

금 나노입자의 VEGF에 의해 유발된 혈관 내피세포의 신생혈관형성 억제 효과

최승현 · 유근창² · 김인숙³ · 채수철^{1,*}

전남대학교 대학원 생물과학생명기술학과, ²동신대학교 안경광학과,

³초당대학교 안경광학과, ¹전남대학교 생물학과

Antiangiogenic Effects of Gold Nanoparticles VEGF-induced Vascular Endothelial Cells

Seung-Hyun Choi, Geun-Chang Ryu², In-Suk Kim³ and Soo-Chul Chae^{1,*}

School of Biological Sciences and Biotechnology, Chonnam National University

²Department of Optometry and Optic Science, Dongshin University

³Department of Optometry of Chodang University

¹Department of Biology, Chonnam National University

Abstract – Angiogenesis is an important event involved in cell growth and wound healing process. However, the imbalance of growth factors causes diseases, such as ocular, inflammatory diseases. One of treatment of these diseases is to suppress the formation of blood vessels. Function and mechanism of gold nanoparticles (AuNPs) in the formation of blood vessels is not yet proved. Pigment epithelium derived factor (PEDF) is currently being offered anti-angiogenic materials. In this study, we postulated that AuNPs might have the ability to inhibit angiogenesis, the pivotal step in tumor growth, invasion and metastasis. We have demonstrated that AuNPs could inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) induced cell proliferation, angiogenesis in bovine retinal endothelial cells.

Key words : angiogenesis, bovine retinal endothelial cells, gold nanoparticles, VEGF

서 론

신생혈관 형성의 과정은 상당히 복잡한 과정인데 특히 다른 세포로부터 발현되는 다양한 유전자가 관여하고, 여러 과정의 복합적인 결과의 산물이다. 그러나 실험실의 조건에서는 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 다양한 망막 혈관 질환에서 큰 역할을 하는 것으로 알려졌다(Carmeliet 2000). VEGF, 섬유아세

포 성장인자(fibroblast growth factor, FGFs)와 같은 많은 혈관내피 성장인자가 신생혈관 형성에 연관이 있다. FGF와 VEGF와 같은 성장인자는 혈관 기저막을 분해하는 프로테아제, 플라즈미노겐 활성화인자를 분비하는 내피세포를 유도하고, 이는 기질 안으로 세포 침윤과 새로운 혈관형성을 유도한다. 따라서 VEGF와 FGF2는 신생혈관 형성에 있어서 가장 중요한 인자들이다(Cross and Claesson-Welsh 2001). 이러한 인자들의 불균형은 세포 성장을 억제하는 등 다양한 질환을 야기한다. 따라서 신생혈관 형성을 억제함에 있어 VEGF는 중요한 표적이 될 것이다.

지금까지 알려진 결과에서 VEGF 활성화조절은 망막혈관

* Corresponding author: Soo-Chul Chae, Tel. 062-530-3390, Fax. 062-530-0304, E-mail. soochul@jnu.ac.kr

형성을 억제한다. 망막에 존재하는 모세혈관으로부터 비정상적인 혈관의 형성과 망막 혈관 생성은 당뇨병망막증과 같은 안구 질환의 복합적인 과정이다. 신생혈관의 형성은 시각에 중요한 역할을 하는 조직의 손상과 섬유화를 야기시킨다. 기존의 치료법인 레이저 광응고술은 짧은 기간 동안 신생혈관의 형성을 억제하는데 효과적이다. 그러나 이것은 망막의 조직을 파괴를 일으키는데 이것은 실명을 야기하기도 한다. 그러나 망막신생혈관 치료의 표적 분자기작은 더 좋은 치료 결과와 낮은 부작용을 낳는다 (Xia *et al.* 2008).

중합 나노입자 등과 같은 많은 나노입자는 적절한 표면의 가공 등을 통하여 약물 전달과 암 진단에 사용되어 왔다 (Park and Webster 2005). 나노입자의 몸속 표적 지역으로의 접근과 같은 연구와 이의 응용은 상당히 광범위하다. 이전 연구에서 ambient ultrafine 입자의 노출은 망막 내피세포에서 면역 반응에 큰 역할을 한다고 알려졌다 (Roy *et al.* 2006; Bhol and Schechter 2007; Gojova *et al.* 2007).

최근 기저막과 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)의 주성분을 분해하는 matrix metalloproteinase (MMPs)가 암의 전이에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 천연물 유래의 MMPs 저해제는 암의 침윤과 전이를 효과적으로 막을 수 있는 새로운 표적으로 기대되고 있다.

본 연구에서는 금 나노입자 (gold nanoparticles, AuNPs)에 초점을 맞추었다. AuNPs는 소망막내피세포 (bovine retinal endothelial cells, BRECs)에서 VEGF로 유도된 신생혈관 형성을 억제하였다. 또한 AuNPs가 신생혈관 형성과 세포사멸 기전을 밝혔고, 이러한 결과로 볼 때, 나노입자의 항신생혈관 형성은 당뇨병망막증이나 암과 같은 질환 치료에 있어서 큰 역할을 할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. AuNPs의 생합성

본 실험에 사용한 AuNPs는 미생물을 이용한 정제법을 사용하였다. 실험 방법으로는 먼저, *B. licheniformis* 미생물 2g는 Erlenmeyer's flask에 넣었다. 1 mM 질산금 (AuNO₃) 용액은 탈 이온수를 이용해 조제되었고 혼합 용액 100 mL에 생물량이 추가된 후 플라스크를 24시간 동안 37 °C, 200 rpm shaker에서 보관 하였다. AuNPs의 크기를 확인하기 위해 UV-vis spectrum을 이용하여 440 nm로 조사한 후 그 값을 조사한 결과 직경이 2 nm에서 100 nm의 AuNPs가 분포되었다. 이 중 직경이 40~50 nm의 AuNPs만을 취하여 냉장 보관하였고, 0.4 μm의 실린지 필터를

사용하여 여과시킨 후 3,400 rpm에서 20분간 원심분리 후 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

BRECs는 Banumathi *et al.* (2009)의 방법에 따라 시행하였다. 간단히 말하면 분리한 망막을 세척하고 3 mm로 잘라냈고, 조직은 효소로 분해하였다. 이때 PBS와 500 μg mL⁻¹의 collagenase IV와 250 μg mL⁻¹ pronase, 250 μg mL⁻¹의 DNase를 추가했다. 이 후 약 10~15초 동안 vortexing을 하고 37°C에서 30분간 배양했다. 분해 후 이 혼합물은 53 μm의 체를 이용하여 걸러냈다. 다음 걸러진 혈관은 포셉으로 제거하고 MEM으로 3회 세척을 했다. 미세혈관이 있는 조직을 최종적으로 Iscove's modified dulbeccos's medium (IMDM: Sigma, USA) 배지에서 배양하는데 이 배지에는 추가적으로 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, USA)과 150 μg mL⁻¹의 heparin (Sigma, USA), 10 μg mL⁻¹의 ascorbic acid, 100 U mL⁻¹의 penicillin-G, 100 μg mL⁻¹의 streptomycin, 2.5 μg mL⁻¹의 amphotericin-B를 추가하였다. 그런 다음 37°C, 5% CO₂가 있는 배양기에서 배양하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 혈관을 떼어내고 세포 찌꺼기와 죽은 세포를 MEM 배지로 제거한 다음 매 3일마다 IMDM 배지로 교환해 주었다.

3. 성장 인자의 처리

70% 이상의 밀도를 지닌 BRECs를 VEGF (50 ng mL⁻¹)를 처리하기 전, 정해진 시간에 AuNPs 혹은 양성대조군으로써 PEDF (10 nM)의 존재유무에 따라 무혈청 IMDM를 12시간 처리하였다. 배지만 처리한 세포를 대조군으로써 사용하였다.

4. 세포의 생존을 측정

MTT assay는 Mosmann (1983) 방법에 따라 시행하였다. 10% FBS가 들어있는 IMEM에 BRECs를 2 × 10³ cells mL⁻¹ 세포수로 계수한 다음 96 well plate (Nunc, USA)에 100 μL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 증식에 있어서 VEGF, PEDF, AuNPs의 영향을 알아보기 위해 FBS가 들어있는 배양액으로 교환한 다음 다양한 농도의 물질을 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

VEGF가 유도된 BRECs에서 AuNPs의 영향을 확인하기 위해서 BRECs에 AuNPs (50, 100, 200, 300 nM)와 VEGF (50 ng mL⁻¹)을 동시에 처리하였다. 이때 VEGF를 처리하기 30분전에 AuNPs를 처리했다. 24시간 배양 후 각 well에 10 μL의 MTT (Sigma, USA)를 처리하고 4시간 동안 더 배양했다. 4시간 후 배양액을 버리고 DMSO를

200 μL well⁻¹씩을 넣어 5분간 실온 방치하여 푸른색 결정인 formazan을 용해시킨 후 microplate spectrophotometer (Bio-Tech, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

5. 세포의 이동성 측정

Plate 상에서 BRECs의 이동성을 알아보기 위해 plate에 scraper를 이용하여 배양한 세포의 일부분을 제거하였다. PBS로 2회 세척 후 시간별로 BRECs의 이동을 보는 cell migration assay를 시행하였다. BRECs의 이동성은 위상차 현미경으로 관찰하였고, 상처 가장자리에서 세포 단일층의 증식을 막는 5-fluorouracil (Sigma, USA)의 존재 하에 거리를 측정하였다.

6. 세포의 맥관 형성 측정

24 well plate에 matrigel을 코팅시켜 30분간 실온에서 배양하였다. VEGF와 PEDF, AuNPs 추가하여 24시간 동안 처리한 BRECs는 0.05% trypsin-EDTA 처리, 세척한 후 1×10^5 cells well⁻¹ 수준으로 분주하였다. 2 mL의 BRECs는 matrigel이 코팅된 well에 첨가한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 이들 세포를 PBS로 3회 세척 후 70% 에탄올로 4°C에서 30분 이상 고정 하였다. Tubular length는 Axiovision FRET, Rel 4.6 software (Zeiss, Germany)를 이용하여 측정하였다.

7. MMP-9의 유전자 발현 측정

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent™ (Invitrogen, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다 (Chae *et al.* 2009). 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 μg 의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product에 2.5 mm dNTP, 10X buffer, DEPC water, premixed primer 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR: Corbett Research, Australia)을 수행하였다. PCR 반응이 끝난 후에는 증폭된 DNA를 1.2% agarose gel을 이용하여 전기영동하였고 ethidium bromide (EtBr: Sigma, USA)으로 염색한 다음 Alpha Imager™ (Alpha Innotech Corp, CA)을 이용하여 염색된 DNA를 확인하였다.

8. MMP-9의 효소 활성도 측정

MMP-9 활성을 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다 (Herron *et al.* 1986). 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 배양액을 이용하여 세포를 1×10^6 cell well⁻¹의 농

도로 24시간 동안 부착시킨 후 FBS가 없는 무혈청 배양액으로 갈아준 다음 AuNPs를 처리하였다. 24시간 후 무혈청 배양액을 효소액으로 하여 gelatin이 함유된 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 하였다. 4°C에서 60 V로 12시간 전기영동이 끝난 후에 겔은 SDS를 제거하기 위해 washing buffer 용액으로 30분간 2회 세척한 후 반응액에 18시간 동안 37°C에 반응시켜 기질분해를 유도하였다. 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue G (Richmond, USA) 용액으로 1시간 염색하고 5% 메탄올과 8% 아세트산으로 탈색하면, 전체적인 바탕은 푸른색이고 분해된 부분은 흰색 밴드로 나타난다.

9. 통계 분석

실험 결과의 유의성 검증은 Student's *t* test 방법에 따라 실시하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 3회 이상 실시한 실험 결과를 토대로 분석하였다.

결 과

1. 세포의 생존율 측정

AuNPs와 PEDF의 역할을 확인하기 위해 우리는 VEGF로 유도된 BRECs의 증식에 있어서 AuNPs의 억제효과를 확인하였다. BRECs는 24시간 동안 여러 농도 (50, 100, 200, 300 nM)로 AuNPs를 처리한 결과, 300 nM 이상의 AuNPs의 처리 농도에서 BRECs의 성장을 억제하였다 (Fig. 1A). 따라서 신생혈관관련 실험은 세포독성이 없는 200 nM 이하의 농도에서 수행하였다. BRECs에서 VEGF로 유도된 세포증식에 대한 AuNPs의 효과를 측정할 결과, AuNPs는 VEGF로 유도된 증식을 억제하였고, AuNPs와 VEGF를 모두 넣은 처리군은 대조군과 상당한 차이가 있었다 (Fig. 1B). 또한 VEGF와 PEDF를 함께 배양한 BRECs에서 VEGF로 유도된 증식을 억제한다는 결과를 보여준다. 본 실험에서 VEGF로 유도된 증식은 BRECs에서 AuNPs와 PEDF에 의해 억제된다는 결과를 보여주었다.

2. 세포의 이동성 측정

Plate 상에서 BRECs의 이동성을 알아보기 위해 plate에 임의로 일정한 굵기의 통로를 만들어 시간별로 BRECs의 이동을 보는 wound healing migration assay를 시행하였다. 200 nM의 AuNPs는 VEGF로 유도된 BRECs의 이동을 시간 의존적으로 감소시켰다. 따라서 AuNPs는 VEGF로 유

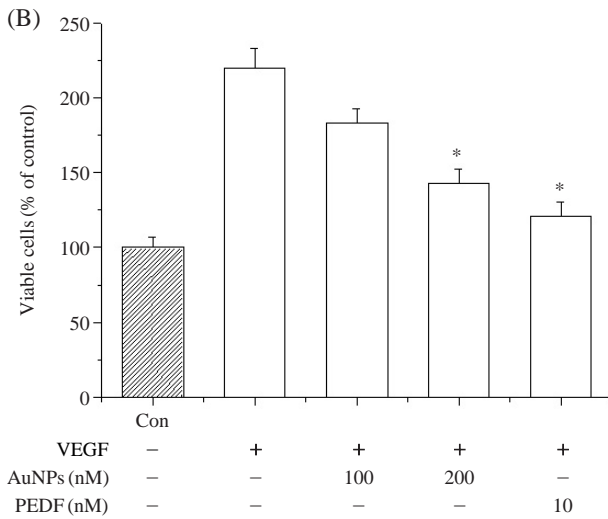
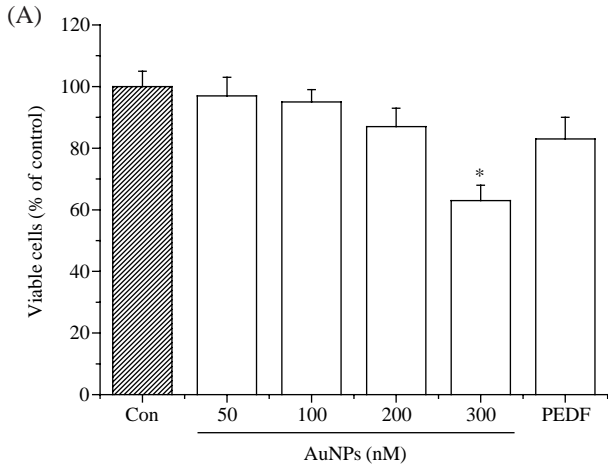


Fig. 1. Effect of Gold nanoparticles (AuNPs) or PEDF on cell viability of bovine retinal endothelial cells (BRECs). (A) AuNPs inhibited BRECs survival in a dose-dependent manner. (B) VEGF-induced proliferation inhibited by AuNPs (100, 200 nM) and PEDF (10 nM) in BRECs. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate.

도된 BRECs의 이동을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. 세포의 맥관 형성 측정

AuNPs의 BRECs에서의 신생혈관 형성 효과를 확인하기 위해 tube formation assay를 시행하였다. BRECs의 신생혈관 형성은 AuNPs의 존재 유무에 따라 현미경 사진을 통해 관의 길이를 측정하였다. Fig. 3을 보면 VEGF와 함께 처리한 AuNPs (100, 200 nM)의 경우 matrigel에서 BRECs 신생혈관 형성을 억제하였다. 또한 VEGF와 PEDF를 동시에 처리한 결과에서도 유사한 결과가 관찰되었다. 이러한 결과는 AuNPs와 PEDF가 VEGF로 유도

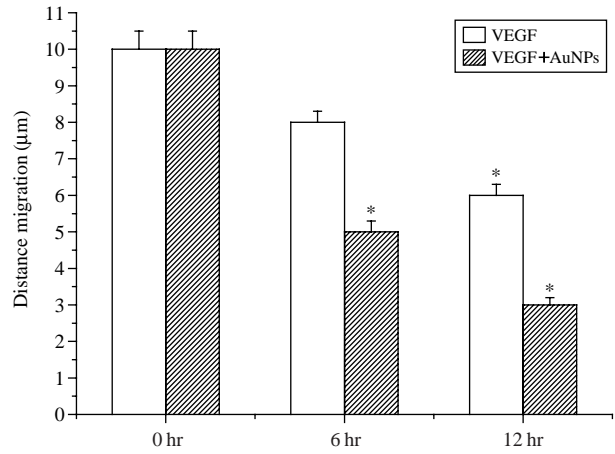


Fig. 2. Effect of AuNPs on VEGF-induced *in vitro* migration of BRECs. At 0, 6 and 12 hr after wound healing, AuNPs (200 nM) inhibit VEGF-induced cell migration in BRECs. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate.

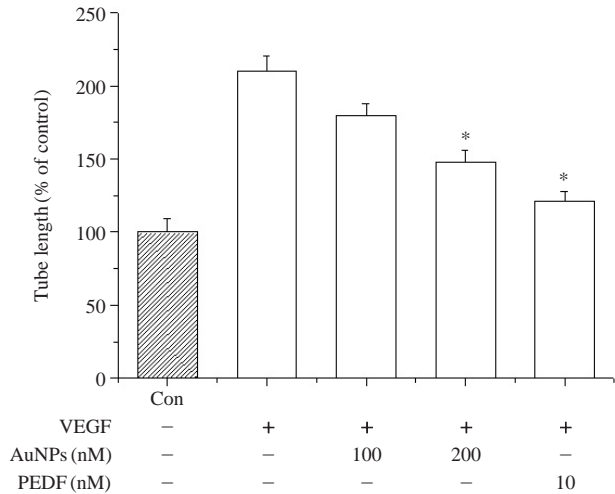


Fig. 3. Effect of AuNPs and PEDF on VEGF-induced tube formation of BRECs. AuNPs block VEGF-induced angiogenesis by inhibiting tube formation. AuNPs (100, 200 nM) treated with VEGF inhibited tube formation of BRECs on Matrigel. Each bar shows the mean \pm S.D. of three independent experiments, performed in triplicate.

된 신생혈관 형성을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

4. MMP-9의 유전자 발현 측정

AuNPs에 의해 MMP-9 효소의 활성을 억제하였는데 이러한 효소활성이 유전자 발현 조절에 의한 것인지 확인하기 위해 AuNPs가 MMP-9 유전자 발현에 저해 활성이 있는지 VEGF로 증양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-9

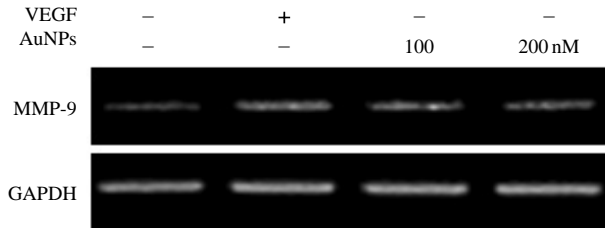


Fig. 4. Effect of AuNPs on expression of MMP-9. Analysis of MMP-9 mRNA expression in BRECs treated with 100, 200 nM concentration of AuNPs in the absence and presence of VEGF using RT-PCR.



Fig. 5. Effect of AuNPs on activity of MMP-9. The cells were treated with AuNPs (100, 200 nM) for 24 h in the presence of VEGF. Each conditioned media was collected, and then was analyzed for the gelatinolytic activities by zymography.

활성 억제 여부를 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과, AuNPs의 처리농도가 증가함에 따라 MMP-9의 발현이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100, 200 nM의 AuNPs에서 MMP-9의 발현이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

5. MMP-9의 활성화 측정

AuNPs가 MMP-9 효소 활성이 있는지 VEGF로 종양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-9 활성이 억제 여부를 gelatin zymography를 이용해 확인해보았다. 그 결과, 종양 촉진제인 VEGF 처리군에서는 많은 양의 MMP-9 효소의 활성이 나타남을 관찰할 수 있으며 24시간 동안 100, 200 nM의 AuNPs로 처리한 결과 MMP-9 효소의 활성이 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 5).

고 찰

최근 암의 초기 및 전이를 막고자 신생혈관 억제 연구에 많은 노력을 하고 있다. 신생혈관 형성은 VEGF와 같은 신생혈관생성인자의 증가시 일어난다. 신생혈관의 형성은 혈관생성인자의 활성, 분해효소의 생성, 이동, 증식과 같은 다양한 과정에 의해 일어나는 복합적인 과정이다. 신생혈관 형성에 있어 AuNPs의 역할을 알아보기 위해 신생혈관 형성과 연관된 많은 과정을 연구해야 한다.

내피세포가 대부분의 치료에서 주로 표적이 되므로 우리는 BRECs에서 VEGF로 유도된 신생혈관 형성에 AuNPs의 역할을 확인하였다.

본 연구는 AuNPs의 세포 생존 및 세포 증식, 이동, 신생혈관 형성 등의 억제효과에 초점을 맞추었다.

본 실험에 사용한 약 40~50 nm의 AuNPs를 *B. licheniformis*를 이용하여 합성하였다. 입자의 크기는 평균 50 nm의 크기로 합성하였고, VEGF나 FGF2로 유도된 신생혈관 형성에서 다양한 탄소 물질의 항신생혈관 형성 효과는 이미 chick chorioallantoic membrane에서 확인되었다 (Murugesan *et al.* 2007). 현재까지 개발되어 검토되고 있는 항혈관 형성 (anti-angiogenic) 약물들은 모두가 유기 화합물들이며 이들은 대부분 위 장관 천공 같은 심각한 독성을 가진 물질들이다. 최근 천연 무기물에서 항혈관 형성 약물을 개발하려는 시도에서 AuNPs가 주목을 받고 있다 (Grabar *et al.* 1995; Cho *et al.* 2005; Li *et al.* 2006). AuNPs는 생체적합성을 가지며, 표면 플라즈몬 공명 흡수대에 의한 특성분석과 합성이 쉬운 점 등에서 가능성이 큰 물질이다. 특히 금은 약한 산성으로서 thiol, 아민과 같은 약한 염기와 강하게 결합하며, cysteine과 lysine 잔기를 가진 단백질들이 AuNPs와 결합하여 그들의 생물학적 기능이 변하게 된다 (Resham and Pribyabrata 2008).

PEDF는 어떠한 다른 항신생혈관분자 angiostatin, thrombospondin-1, endostatin 보다 큰 역할을 한다 (Dawson *et al.* 1999). VEGF의 발현 패턴과 PEDF는 안구에서 잘 알려진 분자이고 이들의 반대 작용이 PDR의 발달과 연관된 신생혈관의 생성에 있어 큰 역할을 한다 (Leung *et al.* 1989; Aiello *et al.* 1995). PEDF가 Fas/FasL death pathway의 활성을 통해 그리고 신생혈관생성인자와 신생혈관생성억제인자 사이의 균형을 파괴함으로써 내피세포의 apoptosis를 촉진한다 (Volpert *et al.* 2002). PEDF는 *in vitro* 상에서 농도 의존적으로 내피 세포의 증식과 이동을 억제한다. 이것은 angiostatin, thrombospondin-1, endostatin과 같은 다른 억제자보다 효과가 크다 (Dawson *et al.* 1999). 이는 VEGF로 유도된 미세혈관 내피세포의 증식과 이동을 억제한다. 본 실험 결과 대부분의 신생혈관 형성 억제자 중 하나인 PEDF는 인간에 있어 가장 강력한 항신생혈관 형성인자 중 하나이다. 본 연구에서 AuNPs와 PEDF는 BRECs에서의 증식을 억제하고 이것은 즉 BRECs에 직접 작용하여 항신생혈관 형성 효과가 있다는 것을 암시한다. VEGF는 이미 내피세포의 분열에 관여한다고 알려져 있다 (Leung *et al.* 1989; Cleaver and Melton 2003). 우리는 VEGF로 유도된 신생혈관 형성에 있어서 AuNPs와 PEDF의 효과를 알아보았다. 그 결과는 VEGF로 유도된 신생혈관 형성에 있어서 AuNPs와 PEDF의 억제효과를

확인하였다.

적 요

신생혈관 형성은 세포의 성장 및 상처 치유 과정에서 중요한 현상이다. 그러나 성장인자의 불균형은 시각 및 면역질환과 같은 다양한 질환을 야기한다. 이러한 질환을 치료하는 방법 중 신생혈관 형성을 억제하는 것이 중요한 방법 중 하나이다. AuNPs의 기능과 기전이 신생혈관 형성에 있어서 아직 밝혀진 바가 없다. 현재 PEDF가 항신생혈관 형성 물질로 제안되고 있다. 본 연구에서 우리는 AuNPs가 BRECs에서 VEGF로 유도된 세포의 증식 및 이동, 신생혈관의 형성을 억제하였고 이는 세포의 성장과 침윤 및 전이와 관련된 신생혈관 형성을 억제한다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Aiello LP, EA Pierce, ED Foley, H Takagi, H Chen and L Riddle. 1995. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:10457-10461.
- Banumathi E, R Haribalaganesh, SSP Babu, NS Kumar and G Sangiliyandi. 2009. Highyielding enzymatic method for isolation and culture of microvascular endothelial cells from bovine retinal blood vessels. *Microvasc. Res.* 77:377-381.
- Bhol KC and PJ Schechter. 2007. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 52:2732-2742.
- Carmeliet P. 2000. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angiogenesis. *Nat. Med.* 6:1102-1103.
- Chae CS, GK Eun, SS Eun, CR Geun, MS Na, IS Kim and JB Lee. 2009. Inhibitory Effect of Naringenin on MMP-9 Activity and Expression in HT-1080 Cells. *Korean J. Environ. Biol.* 27:58-65.
- Cho KH, JE Park, T Osaka and SG Park. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica. Acta.* 51:956-960.
- Cleaver O and DA Melton. 2003. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 9:661-668.
- Cross MJ and L Claesson-Welsh. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends. Pharmacol. Sci.* 22:201-207.
- Dawson DW, OV Volpert, P Gillis, SE Crawford, H Xu and W Benedict. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285:245-248.
- Gojova A, B Guo, RS Kota, JC Rutledge, IM Kennedy and AI Barakat. 2007. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Health Perspect* 115:403-409.
- Grabar KC, RG Freeman, MB Hommer and MJ Natan. 1995. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem.* 67:735-743.
- Herron GS, MJ Banda, EJ Clark, J Gavrilovic and Z Werb. 1986. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261:2814-2818.
- Leung DW, G Cachianes, WJ Kuang, DV Goeddel and N Ferrara. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.
- Li ZP, XR Duan and BA Liu. 2006. Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles. *Anal. Biochem.* 351: 18-34.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- Murugesan S, SA Mousa, LJ O'Connor, DW Lincoln and RJ Linhardt. 2007. Carbon inhibits vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factorpromoted angiogenesis. *FEBS Lett.* 581:1157-1160.
- Papakonstanti EA and C Stourmaras. 2002. Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol. Biol. Cell* 13:2946-2962.
- Park GE and TJ Webster. 2005. A review of nanotechnology for the development of better orthopedic implants. *J. Biomed. Nanotechnol.* 1:18-29.
- Resham B and M Pribyabrata. 2008. Biological properties of naked metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* pp.1289-1306.
- Roy AM, KN Tiwari, WB Parker, JA Secrist III, R Li and Z Qu. 2006. Antiangiogenic activity of 40-thio-b-d-arabinofuranosylcytosine. *Mol. Cancer Ther.* 5:2218-2224.
- Volpert OV, T Zaichuk, W Zhou, F Reiher, TA Ferguson and PM Stuart. 2002. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by antiangiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med.* 8: 349-357.
- Xia X, S Xiong, W Song, J Luo, Y Wang and R Zhou. 2008. Inhibition of retinal neovascularization by siRNA targeting VEGF165. *Mol. Vis.* 14:1965-1973.