBM-4000C, ASI, USA) 위에 놓고, 전두엽 말단에서부터 후방으로 2 mm 간격으로 절단하여 7개의 연속 관상 뇌절편을 만들고, Bederson et al. (1986)의 방법에 따라 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 담구어 실온에서 30 분간 처치한 후 10% 중성 formalin 완충액으로 고정시켰다. 고정된 뇌조직 절편의 뒷쪽면을 입체현미경에 연결된 비디오 칼라 프린터 (Model CVP-G7, Sony, Japan)로 사진을 찍고, 각 절편에 생긴 뇌경색 부위의 면적을 면적계 (KP-21, Koizumi, Japan)로써 측정하였다.

8. 뇌부종 측정

뇌부종의 정도를 관찰하기 위한 방법으로 실험동물의 뇌내 수분 함량을 측정하였다. MCA 폐색 6 시간 및 24 시간 후에 과량의 마취제를 투여한 후 단두 치사시키고, 전체 뇌를 머리뼈로부터 꺼내어 대뇌만을 선택 적출하였다. 적출한 대뇌를 좌우반구로 양분하고 각각을 다시 절절과 줄무늬체 두 부분으로 나누어 무게를 측정하였다. 뇌조직 시료를 110°C의 건조기 속에 넣고 24 시간 동안 완전 건조시킨 후 각각의 무게를 측정하여 다음의 공식 (Hatashita et al., 1988)을 사용하여 뇌내 수분 함량을 계산하였다.

$$\text{Water content (\%)} 100 = \frac{\text{Wet weight (mg)} - \text{Dry weight (mg)}}{\text{Wet weight (mg)}} \times 100$$

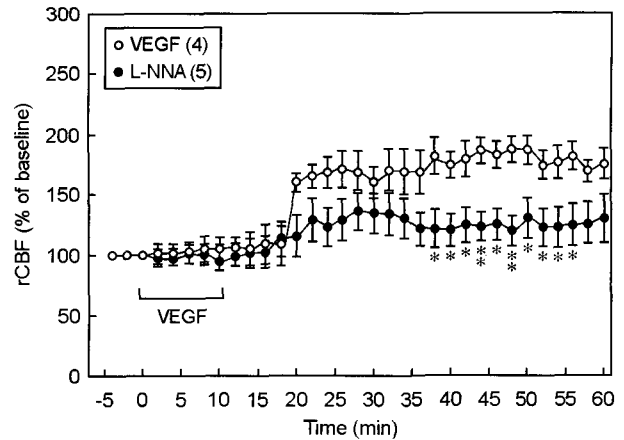


Fig. 1. Effect of pretreatment with N^o-nitro-L-arginine (L-NNA, 1 mg/kg, i.v.) on the changes in regional cerebral blood flow (rCBF) induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal rats. VEGF (0.1 ng/kg) was i.v. infused for 10 minutes. Numbers in parentheses indicate the numbers of animals. *P<0.05; **P<0.01 vs. corresponding control value.

9. 사용 약물

본 연구에 사용된 약물은 vascular endothelial growth factor (VEGF), N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) 및 suramin으로서 모두 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 0.9% 생리식염수에 용해시켜 사용하였다. VEGF의 투여는 넓다리정맥을 통하여 10 분간 주입하였고, L-NNA와 suramin의 투여는 VEGF 주입 30 분전에 1 mg/kg로 정맥주사하였다.

10. 통계 처리

모든 측정치는 평균 ± 평균의 표준오차로 표시하였다. 집단 사이의 유의성 검정은 통계프로그램인 Prism (version 3.03, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 일원배치 분산분석법 또는 반복측정 이원배치 분산분석법으로 분석한 후 Dunnett의 다중비교법으로 사후 검정하여 P 값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. VEGF가 국소 뇌혈류에 미치는 효과

뇌순환에 있어서 VEGF가 가지는 역할을 알기 위하여 정상 실험동물에게 VEGF 0.1 ng/kg을 10 분간 정맥주입하고 국소 뇌혈류의 변동을 관찰하였다. VEGF는 정맥주입 약 20 분 이후부터 국소 뇌혈류량을 현저히 증가시키기 시작하였고, 이러한 효과는 nitric oxide 합성효소 억제제인 L-NNA (1 mg/kg, i.v.) 전처치에 의하여 유의하게 억제되었을 뿐만 아니라 (F_(1,231) = 92.02, P<0.0001, Fig. 1), 헤파린-결합성 성장인자 억제제인 suramin (1 mg/kg, i.v.) 전처치에 의하여 현저히

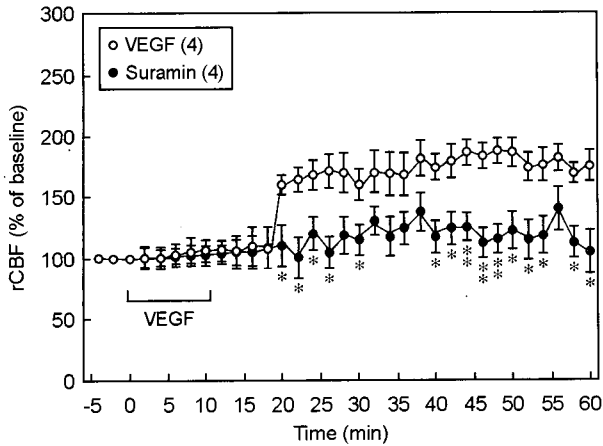


Fig. 2. Effect of pretreatment with suramin (1 mg/kg, i.v.) on the changes in rCBF induced by VEGF (0.1 ng/kg, i.v. infusion for 10 minutes). * $P < 0.05$ vs. corresponding control value.

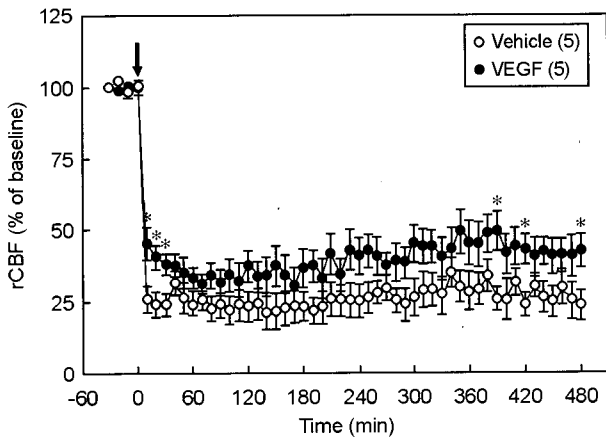


Fig. 3. Effect of pretreatment with VEGF on the changes in rCBF induced by middle cerebral artery (MCA) occlusion (\downarrow). VEGF (0.1 ng/kg) was i.v. infused for 10 minutes from 5 minutes after MCA occlusion. * $P < 0.05$ vs. corresponding vehicle value.

분쇄되었다 ($F_{(1,198)} = 132.62, P < 0.0001$, Fig. 2).

2. 뇌허혈로 인한 국소 뇌혈류 변동에 미치는 효과

국소 뇌허혈로 인한 국소 뇌혈류의 변동을 뇌허혈 후 6 시간 동안 laser-Doppler flowmetry 법으로 측정된 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 국소 뇌혈류는 뇌허혈 기간 동안 거의 차단되었다 (안정시의 $26.12 \pm 0.46\%$). 그러나 VEGF 0.1 ng/kg 처치군에서는 뇌허혈 기간 동안의 국소 뇌혈류가 전반적으로 증가되어 (안정시의 $39.51 \pm 0.71\%$) 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다 ($F_{(1,384)} = 139.78, P < 0.0001$).

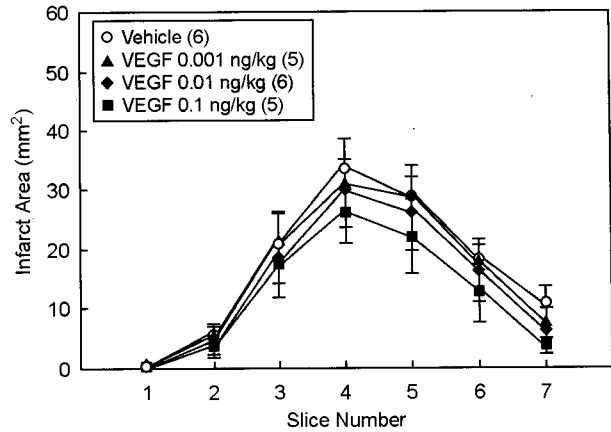


Fig. 4. Effect of VEGF on the cerebral infarct area 6 hours after MCA occlusion. VEGF was i.v. infused for 10 minutes from 5 minutes after MCA occlusion.

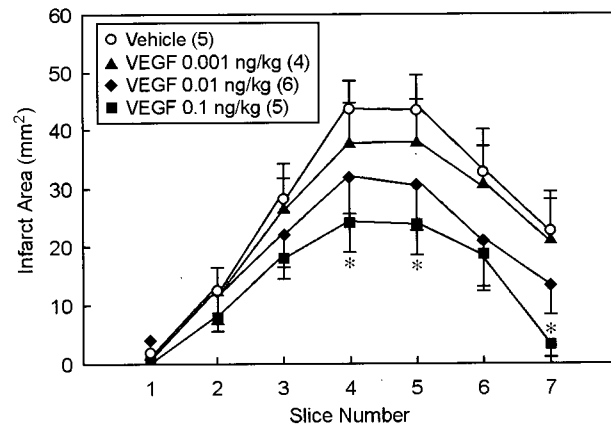


Fig. 5. Effect of VEGF on the cerebral infarct area 24 hours after MCA occlusion. VEGF was i.v. infused for 10 minutes from 5 minutes after MCA occlusion. * $P < 0.05$ vs. corresponding vehicle group.

3. 뇌경색 형성에 미치는 효과

일과성 국소 뇌허혈을 실험동물에게 일으키고, 전체 뇌를 적출하여 2% TTC 용액으로 염색을 해 본 결과 허혈 동측 대뇌반구의 MCA 분포 영역에 육안으로 뚜렷이 구별되는 뇌경색이 형성되었다.

실험동물의 MCA를 폐색시킨 5 분 후에 VEGF (0.001~0.1 ng/kg)를 10 분간 정맥주입하고 허혈 후 6 시간에 단두 치사시켜 연속 관상 뇌절편에 생성된 경색의 면적을 측정하였을 때 VEGF는 통계학적으로 유의한 영향을 미치지 아니하였다 (Fig. 4). 그러나 허혈 24 시간 후의 뇌절편에 생성된 경색의 면적은 VEGF의 용량에 의존적으로 감소되었고 ($F_{(3,112)} = 7.20, P = 0.0002$, Fig. 5), 특히 0.1 ng/kg에서 4, 5 및 7 번째 뇌절편의 경색 면적은 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다 (각

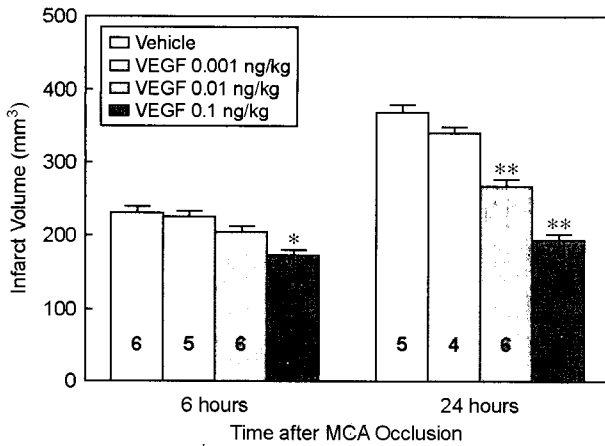


Fig. 6. Effect of VEGF on the infarct volume 6 and 24 hours after right MCA occlusion. VEGF was i.v. infused for 10 minutes after MCA occlusion. Numbers in columns indicate the numbers of animals. * $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$ vs. corresponding vehicle group.

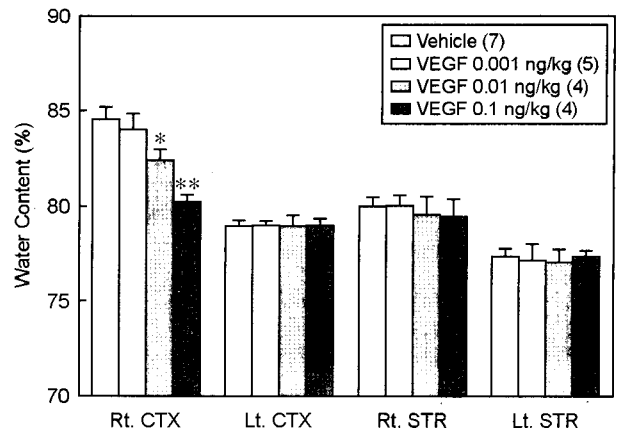


Fig. 8. Effect of VEGF on the brain water content of rats 24 hours after right MCA occlusion. VEGF was i.v. infused for 10 minutes after MCA occlusion. CTX, cortex; STR, striatum. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. corresponding vehicle group.

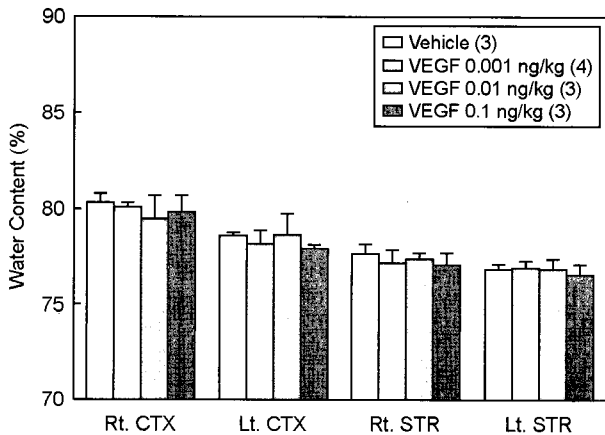


Fig. 7. Effect of VEGF on the brain water content of rats 6 hours after right MCA occlusion. VEGF was i.v. infused for 10 minutes from 5 minutes after right MCA occlusion. CTX, cortex; STR, striatum.

찰하기 위하여 MCA를 폐색시킨 5 분 후에 VEGF (0.001~0.1 ng/kg)를 10 분간 정맥주입하고 허혈 후 6 시간 및 24 시간에 단두 치사시켜 좌우 대뇌겉질과 줄무늬체에 함유된 수분 함량을 측정하였다. 뇌허혈 6 시간 후의 좌우 대뇌겉질과 줄무늬체 내에 함유된 수분 함량은 VEGF 처치에 의하여 아무런 영향을 받지 아니하였다 (Fig. 7). 그러나 뇌허혈 24 시간 후의 각 뇌조직 내의 수분 함량을 측정하였을 때 Fig. 8에서 보는 바와 같이 허혈 동측 대뇌겉질의 수분 함량이 VEGF 처치에 의하여 용량-의존적으로 ($F_{(3,16)} = 8.33$, $P = 0.0015$) 감소되었고, 특히 VEGF 0.01 및 0.1 ng/kg에서 유의하게 감소되었다 ($P = 0.0429$ 및 $P = 0.0007$).

고 찰

본 연구에서는 국소 뇌허혈을 일으킨 백서에서 VEGF가 뇌허혈 후에 초래되는 국소 뇌혈류의 변동을 개선시키고 뇌경색의 크기 및 뇌부종 형성을 감소시키기가 관찰되었다.

VEGF 유전자는 정상 상태의 장기 조직 (뇌, 콩팥, 간, 폐, 지라, 침샘, 눈 조직 등)에서 구성성으로 발현되지만 (Monacchi et al., 1993; Pammer et al., 1998; Kim et al., 1999), 여러 형태의 세포들에서 허혈이나 저산소증에 의하여 유도되어 (Hashimoto et al., 1994; Pierce et al., 1995; Marti et al., 2000) 허혈로 인한 손상을 받는 조직에서 새로운 혈관 생성을 유도하는데 중추적 역할을 하여 주로 결순환 혈류를 증강시켜 줌으로써 허혈성 손상을 감소시킬 수 있다고 알려져 있다 (Bannai et al., 1994; Takeshita et al., 1994a,b; Bauters et al., 1995a, b). VEGF는 저산소증시 신경아교세포 (Ijichi et al., 1995; Behzadian et al., 1998), 내피세포 (Fischer et al., 1995; Liu et al., 1995; Nomura et al., 1995), 혈관주위세포 (Nomura et

각 $P = 0.0223$, $P = 0.0481$ 및 $P = 0.0377$).

나아가 뇌 전체에 형성된 경색의 크기를 비교하였을 때 Fig. 6에서 보는 바와 같이 허혈 후 6 시간의 경색 크기는 VEGF 0.001 및 0.01 ng/kg 처치에 의하여는 통계학적으로 별 영향이 없었으나, VEGF 0.1 ng/kg 처치군 ($172.20 \pm 7.63 \text{ mm}^3$)에서는 대조군 ($229.40 \pm 9.09 \text{ mm}^3$)에 비하여 유의하게 감소되었다 ($P = 0.0011$). 허혈 24 시간 후의 경색 크기는 VEGF 0.01 ($268.00 \pm 7.74 \text{ mm}^3$) 및 0.1 ng/kg 처치군 ($193.4 \pm 7.37 \text{ mm}^3$)에서는 대조군 ($367.40 \pm 11.72 \text{ mm}^3$)에 비하여 모두 유의하게 감소되었다 ($P < 0.0001$).

4. 뇌부종 형성에 미치는 효과

국소 뇌허혈 후 뇌부종 형성에 미치는 VEGF의 효과를 관

al., 1995; Yamagishi et al., 1999) 등에서 유도되고, 뇌허혈시 대뇌겉질과 뇌연막세포 (Hayashi et al., 1997), 신경아교세포, 신경세포 및 큰포식세포 (Kovacs et al., 1996) 등에서 유도된다. 그러나 VEGF가 뇌경색에 대하여 어떠한 효과를 미치는지 또는 어떠한 역할을 하는지에 관하여는 아직 자세히 모르고 있다.

본 연구에서 뇌경색의 크기를 TTC 염색법을 이용한 형태측정학적으로 측정한 결과 뇌허혈 6 시간 및 24 시간 후의 뇌경색의 크기는 VEGF 투여에 의하여 유의하게 감소되었다. 일반적으로 뇌허혈 상태가 초래된 후 뇌혈관 내피세포의 증식은 허혈 후 수일에 시작하고 새로운 혈관의 형성은 그 이후부터 수개월에 걸쳐 일어나는 것으로 알려져 있다 (Chen et al., 1994; Krupinski et al., 1994). 본 연구에서 VEGF를 투여한 시기가 뇌허혈 유도 5 분 후부터이므로 본 연구의 결과인 VEGF에 의한 뇌경색 크기 감소 효과는 혈관신생의 증가에 의한 것이라기보다는 어떤 다른 기전에 의한 것으로 여겨진다. VEGF가 신경보호 효과를 나타낸 정확한 작용 부위는 현재로서는 확실히 알 수 없으나, 한 가지 가능성으로서 VEGF가 허혈성 뇌손상에 대하여 혈관계를 보호해 주는 작용을 함으로써 뇌손상을 감소시켰다고 생각할 수 있다. 이러한 가설은 본 연구의 결과에서 VEGF가 국소 뇌혈류를 증가시켰고 이러한 효과는 nitric oxide 합성효소 억제제인 L-NNA 전처치에 의하여 유의하게 억제되었다는 사실과 함께 VEGF가 모세혈관 폐색을 방지하고 내피세포를 사멸로부터 보호해주고 (Alon et al., 1995), nitric oxide의 생성을 통하여 혈관 평활근을 이완시키며 (Ku et al., 1993), 내피세포를 구조적으로 건전하고 손상되지 않은 상태로 유지시키고 회복시키는 역할을 한다는 Tsurumi et al. (1997)과 Bryant et al. (1998)의 보고들로서 뒷받침된다.

VEGF는 epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β , neurotrophin 등과 함께 신경보호작용과 항세포소멸작용을 가지고 있다 (Silverman et al., 1999). Jin et al. (2000)은 뇌허혈 백서의 대뇌겉질 및 해마 부위에서 VEGF 수용체의 발현이 증가하고 phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3-kinase)/serine-threonine kinase (Akt) 경로가 유도되는 것을 관찰하여 VEGF가 내인성 신경보호 반응에 관여할 것이라고 하였다. 따라서 뇌허혈 후 한 가지 이상의 혈관신생물질의 합성 및 발현이 빠르면 빠를수록 허혈성 뇌손상으로부터의 회복은 더욱 빠른 시간 내에 이루어질 것이라고 추측할 수 있다. 이러한 가능성은 급성 뇌졸중 환자의 혈청 (Slevin et al., 2000)과 뇌경색 주변의 반응성 부위 (Issa et al., 1999)에서 VEGF의 농도 및 VEGF mRNA의 발현이 각각 현저히 증가하고, 이러한 현상은 허혈성 뇌손상으로부터의 회복 과정에 밀접한 상관관계를 가지고 있는 것으로 입증되었다.

VEGF는 혈관내피세포에 있는 VEGF-2 수용체와 결합하여 PI3-kinase/Akt의 인산화 과정을 활성화시킬 뿐만 아니라 (Gerber et al., 1998) tyrosine kinase c-Src도 활성화시켜 nitric oxide와 prostacyclin의 생성을 증가시킨다 (He et al., 1999). 본 연구에서는 VEGF에 의한 국소 뇌혈류 증가 반응이 protein tyrosine kinase 억제제인 suramin 전처치에 의하여 현저히 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 VEGF가 뇌조직 뿐만 아니라 뇌미세혈관계에도 보호 작용을 해 줌으로써 허혈성 뇌손상을 감소시키는 것으로 생각된다. 그러나 본 연구의 결과만으로는 규명하기 어렵고 더욱 깊이 있는 연구가 필요하다.

한편 VEGF는 혈관투과성을 증가시켜 뇌부종을 악화시킬 수 있을 것이라고 알려져 있다 (Connolly et al., 1989; Bates and Curry, 1996; Ferrara et al., 1998; Bates et al., 1999; van Bruggen et al., 1999). 뇌허혈 손상에 있어서 혈액뇌장벽의 파괴와 뇌실질 세포의 손상간의 상관관계는 아직 잘 모르고 있으나 혈액뇌장벽의 파괴는 허혈 동안의 뇌혈류량과 허혈 기간에 의한다고 생각되고 있다 (Hallenbeck and Dukta, 1990). 뇌부종은 크게 혈관성 부종과 세포독성 또는 세포성 부종으로 크게 구별되고 있는 바 뇌허혈에 의한 뇌부종 발생의 병인론에 있어서 혈관성 부종은 뇌혈관벽의 손상에 의한 수분과 혈장 성분의 혈관밖유출, 즉 혈액뇌장벽의 파괴와 혈관투과성 증가에 의하며, 세포독성 부종은 모종의 유해인자가 직접 뇌실질의 구성 성분에 영향을 미침으로써 세포 종창을 야기한다고 알려져 있다 (Ko, 1997). 뇌허혈 후 비교적 초기에 형성되는 뇌부종은 혈관성 원인으로 보다는 주로 세포독성에 의하여 발생하는 것으로서 (Betz and Coester, 1990) 허혈로 인한 에너지 부전 상태시 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase를 통한 Na^+ 이동의 장애가 초래되어 세포 종창과 세포독성 부종이 일어난다 (Betz et al., 1989).

본 연구에서 국소 뇌허혈 후 뇌 내 수분 함량을 측정하였을 때 뇌허혈 24 시간 후에 현저히 증가한 뇌 내 수분 함량은 VEGF 처치에 의하여 유의하게 감소되었다. 이는 일반적인 예상과는 상반된 것으로서 매우 흥미있는 결과이다. 본 연구에서 VEGF를 뇌허혈 직후에 투여하였고 혈액 재관류를 시켜 주지 않았기 때문에 VEGF는 혈액뇌장벽을 파괴하기 보다는 보호해 주는 역할을 하고 나아가 내피세포 보호 작용을 나타내었다고 추측되고 이에 대하여는 향후 자세한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 VEGF가 국소 뇌허혈로 인한 국소 뇌혈류의 변동을 개선시키고 뇌부종 형성의 진행을 억제시킴으로써 뇌손상을 감소시킨다는 것이 밝혀짐으로써 향후 허혈성 뇌손상의 진행을 억제하고 뇌순환 개선 효과가 큰 신약 개발과 적용 등에 대한 새로운 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대되는 바가 크다.

REFERENCES

- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*. 1995. 1: 1024-1028.
- Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994. 89: 2183-2189.
- Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol*. 1996. 271: 2520-2528.
- Bates DO, Lodwick D, Williams B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation* 1999. 6: 83-96.
- Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 1995a. 91: 2802-2809.
- Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg*. 1995b. 21: 314-324.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986. 17: 1304-1308.
- Betz AL, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke* 1990. 21: 1199-1204.
- Betz AL, Ennis SR, Schielke GP. Blood-brain barrier sodium transport limits development of brain edema during partial ischemia in gerbils. *Stroke* 1989. 20: 1253-1259.
- Behzadian MA, Wang XL, Shabraway M, Caldwell RB. Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF- β . *Glia* 1998. 24: 216-225.
- Bryant CE, Appleton I, Mitchell JA. Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci*. 1998. 62: 2195-2201.
- Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1996. 271: 3154-3162.
- Chen HH, Chien CH, Liu HM. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct. *Stroke* 1994. 25: 1651-1657.
- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci*. 1990. 13: 171-182.
- Colville-Nash PR, Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis*. 1992. 51: 919-925.
- Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*. 1989. 264: 20017-20024.
- Eisenstein R. Angiogenesis in arteries: review. *Pharmacol Ther*. 1991. 49: 1-19.
- Engler DA. Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1996. 94: 1496-1498.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 1998. 4: 336-340.
- Fischer S, Sharma HS, Karliczek GF, Schaper W. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995. 28: 141-148.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992. 267: 10931-10934.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998. 273: 30336-30343.
- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med*. 1996. 2: 529-533.
- Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol*. 1993. 40: 645-670.
- Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y.

- Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol.* 1994. 267: H1948-H1954.
- Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997. 28: 2039-2044.
- He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem.* 1999. 274: 25130-25135.
- Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* 1995. 14: 87-93.
- Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rossow S, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Schainfeld R. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995. 91: 2687-2692.
- Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest.* 1999. 79: 417-425.
- Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 2000. 100: 713-717.
- Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol.* 1995. 146: 157-165.
- Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Agular S, Miller JW, Adamis AP. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999. 40: 2115-2121.
- Ko KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 1997. 23: 47-142.
- Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1994. 152: 4149-4156.
- Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996. 27: 1865-1872.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994. 25: 1794-1798.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Wang M, Kumar S. Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke. *Lancet* 1993. 342: 742.
- Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 1993. 265: H586-H592.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989. 246: 1306-1309.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995. 77: 638-643.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989. 20: 84-91.
- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2000. 156: 965-976.
- Mattson MP. Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997. 21: 193-206.
- Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol.* 1993. 264: C995-C1002.
- Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem.* 1995. 270: 28316-28324.
- Pammer J, Weninger W, Mildner M, Burian M, Wojta J, Tschachler E. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol.* 1998. 186: 186-191.
- Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995. 92: 905-909.
- Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.* 1992. 6: 886-892.

- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992. 359: 843-845.
- Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience* 1999. 90: 1529-1541.
- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000. 31: 1863-1870.
- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Rubio F, Szczudlik A, Gaffney J. Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke. *Neuroreport* 2000. 11: 2759-2764.
- Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 1997. 276: 1706-1709.
- Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994a. 90: II228-II234.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994b. 93: 662-670.
- Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzenbichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med*. 1997. 3: 879-886.
- van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest*. 1999. 104: 1613-1620.
- van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*. 2001. 49: 543-553.
- Wang W, Merrill MJ, Borchardt RT. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Am J Physiol*. 1996. 271: C1973-C1980.
- Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Fujimori H, Sakurai S, Tanaka N, Yamamoto H. Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest*. 1999. 79: 501-509.