

당뇨병성 망막증에 있어서 Captopril에 의한 VEGF 발현 저하 효과

배춘식, 임슬기, 박민정, 한호재, 김계엽¹, 정수영², 윤경철³, 박수현*

전남대학교 수의과대학 바이오치료 산업인력 양성팀, 동물의학 연구소

¹동신대학교 보건 의료대학 물리치료학과, ²진라남도 한방산업 진흥원

³전남대학교 의과대학 안과학교실

The Preventive Effect of Captopril on VEGF Expression in Streptozotocin-induced Diabetic Retinopathy

Chun-Sik Bae, Seul-Ki Lim, Min-Jung Park, Ho-Jae Han, Kye-Yeop Kim¹,
Soo-Young Jeong², Kyung-Chul Yoon³ and Soo-Hyun Park*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹College of Health and Welfare, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

²Jeonnam Development Institute for Korean Traditional Medicine, Jangheung 529-851, Korea

³Department of Ophthalmology, Chonnam National University, Medical School and Hospital,
Gwangju 501-757, Korea

(Received March 19, 2009; Accepted June 23, 2009)

ABSTRACT

Diabetic retinopathy is one of major complications of diabetes mellitus, which is associated with the dysfunction of retina. It has been reported that the onset of diabetic retinopathy is related to the activation of renin-angiotensin system (RAS). Angiotensin converting enzyme (ACE), which converts angiotensin I into angiotensin II, is a key component of RAS. Among many growth factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important cytokine in the neovascularization of retina, which is a characteristics of diabetic retinopathy. However, the relationship between ACE and VEGF was not elucidated in diabetic retinopathy. Thus, this study was conducted to examine the protective effect of captopril, an ACE inhibitor, in the retina of streptozotocin (STZ)-treated diabetic rats. In present study, STZ-treated diabetic rats exhibited the increase of VEGF levels in serum and retina. The serum levels of VEGF in STZ-treated diabetic rats was not blocked by the treatment of captopril. However, the retina levels of VEGF in STZ-treated diabetic rats was blocked by the treatment of captopril, suggesting the local action of captopril in retina. Immunohistochemical analysis also revealed that the retina of STZ-treated diabetic rats manifested the increase of ganglion cell layers, outer nuclear layers, and inner nuclear layers, which were also prevented by the treatment of captopril. In conclusion, captopril prevented the expression of VEGF in the retina of STZ-treated diabetic rats.

Keywords : Angiotensin converting enzyme, Retina, Vascular endothelial growth factors, Diabetic retinopathy

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-E00008). 아울러 이 연구의 일부는 2008년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구이며 2008년 바이오하우징연구소의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이에 깊이 감사드립니다.

* Correspondence should be addressed to Soo-Hyun Park, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea. Ph.: (062) 530-2832, Fax: (062) 530-2809, E-mail: parksh@chonnam.ac.kr

서 론

당뇨병은 전 세계적으로 빠르게 유병률이 증가하는 질환으로, 현재 대한민국 국민의 약 8%인 400만 명 정도로 성인 7명 중 한명 꼴로 당뇨병을 갖고 있으며 계속 증가하는 추세에 있다(Yoon et al., 2006). 이러한 당뇨병은 소모성 질환으로 현저한 이병을 및 사망률을 일으키는 것으로 알려져 있다(Ko et al., 2005; Deshpande et al., 2008). 당뇨병성 합병증은 당뇨병성 신경증, 망막증 및 신증으로 분류되며 최근 당뇨병성 망막증환자는 전체 당뇨병 환자의 25% 정도로 발병하며 이들 중 5%는 중증의 실명을 유발하여 심각한 질병 중에 하나로 인식되고 있다(Gariano & Gardner, 2005). 이러한 당뇨병성 망막증은 우리나라의 경우 25세 이상에서 성인의 실명 원인 중 당뇨병에 의한 경우가 가장 많은 것으로 알려져 있어 그 중요성이 크다고 하겠다(Korea Diabetes Association, 2005).

Renin-angiotensin system (RAS)은 angiotensinogen이 renin에 의해서 angiotensin I이 되며 이는 다시 angiotensin converting enzyme (ACE)에 의해 다시 angiotensin II가 되어 이들의 특이적인 수용체인 AT1R 또는 AT2R를 통하여 혈관을 수축 및 이완을 통하여 혈압조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Brugts et al., 2008). 이들 중 ACE는 주로 생체 활성의 peptide를 조절하는 데 관여하는 여러 기능을 지닌 효소로서 주로 폐의 혈관내피 조직이나 신경상피 조직에 존재하여 혈관 활성 peptide를 조절하여 혈압을 조절하지만, 최근에 ACE는 고혈압 이외에도 당뇨병성 합병증의 발병에 밀접한 관련이 있으며 특히 당뇨병성 망막증의 발병에도 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되고 있다(Novo et al., 2008). 망막에도 ACE (Tikellis et al., 2004), renin 및 angiotensinogen (Sarlos & Wilkinson-Berka, 2005)이 발현되는 것으로 보고되어 당뇨병 상황하에서 RAS system이 조직 특이적으로 작용할 수 있음을 시사해 주고 있으나 이에 대한 정확한 기전의 이해는 미약한 실정이다.

VEGF는 당단백의 4 isoforms로 이루어져 있으며 망막의 다양한 세포에서 발현되는 것으로 보고되고 있다(Saint-Geniez et al., 2008). VEGF의 역할은 주로 신생혈관 형성과 혈관 투과성 증가이며 VEGF의 발현 기전 중에 당뇨병성 망막증과 관련된 것으로는 angiotensin II가 혈관신생물질인 VEGF 발현을 증가시켜 당뇨병성 망막증 발병을 유도한다고 보고되고 있다(Kim et al., 2009). 그럼에도 불구하고 ACE에 대한 당뇨병성 망막증과 VEGF 관련성에 관한 보고는 알려져 있지 않고 있다. 따라서 본 연구자들은 이 연구를 통해 streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐에서 ACE 길항제인 captopril이 망막을 보호하는 영향이 VEGF 발현 억제를 통한

망막 질환 진행의 억제에 의한 것인지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 captopril 투여

Sprague Dawley 종 흰쥐 18마리(180~200 g, 샘타코, 오산)를 분양받아 7일간 사육실 환경에 적응시킨 다음 Control, STZ 처리군 및 captopril+STZ 처리군으로 나누었다. 동물실의 환경은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 40~60%, 명암주기 12시간으로 유지하였으며, 실험동물용 사료와 음수는 제한 없이 공급하였다. 모든 실험은 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 동물실험표준 작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행되었다. 당뇨는 16시간 동안 절식 후 STZ를 체중 1 kg 당 55 mg으로 총 주사량이 0.5 mL 되도록 단일 투여로 복강 주사하여 유발시켰다. 투여 후 3일째에 미 정맥에서 채혈을 하여 혈당 농도가 300 mg/dL 이상인 동물만 선택하여 본 실험에 사용하였다. STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 중성 pH와 실내 온도하에서는 급속히 불활성화되기 때문에 citrate buffer (pH 4.0)에 녹여 냉장상태를 유지한 후 10분 이내에 사용하였으며 captopril은 물에 녹여 65 mg/kg/day을 존데를 이용하여 경구 투여하였다. 실험동물은 모두 8주간 충분한 사료와 물을 공급하면서 사육하였다. 이후 실험 종료 시점에서 Zolazepam-Tiletamine (Zoletile[®], Virvac, France) 5 mg/kg과 Xylazine (Rompun[®], Bayer Korea, Korea) 5 mg/kg을 대퇴부 근육에 주사하여 마취한 후, 안구를 적출하여 안구의 각막과 수정체, 유리체를 제거하고 망막조직이 드러나면 망막의 중심오목에서 이측으로 2 mm 정도 떨어진 부위를 2×2 mm 크기로 망막조직을 떼어냈다. 이후 샘플은 초저온 냉장고에 -70°C 에 보관하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 약 30분 방치한 후 원심분리기로 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청학적 분석을 실시하였다.

2. 혈청중의 생리적 parameter 측정

당화 해모글로빈은 Pierce glycol gel kit (Pierce, Rockford, IL)에 의해서 측정하였다. Total cholesterol 함량은 Jaffe reaction법(kinetic alkaline picrate)으로 측정하였다. 사용한 시약은 Clinimate CREA (DAIICHI 제조, 중외제약 공급)이고, 측정기기는 Hitachi 7600-110/7170 (Japan)을 사용하였다. 혈청 triglyceride 함량은 Hexokinase UV법으로 측정하였다. 사용한 시약은 LQDIA GLU (아산제약)이고, 측정기기는 Hitachi 7600-110/7170 (Japan)을 사용하였다. 혈청중의 VEGF 농도는 VEGF ELISA kit (R&D diagnostics, Indiana)를 이용하였다.

3. 샘플 처리 및 면역화학 염색법

당뇨 유발 흰쥐를 8주간 사육하고 Zolazepam-Tiletamine (Zoletile®, Virvac, France) 5 mg/kg과 Xylazine (Rompun®, Bayer Korea, Korea) 5 mg/kg을 대퇴부 근육에 주사하여 마취한 후, 안구를 적출하여 4°C에서 4% paraformaldehyde로 고정하고 1% 완충액에 보관하였다. 안구의 각막과 수정체, 유리체를 제거하면 망막조직이 드러나고 망막의 중심오목에서 이측으로 2 mm 정도 떨어진 부위를 2×2 mm 크기로 망막조직을 떼어냈다. 떼어낸 망막을 얼음 위에서 아세톤으로 [70% 30분, 90% 30분, 100% 1시간 2차, 100%: JB-4 (A+C)=1:1 1시간] 탈수한 후 4°C에서 JB-4 (A+B+C) (GMA; JB-4, Polyscience, Warrington, PA)로 포매하였다. 4°C에서 16시간 중합과정을 거쳐 조직이 단단하게 굳어지게 하였다. 초박절기 (Leica Microsystems, Germany)로 1.5 µm 두께로 박절하였다. 효소조직화학반응을 일으키기 위해 변형된 Hansson & Schwartz (1983) 방법으로 망막조직 내 탄산탈수효소의 반응을 일으켰다. 용액 1 (0.00175 M CoSO₄, 0.056 M H₂SO₄, 0.0117 M KH₂PO₄, pH 5.3)과 용액 2 (0.157 M NaHCO₃, pH 7.63)를 17:40으로 배합된 반응매질에 6분간 반응시켰다. 증류수로 세 번 세척 후 0.5% (NH₄)₂S에서 1분간 반응 후 다시 증류수로 세척하였다. 슬라이드에 올려 말린 후 툴루이딘 블루로 대조염색을 시행하여 현미경 (Leica DM-LB, Hitachi Color Camera)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 망막 조직을 얻은 후 4% paraformaldehyde에 고정한 후 통상적인 방법에 따라 수세, 탈수, 파라핀 포매 과정을 거친 후 5 µm 두께로 자른 다음 현미경 슬라이드에 놓고 면역조직화학법으로 염색하기 위하여 파라핀을 제거하였다. 이후 pH 6.0의 10 mm/L citrated buffer로 옮긴 후 증류수로 세척하고 0.05% H₂O₂-methanol을 15분간 처리한 다음 1차 항체인 monoclonal anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, SC, USA)를 실온에서 1:1,000으로 희석하여 첨가하였다. Rat ABC staining system (Santa Cruz Biotechnology, Inc, SC, USA)에 있는 biotinylated secondary antibody를 첨가한 뒤 avidin and biotinylated horseradish peroxidase (ABC reagents)를 첨가하였다. 마지막으로 peroxidase substrates 내에서 incubation하였다. 염색된 조직은 charge-coupled devi-ces camera (Pulnix, MA, U.S.A)를 부착시킨 광학 현미경 하에서 관찰하여 화상을 컴퓨터의 모니터로 전송하고, image analysis system (GmbH, SIS, Munster, Germany)를 이용하여 측정하였다.

4. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 유전자 발현 변화 규명

전체 RNA는 TRI 시약 (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 추출하였다. 역전사는 42°C에서

60분간 4 µg RNA 및 200 U murine leukemia virus transcriptase (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)이 함유된 20 µL를 실시하였다. PCR 증폭은 5 µL의 RT 산물, 각각의 primer (10 pmol), 1.25 U Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 및 1 mM dNTP을 이용하였다. 95°C에서 3분간 초기 배양 후에, 95°C (1분), 55°C (1분) 및 72°C (1분)로 구성된 30 증폭 cycles을 실시하였으며 72°C에서 10분간 최종 extension을 실시하였다. 산물들은 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel을 1×TBE buffer에 전기영동 하였다. 특이 primer sets은 이미 알려진 cDNA 서열로부터 제작되었다: VEGF 수용체 mRNA: [5'-TCCACCA TGCCAAGTGGTCC (sense primer) 5'-AGGAAGCTCATC TCTCCTAT-3' (anti-sense primer)].

5. Western immunoblotting

각 샘플에 각기 150 µL의 lysis buffer (10× PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/mL Leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A)를 처리하여 균질화를 시켰다. 샘플을 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법 (1976)을 이용하여 각각 60 µg의 샘플들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단을 시켰고, 각각의 항체 (VEGF, beta actin)를 1% skim milk에 1,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1× TBS에 10분 간격으로 3번 세척하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 Enhanced Chemiluminoscent (ECL) 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

6. 통계처리

실험결과의 통계처리는 analysis of variance (ANOVA)로 하였으며, P 값<0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means±S.E.M로 하였다.

결 과

1. 당뇨병성 망막증 생체 모델에서 ACE 억제제 투여에 의한 생물학적 지표 영향

Sprague Dawley 중 흰쥐를 Control, STZ 처리군 및 captopril+STZ 처리군으로 분류하여 각각 6마리씩 총 18마리

Table 1. The physiological parameters of control, diabetic, and captopril plus diabetic rats on body weight, blood glucose, glycosylated hemoglobin, total cholesterol, triglycerides, and urine output. There was an increase of body weight, plasma glucose, glycosylated hemoglobin, total cholesterol, triglyceride, and urine output in STZ-treated diabetic group, compared to control. The physiological parameters of captopril plus STZ-treated diabetic group were not different from those of STZ-treated diabetic group ($p > 0.05$). Asterisks indicate statistical difference versus control group at $p < 0.05$.

	Group I (Control)	Group II (STZ-treated diabetic rats)	Group III (STZ+captopril)
Body weight (g)	423±11	301±35*	348±29*
Plasma glucose (mmol/L)	4.7±0.7	23.4±1.2*	19.3±1.4*
Glycosylated hemoglobin (% Hb)	5.2±0.8	13.1±1.0*	11.3±1.4*
Total cholesterol (mM)	1.96±0.14	3.49±0.55*	2.78±0.35*
Triglycerides (mM)	0.92±0.12	4.42±0.45*	3.12±0.76*
Urine output (mL)	14±1.6	82±12*	74±16*

이용하여 대사 상자를 이용하여 체중, 혈당 및 뇨량을 측정하였다. 실험결과 STZ 처리군에 대한 생리학적 parameter (혈당, 당화 헤모글로빈, total cholesterol, triglyceride 및 뇨량)들은 다소 억제되는 경향이 있었지만 유의성 있는 결과는 인정되지 않았다(Table 1).

2. 당뇨병성 망막증 생체 모델에서 ACE 억제제 투여에 의한 VEGF 활성 영향

당뇨병성 망막증시에 혈청중의 VEGF 농도를 측정하였다. 실험결과 STZ 처리군에서 VEGF 농도가 증가하였으며 이는 captopril+STZ 처리군에서 현저하게 감소하였다(Fig. 1). 망막조직을 이용하여 조사한 결과 STZ 처리군에서 beta actin mRNA 발현은 변화되지 않았으나 VEGF mRNA 발현은 증가하였다(Fig. 2). 단백질 반응에서도 STZ 처리군의 망막에서 VEGF 단백질 발현은 증가하였다(Fig. 2). 한편 captopril+STZ 처리군에서 당뇨에 의한 VEGF mRNA 발현 및 단백질 발현은 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 직접적으로 immunohistochemistry를 한 결과 STZ 처리군에서 ganglion cell layer, inner nuclear layer 및 outer nuclear layer에서 VEGF 발현이 증가하였으며 이러한 작용은 captopril+STZ 처리군에서 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

고 찰

당뇨병은 여러 장기의 혈관병증을 일으키는 복잡한 대사성 질환으로 당뇨병 환자들은 전반적인 눈의 변화가 관찰되는데 특히 망막에서 미세혈관병증이 많이 생긴다. 그러나 당뇨병성 미세혈관병증의 발생기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않고 있다. 당뇨병성 망막증에서 망막의 손상 변화는

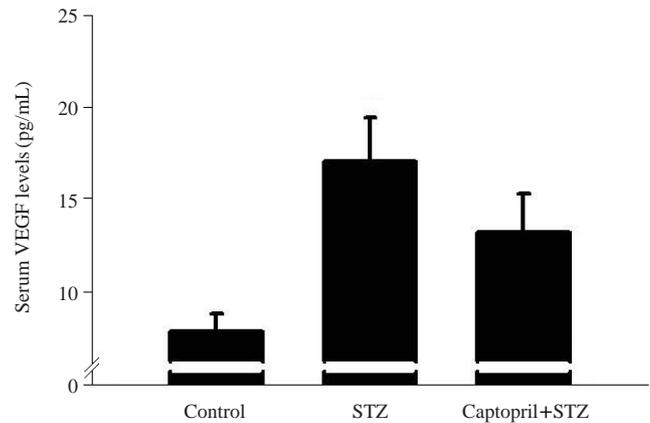


Fig. 1. VEGF levels in the serum of control, STZ-treated diabetic and captopril plus STZ-treated diabetic rats. Each plot represents the serum VEGF levels determined by ELISA kit for each animal. Results are given as mean±S.E.M. (n=6). There was an increase of serum VEGF levels in STZ-treated diabetic group and captopril plus STZ-treated diabetic group, compared to control. Asterisks indicate statistical difference versus control group at $p < 0.05$.

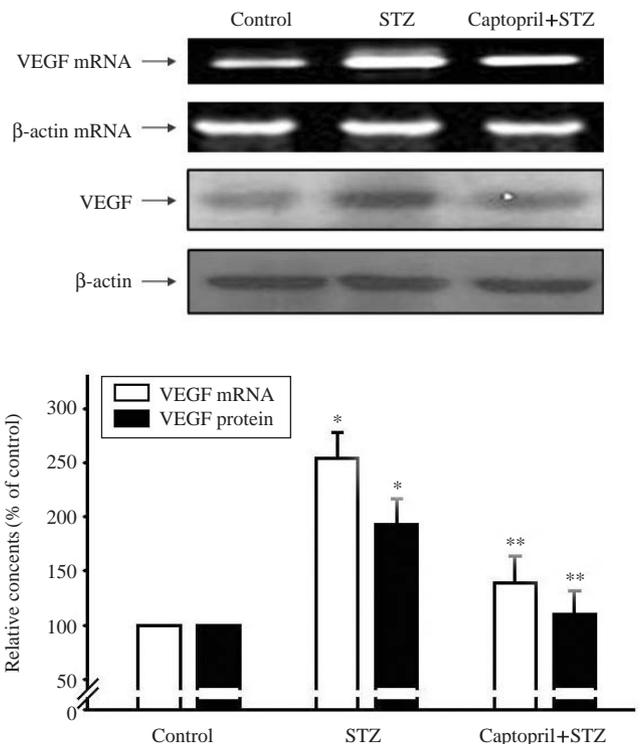


Fig. 2. The expression of VEGF mRNA and protein in the retina control, STZ-treated diabetic and captopril plus STZ-treated diabetic rats. Expression of VEGF mRNA in the retina was quantified by a RT-PCR method and VEGF protein by western immunoblotting analysis. Results are given as mean±S.E.M. (n=6). There was an increase of retina VEGF mRNA and protein levels in STZ-treated diabetic group, which was decreased by the treatment of captopril. Asterisks indicate statistical difference versus control group at $p < 0.05$. Double asterisks indicate statistical difference versus diabetic group alone at $p < 0.05$.

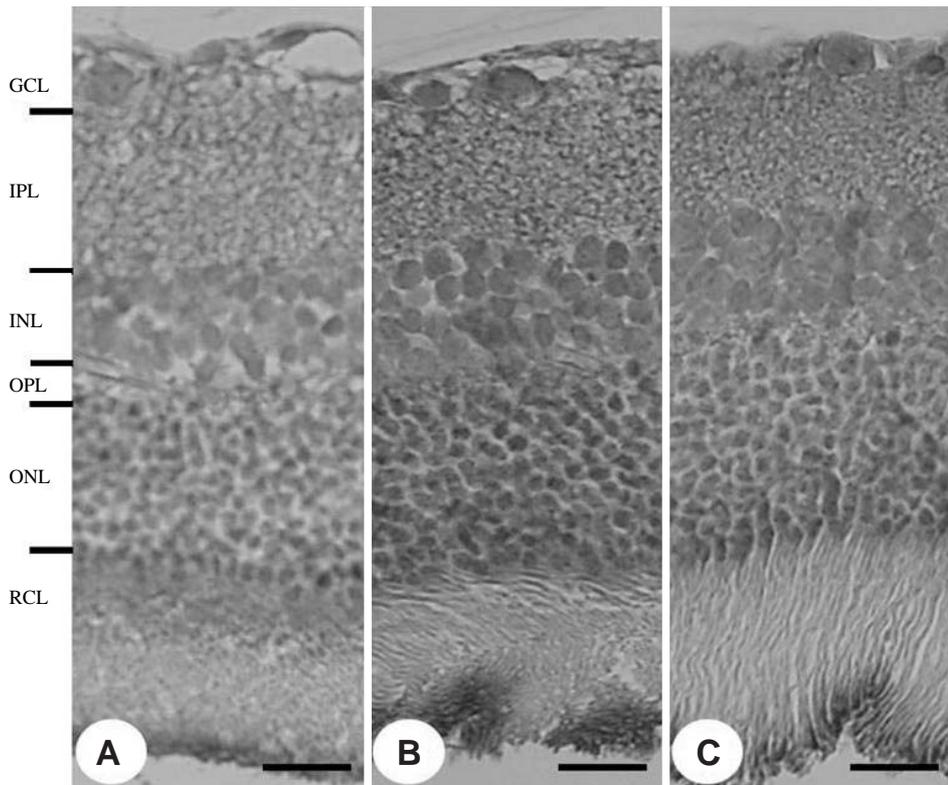


Fig. 3. Immunohistochemical examination of VEGF in the retina of STZ-treated diabetic rats with captopril. (A) Normal controls. (B) STZ-treated group. (C) captopril plus STZ-treated group. The retinal layers are indicated on the right side of the retinal section; ganglion cell layer (GCL), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL), outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL), layer of rods and cones (RCL). The expression of VEGF in INL and ONL was increased. Counterstained with hematoxylin. Scale bars=20 μ m.

망막혈관의 투과성 증가와 폐쇄로 나타난다(Penn et al., 2008). VEGF는 망막의 투과성 증대에 관련되는 대표적인 세포성장 인자로 알려져 있다(Crawford et al., 2009). 본 연구에서 STZ에 의해 유도된 1형 당뇨병의 혈청 및 망막의 VEGF 발현은 증가하였다. 이러한 결과는 실제로 당뇨병성 망막증 환자의 혈청 내 VEGF 농도가 증가하였다는 보고와 일치하여 실제 환자에서도 이러한 반응이 나타날 수 있다는 가능성을 제기하고 있다(Cavusoglu et al., 2007; Mycliwiec et al., 2008). 실제로 VEGF 차단제들을 처리하였을 때 당뇨병성 망막증의 발생이 약화된다는 최근 보고 역시 본 연구결과와 일치한다고 할 수 있다(Rodriguez-Fontal et al., 2009).

RAS는 당뇨병성 망막증의 발병에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Wilkinson-Berka, 2006). RAS의 중요한 인자중의 하나인 ACE는 망막에서도 발현이 되며 당뇨병성 망막증에서 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다(Ebrahimian et al., 2005). 본 연구에서는 당뇨병 그룹의 망막에서 VEGF 발현이 증가하였으며, 당뇨병성 그룹에서 증가되었던 혈청 VEGF 농도 증가 및 망막의 VEGF mRNA 및 단백질 발현이 ACE 억제제인 captopril 처리 시 현저하게 억제되었다. 이러한 연구결과는 2형 흰쥐 당뇨병성 망막증 모델에서 RAS의 또 다른 축인 angiotensin II receptor 차단제 처리 시 당뇨병시에 증가되었던 망막 손상 및 VEGF

mRNA 발현이 현저하게 차단되었다는 보고와 일맥 상통한다고 할 수 있다(Sugiyama et al., 2007). Zhang et al. (2004) 역시 망막에서의 VEGF 발현은 angiotensin type 1 및 2 수용체에 의해 매개되어진다고 하여 간접적으로 본 연구결과 가설을 지지해 주고 있다. 본 연구에서는 당뇨병성 망막증시에 ACE 억제제 처리 시 망막에서의 VEGF 발현이 억제된다는 것을 최초로 보고하고 있다. 본 연구에서 특징적인 것은 captopril을 처리하였을 때 당뇨병시에 증가되었던 혈청내 VEGF 농도가 차단되지 않았지만 당뇨병성 망막내의 VEGF 발현 증가작용은 현저하게 억제되는 것으로 나타났다는 것이다. 이러한 captopril에 의한 결과는 전신적인 RAS의 ACE 억제효과에는 관여하지 않고 captopril이 망막내의 ACE를 선택적으로 억제함으로써 나타난 망막내의 변화인 것으로 판단된다. van Bugenum et al. (2002)은 당뇨병 환자에게서 ACE 억제작용은 초자액의 VEGF 농도 감소와 연결될 수 있다고 하여 본 연구결과를 뒷받침해 주고 있다. 이에 대한 자세한 연구는 향후 밝혀져야 할 것으로 판단이 된다.

아울러 본 연구결과에서는 Control, STZ 처리군 및 captopril+STZ 처리군 내에서 형태학적 변화 및 VEGF 발현 변화를 면역화학 염색을 통하여 살펴보았다. 본 연구에서는 STZ 처리군에서 ganglion cell layer, inner nuclear layers 및 outer nuclear layer에서 현저한 VEGF 발현이 증가하는 것을

관찰할 수 있었으며 이러한 작용이 captopril+STZ 처리군에서 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 본 결과에서는 VEGF에 대한 세포 사멸기전을 살펴보지 못했지만, VEGF가 당뇨병성 망막증의 망막세포 손상을 유도한다는 보고에 근거할 때 세포 사멸이 유도될 가능성이 있는 것으로 판단이 된다(Ejaz et al., 2008). 결론적으로 captopril은 당뇨병성 망막증 발병의 주요한 인자라고 할 수 있는 VEGF 발현을 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 망막증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976.
- Brugts JJ, den Uil CA, Danser AH, Boersma E: The renin-angiotensin-aldosterone system: approaches to guide angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with coronary artery disease. *Cardiology* 112(4) : 303-312, 2008.
- Cavusoglu AC, Bilgili S, Alaluf A, Doan A, Yilmaz F, Aslanca D, Karaca B, Yuksel B, Topaloglu E: Vascular endothelial growth factor level in the serum of diabetic patients with retinopathy. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 39(3) : 205-208, 2007.
- Crawford TN, Alfaro DV 3rd, Kerrison JB, Jablon EP: Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 5(1) : 8-13, 2009.
- Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M: Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 88(11) : 1254-1264, 2008.
- Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS: Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(1) : 65-70, 2005.
- Ejaz S, Chekarova I, Ejaz A, Sohail A, Lim CW: Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes Obes Metab* 10(1) : 53-63, 2008.
- Gariano RF, Gardner TW: Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438(7070) : 960-966, 2005.
- Hansson GK, Schwartz SM: Evidence for cell death in the vascular endothelium in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 112(3) : 278-286, 1983.
- Kim JH, Kim JH, Yu YS, Cho CS, Kim KW: Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(3) : 621-628, 2009.
- Ko SH, Lee WY, Lee JH, Kwon HS, Lee JM, Kim SR, Moon SD, Song KH, Han JH, Ahn YB, Yoo SJ, Son HY: Clinical characteristics of diabetic ketoacidosis in Korea over the past two decades. *Diabet Med* 22(4) : 466-469, 2005.
- Korea Diabetes Association: Diabetic retinopathy. *Clinical Diabetes* 6(3) : 216-219, 2005.
- Mycliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Mycliwiska J, Lipowski P, Raczyska K: The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 79(1) : 141-146, 2008.
- Nakanishi Y, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Seigel GM, Negi A: Latanoprost rescues retinal neuro-glial cells from apoptosis by inhibiting caspase-3, which is mediated by p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *Exp Eye Res* 83(5) : 1108-1117, 2006.
- Novo G, Guttilla D, Fazio G, Cooper D, Novo S: The role of the renin-angiotensin system in atrial fibrillation and the therapeutic effects of ACE-Is and ARBS. *Br J Clin Pharmacol* 66(3) : 345-351, 2008.
- Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Harnnett ME: Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 27(4) : 331-371, 2008.
- Rodriguez-Fontal M, Alfaro V, Kerrison JB, Jablon EP: Ranibizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 5(1) : 47-51, 2009.
- Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, Darland DC, Young MJ, D'Amore PA: Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS ONE* 3(11) : e3554, 2008.
- Sarlos S, Wilkinson-Berka JL: The renin-angiotensin system and the developing retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(3) : 1069-1077, 2005.
- Sugiyama T, Okuno T, Fukuhara M, Oku H, Ikeda T, Obayashi H, Ohta M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N: Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res* 85(3) : 406-412, 2007.
- Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Thomas MC, Lew RA, Yarski M, Smith AI, Cooper ME: Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina. *Curr Eye Res* 29(6) : 419-427, 2004.
- van Bugenum MH, Polak BCP, Reichert-Thoen JWM, de Vries-Knopert WAEJ, van Hinsbergh VWM, Tangelder GJ: Angiotensin converting enzyme inhibiting therapy is associated with lower vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetol* 45 : 203-209, 2002.
- Wilkinson-Berka JL: Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6) : 752-765, 2006.
- Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH, Zimmet P, Son HY: Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* 368 : 1681-1688, 2006.
- Zhang X, Lassila M, Cooper ME, Cao Z: Retinal expression of

vascular endothelial growth factor is mediated by angiotensin type 1 and type 2 receptors. *Hypertension* 43(2) : 276-281, 2004.

< 국문 초록 >

당뇨병성 망막증의 당뇨병 합병증의 주요한 증상중의 하나로 망막의 구조적 기능적 변화를 초래한다. 레닌-안지오텐신 시스템은 당뇨병성 망막증의 발병에 주요한 역할을 담당하며 angiotensin I을 angiotensin II로 전환하는 데 담당하는 안지오텐신 전환 효소 (ACE)는 레닌-안지오텐신 시스템의 주요한 요소이다. VEGF는 실명을 일으키는 당뇨병성 망막증의 신생혈관 생성에

관여하는 주요한 인자로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 당뇨병성 망막증의 발생 기전 중 하나로 최근 연구가 진행되고 있는 VEGF의 발현과 안지오텐신 전환 효소 억제제를 이용한 VEGF 발현 억제효과의 규명을 통해 당뇨병성 망막증의 예방에 ACE 억제제가 효과가 있는지 ACE 억제제인 captopril을 이용하여 알아보고자 하였다. 본 연구에서는 streptozotocin 처리시 혈청 내 VEGF 농도는 증가하였으나 captopril (65 mg/kg) 치료에 의해 감소하지 않았다. 망막에서 관찰한 결과 당뇨군에서 VEGF mRNA 및 단백질 발현이 증가하였으며, 안지오텐신 전환 효소인 captopril에 의해서 차단되는 것으로 나타났다. 결론적으로 captopril은 1형 당뇨에 있어서 망막의 VEGF 발현 억제를 통해 망막 보호효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다.