

인간망막 내피세포주에서 고농도 포도당이 caspase-3 경로를 통해 세포자연사 유도

서은선 · 채수철* · 고은경 · 이종빈

전남대학교 생물학과

High Glucose Induces Apoptosis through Caspase-3 Dependent Pathway in Human Retinal Endothelial Cell Line

Eun Sun Seo, Soo Chul Chae*, Eun Gyeong Kho and Jong Bin Lee

Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract – Diabetic Retinopathy (DR) is a leading cause of blindness among adults in the western countries. Hyperglycemia is a condition, that induces apoptotic cell death in a variety of cell types in diabetes, but the mechanism remains unclear. The aim of the study is to understand the effects of high Glucose on Human Retinal Endothelial Cells. Retinal endothelial cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) containing 5, 25 and 50 mM Glucose, incubated for 24, 36 and 48 hours in humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Human Retinal Endothelial Cell Line (HREC) were characterized for morphology with different treatment by phase contrast microscopic analysis. Number of dead and viable cells was counted by trypan blue exclusion and supported by MTT assay. The intracellular Hydrogen peroxide (H₂O₂), a Reactive Oxygen Species (ROS) generation in high glucose conditions was assessed by FOX II assay and apoptosis by caspase-3 assay. The high glucose treated cells undergoing DNA fragmentation was witnessed by Agarose gel electrophoresis. We found that the cells incubated with 25 and 50 mM glucose containing medium for 48 hours altered the morphology of the cell, induced apoptosis and DNA fragmentation. The dead cell number were high in 25 and 50 mM when compared to the cells incubated with 5 mM glucose for 24, 36, and 48 hours. Also, the H₂O₂ levels and the activity of caspase-3 were increased in high glucose treated cells. **Conclusions/interpretation** : Our results demonstrated that elevated glucose induces apoptosis in cultured HREC. The hyperglycemia-induced increase in apoptosis may be dependent on caspase activation. The association between ROS generation and caspase-3 activation on high glucose treated cells is yet to be investigated.

Key words : HREC, diabetic retinopathy, apoptosis, caspase-3

서 론

당뇨병은 인슐린 부족 또는 세포내 인슐린에 대한 반응이 없는 것으로 포도당 분자가 세포 안으로 들어가지

* Corresponding author: Soo Chul Chae, Tel. 062-530-3395, Fax. 062-530-0306, E-mail. soochul@jnu.ac.kr

못하는 만성적인 신진대사 장애이며, 이러한 조건에서 당뇨 혈관 합병증이 일어날 수 있다(King *et al.* 1996; Brownlee 2001). 당뇨망막병증(DR: diabetic retinopathy)은 전 세계적으로 성인들의 시력장애와 실명을 일으킬 수 있다. 당뇨망막병증에서 세포들은 혈관 기능의 대부분을 수행하는 생물학적으로 활성화된 혈관의 안쪽 층 내피세포에 영향을 받는다(Rassam *et al.* 1995). 이러한 망막 내 혈관세포의 증식은 당뇨병에서 혈관 병의 원인이며, 그 기작은 분명하게 밝혀지지 않았다.

기존 연구에서는 산화적 스트레스는 인간질병의 퇴행성 진행의 다양성에 영향을 주는 것으로 보고하였다(Cutler *et al.* 1991). 이러한 산소와 질소 종을 포함하는 자유 라디칼인 활성산소종(ROS: Reactive Oxygen Species)은 내피의 중간매개 신호에 장애를 일으킨다. 과산화수소 지속적인 ROS는 세포독성의 원인으로 간주된다(Cutler *et al.* 1991; Buttke and Sandstrom 1994). 고농도 포도당에서 과산화수소는 너무 많은 양이 생성되고, 정상 조건에서 ROS는 천연 항산화에 의해서 중화 되지만 병적인 조건에서는 신체 안에서는 산화와 항산화 사이에 불균형이 있다. 이러한 불균형을 “산화적 스트레스”라고 한다. 산화적 스트레스의 결과로써 ROS는 단백질, 지질, DNA와 같은 거대분자에 손상을 유도한다(Buttke and Sandstrom 1994). 또한 ROS는 당뇨병과 연관된 조직에 손상을 줄 수 있다는 것이 증명되었다. 세포자연사는 다양한 조직 형태의 세포제거에서 선택적인 과정이다.

본 연구는 산화적 스트레스가 다른 세포신호 전달을 조절함으로써 세포자연사를 유도하는 것을 알아냈다(Buttke and Sandstrom 1994). 하지만 고혈당증이 유도하는 산화적 스트레스의 정확한 기작은 명확히 아직까지는 보고되지 않았다. Pro caspase 또는 active caspase인 caspase-3는 동물세포의 세포자연사에서 중요한 매개자로서 확인되었으며, caspase-3의 활성화는 고농도 포도당에 유도되는 사람 태줄정맥(umbilical vein) 내피세포 추출물에서 확인되었다(Feng *et al.* 2000). 또한 고농도의 포도당으로 인해 유도되는 세포자연사 과정 동안 내피세포에서의 caspase-3 활성화 기작과 매개자는 완전히 밝혀지지 않았다. 세포자연사 진행 중 시작 신호 후에 그것들은 세포자연사 연쇄반응의 활성화, 증폭, 실행에 역할을 하는 것 같이 보인다. Caspase 활성화는 세포의 DNA 회복 효소와 구조요소 제거를 통해 세포자연사에 관여한다(Buttke and Sandstrom 1994).

본 연구는 인간망막 내피세포주(HREC: Human Retinal Endothelial Cell)에서 고농도 포도당 증식, 세포자연사, DNA 분절화에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

본 실험에 사용된 인간망막 내피세포주(Human Retinal Endothelial Cell line)는 American Type Culture Collection (Bethesda, USA)로부터 분양 받아 이 실험에 사용하였다. 배양용 배지는 DMEM (Gibco, USA) 배양액에 10%의 fetal bovine serum (FBS: Gibco, USA), fungizone ($3 \mu\text{L mL}^{-1}$) 및 antibiotics ($10 \mu\text{L mL}^{-1}$)를 첨가해 사용하였다. 세포 배양은 75 cm^2 의 배양용 플라스크(Nunc, USA)에 일정량의 배양액을 넣어 37°C , 5% CO_2 로 조정된 CO_2 항온기 (Forma Scientific, USA)에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid: Gibco, USA)로 부유 시킨 후 0.4% trypan-blue로 염색하여 혈구계산기(hemocytometer)로 세포수를 산정하였다.

2. 고혈당 처리

HREC는 $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 세포수로 계수한 다음 70% 성장 할 때까지 배양하고 정상적인 포도당 또는 정상혈당 5 mM과 고농도 포도당 또는 고혈당 25, 50 mM이 추가된 배양액에 옮겼다. 포도당 농도는 25 mM 및 50 mM가 내피세포(Feng *et al.* 2000; Yasuo *et al.* 2002)와 망막 신경 세포(Santiago *et al.* 2007)에서 고혈당 스트레스를 유발하는 이전 연구 결과를 기초로 선택하였다. 처리된 세포는 37°C , CO_2 항온기에서 24, 36, 48시간 동안 노출시켰다.

3. 형태학적 분석

배양된 인간망막 내피세포주는 위상차현미경(Carl Zeiss Axio Vision Product/suite CD 29, USA)으로 각각 24, 36, 48시간 후에 형태변화를 관찰하였다.

4. Trypan blue exclusion assay

처리한 내피세포의 생존은 0.4% trypan blue로 염색하여 세포수를 산정하였다. 각각 처리 후 트립신 처리 후 떼어낸 세포는 300 g에서 5분간 원심분리 시켜 모아진 세포는 차가운 PBS로 세척하였다. 그 pellet을 trypan blue 염색액에서 분주하였다. 살아있는 세포 혹은 생존 가능한 세포는 염색되지 않지만, 반면 죽은 세포는 푸른색 염색액에 염색된다. 염색된 죽은 세포의 수는 광학현미경을 이용하여 혈구계산기로 산정하였다. 생존한

세포는 MTT assay (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 통해서 확인하였다.

5. 과산화수소 발생량 측정

과산화수소 생성은 FOX-II 시약을 사용해서 측정하였다. 변형된 FOX-II 방법은 처리된 세포에서 과산화수소를 검출하는 데 사용하였다 (Jaffar *et al.* 1996; Amar *et al.* 2002). Coloured complex의 흡광도는 550 nm에서 측정하였다. 처리된 세포 상층액은 차가운 lysis buffer에 배양시키고 얻어진 pellet과 상층액이 사용된다. 이 세포 lysates는 phosphate buffer에 희석시킨 것 1 mL에 colour 시약 2 mL을 넣고 섞은 후에 실온에서 30 분간 두었다. 형성된 분홍색의 흡광도는 550 nm에서 측정하였다.

6. Caspase-3 활성 측정

HREC에서 caspase-3의 활성은 caspase-3 calorimetric assay를 사용하여 측정하였다 (Nicholson 1995). 이 방법은 450 nm 흡광도에서 pNA의 방출에 따른 caspase-3에서의 Ac-DEVD-pNA의 펩타이드 기질 가수분해를 기본으로 한다. 각각 다른 시간으로 배양시켜 처리된 HREC의 세포 lysates는 caspase 기질B (Ac-DEVD-pNA)과 함께 2 시간 동안 배양되고 흡광도는 450 nm에서 측정하였다.

7. DNA 분절화

처리된 HREC는 pellet으로 만들고 lysis buffer를 사용하여 용해시킨다. DNA는 phenol-chloroform mixture로 추출하였다 (Stanley 1991). 추출된 DNA는 다른 lane (40 mg lane⁻¹)의 아갈로스 겔 위에 ladder DNA와 함께 loading한다. 겔을 자외선 조사기 (Vilber Lourmat TFX-20, France)를 통해 DNA 분절화를 관찰하였다.

8. 통계학적 분석

실험 결과 값은 평균±표준편차(SD)로 나타내었다. 평균값은 student로 비교하였다. 각각 다른 배양시간에 다양한 포도당 농도가 처리된 세포자연사의 차이점은 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 고혈당에 의한 시간 및 처리 농도에 따른 영향

생체 내에 당뇨병이 걸린 만성적인 고혈당증을 만들어내기 위해서 인간망막 내피세포주를 25 mM과 50 mM

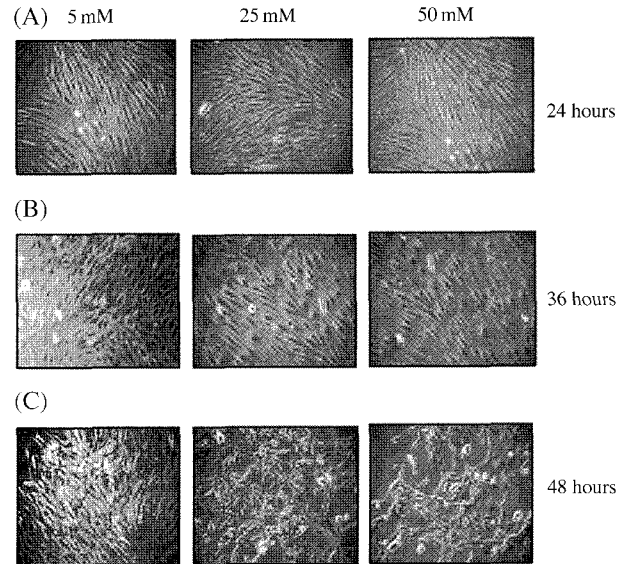


Fig. 1. Elevated Glucose concentration alters HREC morphology : HREC cultured in a medium containing different Glucose concentration (5, 25 and 50 mM) was incubated for various time periods. A, B & C. Shows the treated HREC morphology visualized at the end of 24, 36 and 48 hours respectively under phase contrast microscopy.

포도당에서 48시간 동안 배양시킨다. 고농도의 포도당이 유도하는 산화적 스트레스 메카니즘의 가능성을 연구하기 위해서 세포는 5 mM 포도당에서 대조군과 같은 기간 동안 배양시켰다. 인간망막 내피세포주는 포도당 농도(5, 25, 50 mM)에 시간별(24, 36, 48 hours) 노출시켰다. 24, 36시간에서는 세포의 형태에 변화가 없었지만(Fig. 1A, 1B), 48시간에서 50 mM 처리한 세포에서는 수축되었고(Fig. 1C), 25 mM 포도당에서 배양한 세포와 비교했을 때 둥근 모양의 세포의 수가 많아졌다.

2. 세포 생존율 측정

포도당 농도의 증가가 세포 생존의 감소와 관련이 있는지 알아보기 위해서 trypan blue exclusion assay로 시행하였다. 인간망막 내피세포주는 5, 25, 50 mM의 포도당이 포함된 IMDM에서 24시간 동안 배양되었고 관찰된 대조군과 비교하여 세포의 수나 형태에 변화가 없었다. 48시간 배양에서 죽은 세포는 고농도의 포도당에서 Fig. 2와 같이 더 많이 관찰되었다. 36시간 동안 다른 포도당 농도에 배양된 것은 세포자연사 소체의 변화가 없었다.

3. 과산화수소 발생량 측정

고농도에서 유도되는 세포자연사에서 과산화수소 발

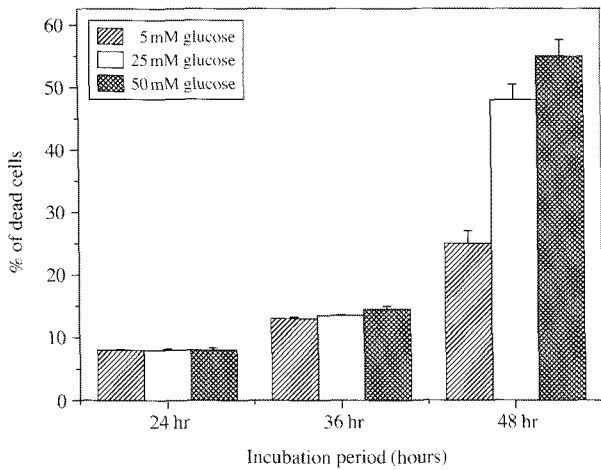


Fig. 2. Elevated Glucose decreases cell viability : HREC culture was incubated in 5, 25 and 50 mM Glucose for 24, 36 and 48 hours. 25 and 50 mM glucose were taken as the hyperglycemic concentration. The cell viability was assessed using trypan blue exclusion method. Values are means \pm SD of three independent experiments with duplicate dishes. These data are statistical significant ($p < 0.05$) in comparison to control groups.

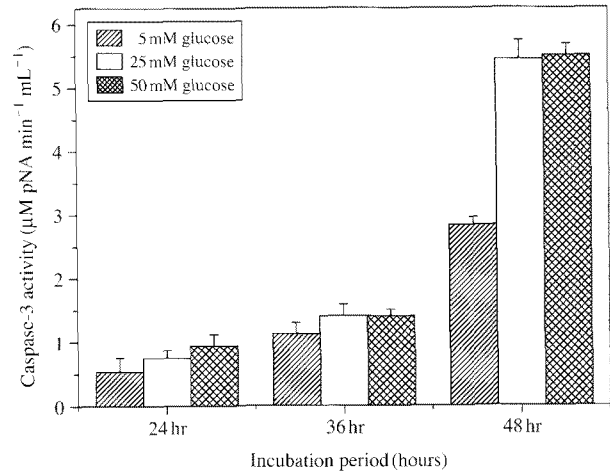


Fig. 4. Elevated Glucose causes caspase-3 activation : HREC were cultured in 5, 25 and 50 mM glucose for 24, 36 and 48 hours. The activity of caspase-3 like enzymes increase in high glucose treated cells and the enzyme activity was determined with AC-DEVD-pNA substrate. Values are means \pm SD of three independent experiments with duplicate dishes. These data are statistical significant ($p < 0.05$) in comparison to control groups.

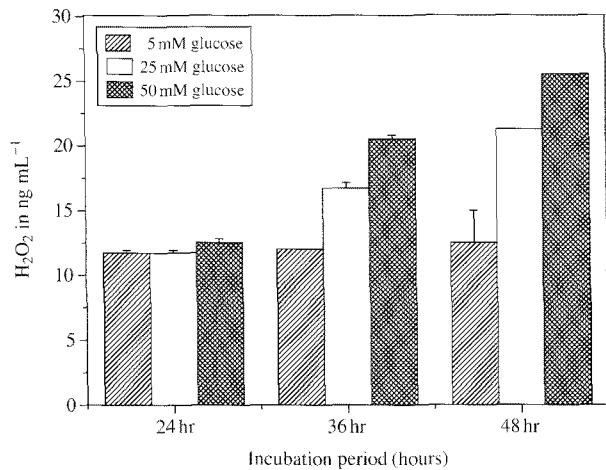


Fig. 3. Elevated Glucose-induced intracellular H₂O₂ formation in HREC : HREC were exposed to different Glucose concentration (5, 25 and 50 mM) for 24, 36 and 48 hours. Time and dose effect of high glucose results in generation of H₂O₂ in HREC was measured using FOX II reagent. Values are means \pm SD of three independent experiments with duplicate dishes. These data are statistical significant ($p < 0.05$) in comparison to control groups.

생여부를 알아보기 위해서 FOX-II 약품을 사용하였다. 고농도의 포도당이 처리된 인간망막 내피세포주에서 ROS 유발은 시간에 따라 증가함을 알 수 있었다. 고농도의 포도당 (25, 50 mM)에서 48시간 동안 배양한 세포에서의 과산화수소의 발생은 다른 포도당 농도에서 24,

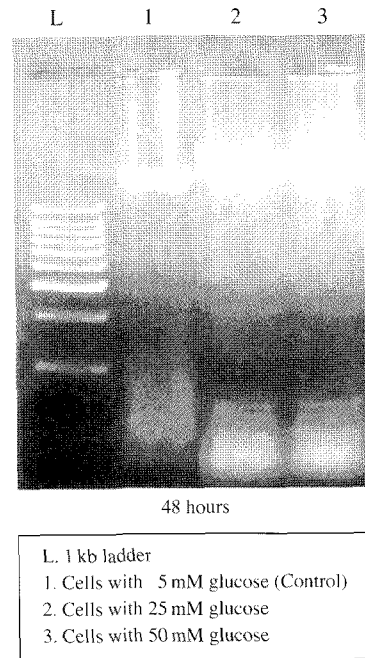


Fig. 5. Elevated Glucose causes DNA fragmentation : HREC treated with different glucose concentration (5, 25 and 50 mM) and incubated for various time periods of 24, 36 and 48 hours. The DNA was extracted and loaded onto the Agarose gel. The figure shows the treated HREC DNA bands at the end of 48 hours as visualized under UV-transilluminator.

36시간 배양한 세포와 비교했을 때 매우 높았다 (Fig. 3). 이러한 ROS 유발은 인간망막 내피세포주에서 고농도

포도당에 유도되는 세포자연사와 관련이 있는 것으로 사료된다.

4. 고농도 포도당에서 유도되는 caspase-3 활성화

Caspase-3는 다양한 세포자연사에서 중요한 역할을 하고 있다. 활성화된 caspase-3가 ROS 유발과 고농도 포도당에 유도되는 세포자연사에 연관이 있는지 조사하였다. Caspase의 활성화는 Ac-DEVD-pNA를 통해서 확인되었다. Fig. 4와 같이 다양한 포도당 농도에서 시간별로 배양을 한 것을 보아 고농도 포도당은 caspase-3 활성화 증가를 유도할 수 있다. 세포자연사의 초기 신호라고 생각되는 caspase-3 활성화는 25 mM과 50 mM 포도당에서 24시간 배양한 세포에서 증가하였다.

5. DNA 분절화

25, 50 mM 포도당에서 48시간 동안 배양된 인간망막 내피세포주에서 나온 DNA가 일반적인 뉴클레오솜 내의 분절화를 증명하였고(Fig. 5), 포도당 5 mM를 48시간 배양된 세포에서 DNA 분절화는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 실험에서는 고농도 포도당이 배양된 인간망막 내피세포주에 있는 caspase 활성화에 의해 세포자연사를 일으키는 원인이 된다는 것을 증명하였다.

고혈당증은 당뇨병병증의 발생에 1차적인 병원성 요인으로, 다양한 종류의 세포에 손상 효과를 발생시킨다(David *et al.* 2003). 선행된 보고에서는 caspase-3 활성화(Mohr *et al.* 2002)에 의해 당뇨병이 있는 망막 세포(Abu *et al.* 2004; Martin *et al.* 2004; Barber *et al.* 2005)에 세포자연사를 유발할 수 있다는 것을 보여주었다. 망막에 caspase에 관계없는 세포자연사와 관련된 몇몇 보고가 있지만, 당뇨병병증과 관련되지 않는다. 여러 가지의 증거와 함께, 고농도 포도당 처리된 인간망막 내피세포에 있는 ROS의 생성과 caspase 효소활성에 의해 세포자연사가 유도된다고 보고하고 있다. 현재 실험 조건에서, 고농도 포도당에서 죽은 세포의 수, 활성산소종 유발, caspase-3 활성화, DNA 분절화가 증가한다는 것을 확인했다. 세포의 핵 응축 및 과립 부스러기와 같은 형태학상 변화는 세포자연사 소체의 두드러진 특징이다(Jiandi *et al.* 1999). 고농도 포도당에 의해 처리된 세포에서 수축된 세포를 위상차현미경으로 관찰한 결과, 농도와 시간 의존적으로 세포 생존 능력이 감소하였다.

ROS 발생은 세포자연사를 일으키는 원인으로 증명되었다(Sato *et al.* 1979; Vaux and Strasser 1996; Wang *et al.* 1998; Bhat and Zhang 1999). ROS의 유발이 당뇨병 혈관 합병증(Baynes 1991; Giugliano *et al.* 1996) 발생에 중요한 역할을 할지도 모른다. 또한 세포 내 과산화수소 생성량 분석 결과, 처리 시간에 따라서 포도당 농도 의존적으로 현저하게 증가한다는 것을 알 수 있었다. HREC에 고농도 포도당에 의한 세포자연사의 유발과 ROS 생성이 관계가 있으나 아직 증명되지는 않았다. 따라서 고농도 포도당에 의해 유도된 세포자연사의 분자 메커니즘은 인간망막 내피세포에서 더 많은 연구를 필요로 한다.

Caspases는 많은 apoptotic 메커니즘에 있는 중요한 역할을 하고 있다. 기 수행된 보고에 의하면, 고혈당증이 다양한 caspases를 활성화하는 신호 cascade를 통해서 세포자연사를 촉진한다고 보고하였다(David *et al.* 2003). Caspase-3는 다른 caspase의 활성화와 죽음 신호를 억제 하며 망막 신경 세포의 경우에는 세포자연사는 caspase 활성화는 무관하다(Santiago *et al.* 2007). 따라서 고농도 포도당이 처리된 망막내피세포에서 추출한 caspase-3를 조사하였다. 그 결과 caspase-3 활성화는 포도당 농도, 시간 의존으로 관찰하였다. 더 나아가 고포도당이 처리된 세포에 있는 apoptotic 상태는 핵 DNA의 분절화로 뚜렷이 확인되었다.

이 연구에서 결론적으로 고포도당이 인간망막 내피세포주에서 세포자연사를 유발하고, 이는 당뇨병병증에서 내피 기능장애에 대한 이전의 결과를 뒷받침합니다. 또한 이러한 세포자연사는 caspase-3 활성화에 의존하고 있음을 시사한다.

적 요

당뇨망막병증은 서구에서 성인들의 실명을 일으키는 원인이다. 당뇨병이 있을 때 고혈당은 여러 세포 형태에서 세포자연사를 유도하지만 그 기작은 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구의 목적은 인간망막 내피세포에서 고혈당 포도당이 세포자연사에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 망막 내피세포는 5, 25, 50 mM 포도당이 포함된 IMDM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조정된 항온기에서 24, 36, 48시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 포도당을 처리한 인간망막 내피세포 형태의 특징은 위상차현미경으로 관찰하였고, 세포의 생존은 MTT assay를 통해 산정하였다. 고농도 포도당에서 활성산소종인 세포 내의 H₂O₂는 FOX II assay와 caspase-3 assay에 의한 세포자연사를 통해 측정하였다. 고농도의 포도당을 처리한 세포

에서의 DNA 분절화는 아가로스 겔 전기영동을 통해 관찰하였다. 25, 50 mM 포도당을 포함한 배양액에 48시간 동안 배양한 세포는 형태가 변하고, 세포자연사에 의해 유도된 DNA 분절화를 관찰 할 수 있었다. 25, 50 mM의 포도당에서 배양한 세포와 5 mM 포도당에서 24, 36, 48 시간 배양한 세포와 비교했을 때 25, 50 mM에서 죽은 세포의 수가 더 많았다. 또한 과산화수소의 양과 caspase-3의 활성은 고농도 포도당을 처리한 세포에서 증가하였다. 결론적으로 고농도 포도당이 배양된 인간망막 내피세포에서 세포자연사를 유도하는 것을 증명하였고, 고혈당증의 유도로 caspase 활성화에 의존적인 세포자연사는 증가하였다. 고농도의 포도당이 처리된 세포에서 활성산소종 유발과 caspase-3 활성화간의 관계는 아직 조사되지 않았다.

사 사

본 연구는 중소기업청의 실험실 창업사업으로 수행된 연구결과임.

참 고 문 헌

- Abu El, L Dralands, L Missotten, IA Jadaan and K Geboes. 2004. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest. Ophthalmol Visual Sci.* 45:2760-2766.
- Amar KP, B Kumar, UK Madhusoodanan, N Sudhakar and J Jose. 2002. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science* 83:10.
- Barber AJ, DA Antonetti, TS Kern, CE Reiter, RS Soans, JK Krady, SW Levison, TW Gardner and SK Bronson. 2005. The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest. Ophthalmol Visual Sci.* 46:2210-2218.
- Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412.
- Bhat NR and P Zhang. 1999. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinase in an oligodendrocyte cell line : role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* 72:112-119.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- Buttke TM and PA Sandstrom. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15:7-10.
- Cutler RG, J Plummer, K Chowdhury and C Heward. 1991. Oxidative stress : from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:S31-S38.
- David AA, H Steven, V Mira, RJ Martin and YM Muhamed. 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *The FASEBJ* 17:908-910.
- Feng HM, LH Shing, LS Chiau, HJ Por and LSY Shoei. 2000. Glucose-induced apoptosis in Human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH₂-terminal kinase and Caspase-3. *Circulation* 101:2618-2624.
- Giugliano D, G Paolisso and A Ceriello. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.
- Jaffar NZ, TS Jarad, LK Eddie and WP Simon. 1996. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in Plasma : Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem. J.* 313:781-786.
- Jiandi Z, RC Mary, HA Yusuf and OM Lina. 1999. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies : bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 145:99-108.
- King GL, M Kunisaki, Y Nishio, T Inoguchi, T Shiba and P Xia. 1996. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 45:105-108.
- Martin PM, P Roon, TK Van, V Ganapathy and SB Smith. 2004. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest. Ophthalmol Visual Sci.* 45:3330-3336.
- Mohr S, X Xi, J Tang and TS Kern. 2002. Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients. *Diabetes* 51:1172-1179.
- Nicholson DW. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- Rassam SM, V Patel and EM Kohner. 1995. The effect of experimental hypertension on retinal vascular autoregulation in humans : a mechanism for the progression of diabetic retinopathy. *Exp. Physiol.* 80:53-68.
- Santiago AR, AJ Cristovao, PF Santos, CM Carvalho and AF Ambrosio. 2007. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiology of Disease* 25:464-472.
- Sato Y, N Hotta, N Sakamoto, S Matsuoka, N Ohishi and K Yagi. 1979. Lipid peroxide level in the plasma of diabetic patients. *Biochem. Med. and Met. Biol.* 21:104-107.
- Stanley MR. 1991. Experimental techniques in bacterial genet-

- ics. *Analytical Biochemistry* 192:254.
- Vaux DL and A Strasser. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2239-2244.
- Wang X, JL Martindale, Y Liu and NJ Holbrook. 1998. The cellular response to oxidative stress : influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 333: 291-300.
- Yasuo I, C David and R Neil. 2002. Hyperglycemia-induced apoptosis in Human Umbilical vein endothelial cells : inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 51:159-166.

Manuscript Received: February 3, 2009

Revision Accepted: February 18, 2009

Responsible Editor: Kyung Jin Lee