

포도당 농도가 배양된 망막색소상피세포에서의 VEGF 및 HGF 발현에 미치는 영향

백철민 · 이현덕 · 김광수

계명대학교 의과대학 안과학교실

목적 : Vascular endothelial growth factor(VEGF) 및 hepatocyte growth factor(HGF)가 포도당 농도에 따라 망막색소상피세포에서 발현되는 정도의 변화를 연구하여 당뇨망막병증의 혈관신생에 대한 망막색소상피세포의 영향을 연구하고자 하였다.

대상과 방법 : 밀생상태의 인간망막색소상피세포(ARPE-19)를 RPMI 1640배지에 포도당 농도를 각각 5.5 mmol/L, 11 mmol/L 및 22 mmol/L로 맞추어 각각 3, 7, 14일간 배양한 후 Western blot 분석을 시행하였다. 회수한 세포에서 세포용해완충액을 넣은 후 원심 분리하여 상층액을 취하여 단백 정량 하였고, 분획의 일정량을 전기영동한 후에 nitrocellulose 종이로 전기이동을 실시하였다. 일차 및 이차항체와 반응시킨 다음 Enhanced Chemiluminescence kit를 이용하여 발광시키고 autoradiography를 실시하였다. VEGF 및 HGF의 단백 발현과 mRNA 발현과의 관계를 알아보기 위해 포도당을 처리한 세포로부터 RNaseB를 이용하여 RNA를 추출 후 역전사를 실시하여 얻은 cDNA로 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다.

결과 : VEGF와 HGF의 단백발현은 농도에 비례하는 양상을 보였다. VEGF는 14일째 22 mmol/L 포도당 군에서 11 mmol/L 군이나 5.5mmol/L 군 보다 많은 양의 단백 발현을 나타내었으나 mRNA 발현의 차이는 볼 수 없었다. HGF는 3일째 22 mmol/L 포도당 군에서 다른 군에 비해 보다 많은 양의 단백 발현을 나타내었으나 mRNA 발현은 측정되지 않았다.

결론 : 망막색소상피세포가 VEGF 및 HGF 등의 혈관생성인자를 생성하여 당뇨망막병증의 진행과정에 있어서 신생혈관의 발생에 관여함을 시사한다.

<한안지 44(11):2652-2657, 2003>

망막색소상피세포(Retinal pigment epithelium, RPE)는 부르크막과 광수용체 사이에 위치하는 단층세포구조로서 외측혈액망막장벽의 역할을 하며 광수용체의 정상기능과 망막하 공간의 수분 양 및 이온농도 조절에 중요한 기능을 한다. 당뇨병에서는 이러한 장벽기능의 소실로 시력저하의 주요 원인인 망막부종을

<접수일 : 2003년 5월 14일, 심사통과일 : 2003년 9월 3일>

통신저자 : 김 광 수

대구시 중구 동산동 194
계명대학교 동산의료원 안과
Tel: 053-250-7706, Fax: 053-250-7705
E-mail: kimks@dsmc.or.kr

* 본 논문의 요지는 2002년 대한안과학회 제87회 춘계학술대회에서 구연으로 발표 되었음.

* 2002년 5월 미국 포트 로더데일에서 개최된 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 연례 학회에서 포스터 발표되었음.

일으킨다.

Hiscott 등¹은 증식당뇨망막병증에서 견인열공망막박리의 막에는 RPE가 포함(5~20%)되어 있었으나 단순히 견인망막박리만 있는 경우에는 RPE가 거의 포함되지 않아서 RPE가 망막열공을 통해 유리체강내로 이동하여 막을 형성하고 이 과정에 혈관신생인자들이 관여할 것이라 하였다.

RPE에서는 혈관생성인자로 알려진 vascular endothelial growth factor (VEGF),² hepatocyte growth factor (HGF)³ 및 basic fibroblastic growth factor (bFGF) 등⁴이 생성되는데, Sone 등²은 RPE에서 과도 생성된 VEGF가 bFGF와의 상승작용으로 당뇨망막병증의 진행에 관여할 수 있음을 시사한 바가 있다. 그러나 이를 성장인자들이 고농도의 포도당 환경에 의해 생성이 증가되는 지와 당뇨망막병증의 진행에 어떠한 기전으로 관여하는지에 대해서는 아직 정확히 규명되지 않은 상태이다.

본 연구는 혈관생성인자로 알려진 VEGF 및 HGF

가 포도당 농도에 따라 RPE에서 발현되는 정도가 어떻게 변화하는지를 연구하여 당뇨망막병증의 진행에 있어서 혈관신생에 대한 RPE의 영향을 연구하고자 하였다.

대상과 방법

망막색소상피세포주(ARPE-19)를 American Type Culture Collection (USA)으로부터 구입하여 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)과 amphotericin B (1 µg/mL)를 첨가한 RPMI 1640 배지에서 37°C, 10% CO₂ 조건하에서 망막색소상피세포가 밀생상태가 되면 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO, USA)로 처리하여 계대배양하였고 3세대의 세포로 실험을 실시하였다.

포도당 (Sigma, USA)은 중류수에 녹인 후 멸균하여 포도당 농도에 따라 세 군으로 나누어 처리하였다. 정상 포도당 (NG)군은 5.5 mmol/L 포도당, 중간농도 포도당 (MG)군은 11 mmol/L 포도당, 고농도 포도당 (HG)군은 22 mmol/L 포도당을 함유한 배양액에 각각 3일, 7일 및 14일간 배양하였다. 위의 포도당 농도는 혈당 수치로는 각각 100 mg/dL, 200 mg/dL, 400 mg/dL에 해당한다.

포도당을 처리한 세포를 회수한 후 세포용해완충액을 넣고 얼음에서 30분간 둔 다음 원심 분리하여 상층액을 취한 후, 단백정량 kit (Biorad, USA)를 이용하여 분리한 단백질의 농도를 정량하였다. 얻은 단백질 분획의 일정량을 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후에 nitrocellulose paper (Millipore, USA)로 전기이동을 실시하였다. 그런 후 일차항체(VEGF (A-20), Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) 및 이차항체와 반응시킨 다음 Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham, USA)를 이용하여 발광시키고 autoradiography를 실시하였다.

포도당을 처리한 세포로부터 RNAzolB (Biotecx Laboratories Inc., USA)를 이용하여 RNA를 추출하여 RNA 2 µg, 5 mmol MgCl₂, 50 mmol KCl, 10 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 1 unit/µL RNase inhibitor (Perkin-Elmer, USA), 2.5 unit/µL MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer, USA), 1 mmol dATP, 1 mmol dTTP, 1 mmol dCTP 및 1 mmol dGTP를 함유한 반응혼합액으로 반응조건은 42°C에서 1시간, 99°C에서 5분,

4°C에서 5분간으로 하여 동일한 양의 RNA로 oligo-dT (16mer)를 이용하여 역전사를 실시하였다. 역전사로 얻은 cDNA로 Fig. 1에서와 같은 primer를 이용하여 PCR을 실시하였으며 동일한 cDNA 양으로 PCR한 것을 검정하기 위해 house keeping gene인 GAPDH도 함께 실험에 이용하였다.

결 과

VEGF 단백 및 mRNA 발현 측정을 위해 RPE를 5.5 mmol/L, 11 mmol/L 및 22 mmol/L 농도의

VEGF	
sense	5'-GAGTGTGTGCCCACTGAGGAGTCCAAC-3'
antisense	5'-CTCCTGCCGGCTCACCGCCTCGGTT-3'
HGF	
sense	5'-ATG-CTC-ATG-GAC-CCT-GGT-3'
antisense	5'-GCC-TGG-CAA-GCT-TCA-TTA-3'
GAPDH	
sense	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'
antisense	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'

Figure 1. Primers used for PCR.

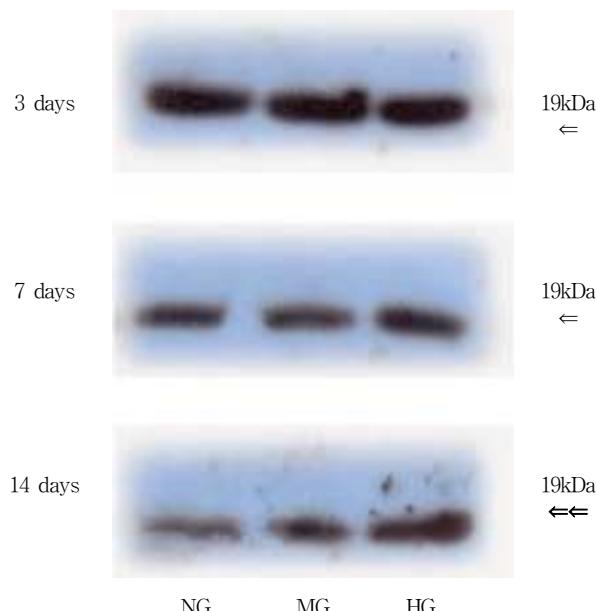


Figure 2. Western blot analysis for VEGF. At 14 days, level of VEGF protein expression was higher in HG group than other two groups (NG or MG). Concentration-dependent stimulatory effects of glucose on the expression of VEGF protein by Western blot analysis. Cells were treated with different concentrations of glucose. NG: Normal glucose (5.5 mmol/L), MG: Medium glucose (11 mmol/L), HG: High glucose (22 mmol/L).

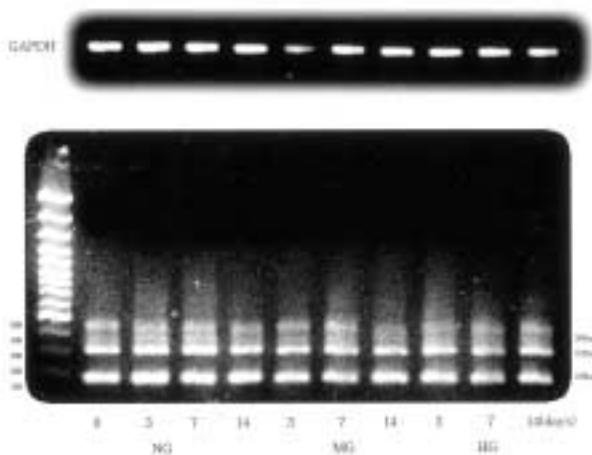


Figure 3. RT-PCR for VEGF. There were no differences between each group in expression of VEGF mRNA. Cells were treated with different concentrations of glucose. NG: Normal glucose (5.5 mmol/L), MG: Medium glucose (11 mmol/L), HG: High glucose (22 mmol/L).

포도당을 함유한 배지에 배양한 후 단백질을 회수하여 VEGF에 대한 Western blot 분석을 시행한 결과, 3일 및 7일째는 실험군에서 처리한 포도당 농도에 비례하여 VEGF 단백 발현이 증가하는 양상을 보이지 않았으나 14일째는 NG (5.5 mmol/L) 및 MG (11 mmol/L)군에 비해 HG (22 mmol/L)군에서 발현의 증가가 현저하였다(Fig. 2). VEGF의 단백 발현의 증가와 mRNA 발현 증가와의 관계를 알아보고자 RT-PCR을 시행한 결과 mRNA 발현의 양적 차이는 볼 수 없었다(Fig. 3).

HGF 단백 및 mRNA 발현 측정을 위해 RPE를 세 가지 다른 농도의 포도당을 함유한 배지에 배양한 후 단백질을 회수하여 HGF에 대한 Western blot 분석을 시행한 결과 7일 및 14일째는 실험군에서 처리한 포도당 농도에 비례하여 HGF 단백 발현이 증가하는 양상을 보이지 않았으나 3일째 HG (22 mmol/L)군에서 NG (5.5 mmol/L) 및 MG (11 mmol/L)군에 비해 발현의 증가가 현저하였다(Fig. 4). HGF 단백 발현의 증가와 mRNA 발현 증가와의 관계를 알아보고자 RT-PCR을 실시하였으나 mRNA의 발현은 측정되지 않았다.

고 찰

VEGF는 내피세포에 선택적으로 작용하는 혈관생성 인자이며 또한 강력한 혈관투과성인자로 알려져 있다.^{5,6} VEGF는 주로 저산소증에 의해 발현이 증가되고,⁷⁻⁹

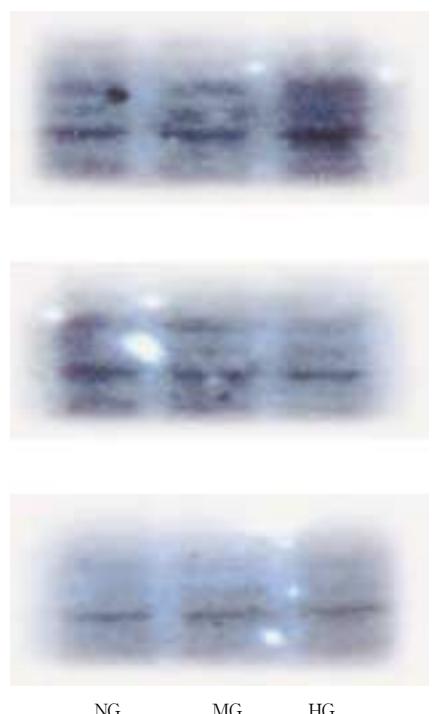


Figure 4. Western blot analysis for HGF. At 3 days, degree of expression was significantly high in HG group compared to NG group. Concentration-dependent stimulatory effects of glucose on the expression of HGF protein by Western blot analysis. Cells were treated with different concentrations of glucose. NG: Normal glucose (5.5 mmol/L), MG: Medium glucose (11 mmol/L), HG: High glucose (22 mmol/L).

그 외 epidermal growth factor,¹⁰ estrogen,¹¹ Prostaglandin E₁ 및 E₂,¹² transforming growth factor- β ,¹³ mutant p53¹⁴ 및 cobalt 등¹⁵에 의해서도 발현이 증가된다. 망막내에서는 RPE,^{16,17} 혈관주위세포,¹⁸ 내피세포,¹⁹ 신경교세포, 뮐러세포²⁰ 및 신경절세포 등²¹에서 생성되며 VEGF 수용체는 주로 망막의 내피세포에 존재한다.

Kim 등²²은 고농도의 포도당이 쥐의 혈관사이세포에서 직접적으로 VEGF 발현을 증가시킨다고 보고하면서 이는 VEGF가 당뇨신증의 발생과정에 관여함을 시사한다고 하였다. Rama 등²³은 고농도의 포도당 조건하의 사람의 혈관평활근세포에서 VEGF mRNA 및 단백발현의 증가를 보고하면서 이렇게 증가된 VEGF가 당뇨환자에서 혈관질환의 진행에 관여할 것이라고 하였다.

HGF는 중간엽세포에서 생성되며 간세포에 대해서는 성장인자로 상피세포에 대해서는 운동 및 분산인자로 작용한다.²⁴⁻²⁷ 간에서는 Ito 세포에서 형성되어 간세포에 강력한 유사분열물질로 작용하며 또한 사람의

내피세포²⁸ 및 rat의 사구체상피세포²⁹에서도 강력한 유사분열물질로 작용한다. Couper 등³⁰은 고농도의 포도당(25 mmol/L) 및 고삼투압(5 mmol/L 포도당 /20 mmol/L mannitol) 조건하에서 HGF의 분비가 증가된다고 보고하면서 HGF가 당뇨신증의 발생에 역할을 할 것이라고 하였다. HGF의 수용체는 c-Met 원형-암유전자로 알려져 있으며^{31,32} HGF가 중간엽세포에서 발현되는 것과는 달리 HGF 수용체는 주로 상피세포에서 발현되는 특징을 가지고 있다.³³⁻³⁵ 그러나 1998년 He 등³⁶은 RPE에서는 HGF와 c-Met 두 가지 모두를 발현시킬 뿐만 아니라 HGF에 화학주성반응을 보이고 c-Met의 tyrosine phosphorylation을 나타낸다고 보고하면서 이는 HGF가 RPE에 대해서 자가조절 성장인자임을 나타내고 HGF가 망막신생혈관 발생 등에 관여함을 시사한다고 하였다.

포도당이 RPE에 미치는 영향에 관한 연구로 Knorr 등³⁷은 사람 RPE에 대한 *in vitro* 실험에서 포도당농도가 증가할수록 망막색소상피세포의 증식과 성장이 촉진되어 포도당이 망막의 증식성 질환의 발생기전에 관여할 수 있음을 보고한 바 있다. 또한 Sone 등²은 소RPE를 고농도(16.5 mM)의 포도당을 함유한 배지에 10일 동안 배양 시켰을 경우, 저농도(5.5 mM)의 포도당, 혹은 짧은 기간(1~3일) 노출시킨 경우에 비해 배양액 내에서 VEGF양이 현저하게 증가됨을 관찰하여, RPE가 포도당에 노출 시 포도당의 농도가 높을수록, 노출시간이 길어질수록 세포 내 VEGF 생성이 증가됨을 보고하였다.

본 연구에서는 배양된 사람 RPE를 세가지 농도(5.5 mM, 11 mM, 22mM)의 포도당에 3일, 7일, 및 14일간 노출시킨 뒤, 각 군에서 VEGF와 HGF 단백 및 mRNA 발현의 정도를 비교하여 보았는데, VEGF 단백 발현은 14일째, HGF 단백 발현은 3일째 포도당의 농도에 비례하여 그 발현의 증가가 현저하였다. VEGF의 mRNA 발현의 차이는 볼 수 없어 VEGF의 단백 발현 증가는 포도당에 의한 VEGF 단백의 안정화에 기인할 가능성도 있을 것으로 추측되지만 정확한 기전은 알기 어려우며 HGF의 mRNA 발현 정도는 너무 미미하여 측정되지 않은 것으로 보여진다. VEGF는 RPE가 상당기간 고농도의 포도당 환경에 노출되어야만 생성이 증가되는 것으로 보이며² 그 기전은 아직까지 명확하게 알려져 있지 않다. HGF는 VEGF와는 달리 RPE가 짧은 기간동안 고농도의 포도당 환경에 노출되어도 생성이 증가하여 48시간에서 72시간 후에 최고에 달하며³⁰ 그 이후 감소되는 것으로 보이나 그 기전에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

배양된 RPE에서 포도당의 농도에 비례하여 VEGF

및 HGF 단백 발현이 증가되는 본 연구결과는 RPE가 증가된 포도당 농도 하에서 VEGF 및 HGF 등을 포함한 혈관생성인자의 생성을 촉진하게 되고, 이것이 당뇨망막병증의 발생과 진행과정에 있어서 혈관투과성의 변화나 신생혈관의 발생에 관여할 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- 1) Hiscott P, Gray R, Grierson I, Gregor Z. Cytokeratin-containing cells in proliferative diabetic retinopathy membranes. *Br J Ophthalmol* 1994;78:219-22.
- 2) Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, et al. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:193-8.
- 3) Kameran L, Nader R, Andrius K. Hepatocyte growth factor receptor in human RPE cells: implications in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:149-56.
- 4) Bost L, Aotaki-Keen A, Hjelmeland L. Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium *in vitro*. *Exp Eye Res* 1992;55:727-34.
- 5) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
- 6) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
- 7) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
- 8) 오정우, 서정봉, 곽노훈, 유진성. 여러 망막 질환에서 Cytokine의 역할. *한안지* 2001;42:151-60.
- 9) 곽노훈, 유진성, 허원. 맥락막 신생혈관 발생에서 VEGF와 Bruch 막의 역할. *한안지* 2000;41:1467-73.
- 10) Goldman CK, Kim J, Wong WL, et al. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993;4:121-33.
- 11) Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput WJ, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993;48:1120-8.
- 12) Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 1994;93:2490-6.
- 13) Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:6271-4.

- 14) Kieser A, Weich HA, Brandner G, et al. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994;9:963-9.
- 15) Ladoux A, Frelin C. Cobalt stimulates the expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:794-8.
- 16) Adamis AP, Shima DT, Yeo K-T, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:631-8.
- 17) Yang Q, Zwijnen A, Slegers H, et al. Purification and characterization of VEGF/VPF secreted by human retinal pigment epithelial cells. *Endothelium* 1994;2:73-85.
- 18) Aiello L, Northup J, Keyt B, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1538-44.
- 19) Simorre P, Guerrin M, Chollet P, et al. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3393-400.
- 20) Pierce EA, Avery R, Foley E, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:905-9.
- 21) Shima D, Gougos A, Miller J, et al. Cloning and mRNA expression of VEGF in ischemic retinas of Macaca fascicularis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1334-40.
- 22) Kim NH, Jung HH, Cha DR, Choi DS. Expression of vascular endothelial growth factor in response to high glucose in rat mesangial cells. *J Endocrinol* 2000;165:617-24.
- 23) Rama N, Wei B, Linda L, et al. Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;273:H2224-31.
- 24) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:1450-9.
- 25) Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* 1984;119:183-92.
- 26) Thaler FJ, Michalopoulos GK. Hepatopoietin A: partial characterization and trypsin activation of a hepatocyte growth factor. *Cancer Res* 1985;45:2545-9.
- 27) Gherardi E, Gray J, Stoker M, et al. Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5844-8.
- 28) Bussolino F, DiRenzo MF, Ziche M. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992;119:629-41.
- 29) Donnelly P, Alattar M, Prudhomme C, et al. Hepatocyte growth factor is motogenic for cultured renal epithelial cells. *J Amer Soc Nephrol* 1991;2:436.
- 30) Couper JJ, Littleford KD, Couper RTL, et al. High glucose and hyperosmolality stimulate hepatocyte growth factor secretion from cultured human mesangial cells. *Diabetologia* 1994;37:533-5.
- 31) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251:802-4.
- 32) Naldini L, Vigna E, Narcimham RP, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 1991;6:501-4.
- 33) Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-80.
- 34) Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 1996;119:591-600.
- 35) Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:639-44.
- 36) He PM, He S, Garner JA, et al. Retinal pigment epithelial cells secrete and respond to hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:253-7.
- 37) Knorr HLJ, Linde-Behringer M, Gossler B, Mayer UM. Human retinal pigment epithelium in vitro: Influence of low oxygen tension, glucose and insulin. *Ophthalmic Res* 1993;25:226-34.

=ABSTRACT=

The Effect of Glucose Concentration on Expression of VEGF and HGF in Cultured Human RPE Cells

Chul-Min Baek, M.D., Hyun-Duck Lee, M.D., Kwang-Soo Kim, M.D.

Department of Ophthalmology Keimyung University College of Medicine

Purpose: To evaluate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in response to high glucose concentration in human retinal pigment epithelial (RPE) cells.

Methods: After confluent adult human RPE cells (ARPE-19) were cultured in RPMI 1640 media containing three different concentration of glucose (5.5, 11 and 22 mmol/L) for 3, 7 and 14 days, Western blot analysis was performed. Cell pellets were lysed in lysis buffer and cell lysates were centrifuged to collect supernatant fractions for quantifying protein concentration. The proteins were subjected to electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. After the blots were incubated with primary and secondary antibody to VEGF or HGF consecutively, enhanced chemiluminescence and autoradiography were performed. To evaluate the relationship between protein and mRNA expression, RNA from glucose-treated RPE cells was obtained by using RNAzolB. After cDNA was obtained through reverse transcription of RNA, PCR of cDNA was performed by using primers.

Results: We found that incubation with different concentrations of glucose increased the protein expression of VEGF and HGF in concentration-dependent manner in RPE. At 14 days, level of VEGF protein expression was higher in 22 mmol/L glucose group than in other two groups (5.5 mmol/L or 11 mmol/L), but no differences of mRNA expression of VEGF were observed in each group. At 3 days, level of HGF protein expression was higher in 22 mmol/L glucose group than in other groups, but mRNA expression of HGF was not detected in all groups.

Conclusions: These results suggest that RPE cells may participate in angiogenesis in progression of diabetic retinopathy through production of VEGF and HGF.

J Korean Ophthalmol Soc 44(11):2652-2657, 2003

Key Words: Diabetic retinopathy, Hepatocyte growth factor, Retinal pigment epithelial cells, Vascular endothelial growth factor

Address reprint requests to **Kwang-Soo Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology Dongsan Medical Center Keimyung University College of Medicine

#194 Dongsan-dong, Jung-ku, Daegu 700-712, Korea

Tel: 82-53-250-7706, Fax: 82-53-250-7705, E-mail: kimks@dsmc.or.kr