원 저

대한신경과학회지 20(6): 530~ 536, 2002 ISSN 1225-7044

모래쥐의 전뇌허혈모델에서 혈관내피세포 형성인자와 flk-1의 지연성 발현

서울대학교 의과대학 신경과학교실, 신경과학연구소

박경일 주 건 김동억 박희권 안성신 박성호 김만호 노재규*

Delayed Up-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor and flk-1 after Global Cerebral Ischemia in Mongolian Gerbil -Possible roles in neuroangiogenesis?

Kyung-Il Park, M.D., Kon Chu, M.D., Dong-Eog Kim, M.D., Hee-kwon Park, M.D., Sung-Shin Ahn, M.D., Seong-Ho Park, M.D., Ph.D., Man-ho Kim, M.D., Ph.D., Jae-Kyu Roh, M.D., Ph.D.*

Department of Neurology and Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, College of Medicine, Neuroscience Research Institute of SNUMRC, Seoul, Korea.

Background : Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endothelial cell-specific mitogen and a potent mediator of vascular permeability. Flk-1, one of the receptors for VEGF, is important in vascular development. Increased expression of VEGF is related with reactive astrogliosis, which stimulates the proliferation of neural progenitor cells. VEGF expression increases in the acute phase of cerebral ischemia, however the expression of VEGF together with flk-1 in subacute stage is still unknown. This study is done to demonstrate the spatial/cellular patterns of expression for VEGF/flk-1 up to subacute stages and to find out the role of VEGF in ischemia. **Methods** : Transient global ischemia was induced by a 10 min-occlusion/reperfusion of the bilateral carotid arteries in the Mongolian gerbil. Immunohistochemistry and western blot were performed to ensure the expression of VEGF and flk-1 on the day1, 3, 7, 14, and 28. **Results** : Both VEGF and flk-1 initially increased at day1, and decreased at day3. Thereafter, VEGF gradually increased again to the initial level at day7 and to the peak level after day14. Flk-1 showed a peak expression at day14, and then decreased at day28. Immunohistochemical staining for VEGF showed immunoreactivity mainly on the cytoplasm of neurons and endothelium in cortex and hippocampus at day1, and neuron, endothelium, and glial cell from day14 to 28. The distribution and chronological patterns of flk-1 expression were similar to that of VEGF expression. **Conclusions** : We suggest that global cerebral ischemia can induce a delayed up-regulation of VEGF and flk-1, which may be associated with neuroangiogenesis and repair process.

J Korean Neurol Assoc 20(5):530~536, 2002

Key words : Vascular endothelial growth factor, Fetal liver kinase-1, Delayed up-regulation, Neuroangiogenesis, Global ischemia

서 론

혈관내피세포 형성인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 다양한 재단(splicing) 양상에 따른 아미노산의 수에 따라 VEGF206, VEGF189, VEGF165와 VEGF121의 네 가지 동종형태(isoenzyme)로 나뉘며, 최근 보고에 따르면 드물게 VEGF145, VEGF188의 이형이 존재한다고 밝혀져 있다.[1,2] 특히 mouse와 rat에서는 인간의 동종형태보다 아미노산이 하나 더 적다. 정상적으로 뇌에서 상의세포(ependymal cell)에서 발현되나, 그 외에 신경세포(neuron) 및 혈관

Manuscript received May 2, 2002.
Accepted in final form June 28, 2002.
* Address for correspondence
Jae-Kyu Roh, MD, PhD.
Department of Neurology,College of Medicine,
Seoul National University,
28 Yongon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-744, Korea
Tel : +82-2-760-2278 Fax : +82-2-3672-7553
E-mail : rohjk@snu.ac.kr
* 위 연구는 학술진흥재단 협동과제 연구비(2000-042-F00063)의 보조로 이루어 졌음.

내피세포에서는 활성을 관찰할 수 없다.[3]

이 중 VEGF165는 45-KDa 크기의 동종 이합체 당단백질로서, 생물학적 활성이 가장 활발하고, 생리적인 상황에서는 태생기의 마우스 뇌의 뇌실주변 기질세포에서 또, 성상세포(astrocyte)와 소뇌의 과립세포(granule cell)에서도 그 발현이 관찰되나, 성숙되어감에 따라 맥락막총(choroid plexus)을 제외하고는 그 발현이 감소한다.[4,5]

Folkman 등[6]에 의해 종양의 형성이 신생 혈관의 생성과 관련되고 이러한 과정에 있어 종양에 특이한 혈관형성인자가 관계한다고 보고한 이후, 많은 연구에서 정상 생리적 상황과 병태적 상태에서의 신생 혈관 형성에서 VEGF의 역할이 확인된 바 있다.[7]

VEGF는 혈관내피세포의 성장 및 분화의 강력한 유도물질이며, flt-1(fms-like tyrosine kinase, VEGFR-1), flk-1(fetal liver kinase-1, VEGFR-2)이라는 두 개의 중요한 수용체가 이러한 작용을 매개한다. VEGF의 뇌내 발현은 저산소증, 또는 뇌의 허혈 상태에서 증가하며 TGF-β,[7,8] TNF-α,[9] IL-1β[10] 그리고, HIF(hypox-i-ain-ducible factor)[11] 등이 관계된다고 보고하였으나 그 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않은 상태이다.

신생 혈관의 생성은 기존에 형성된 혈관으로부터 모두에 기술한 다양한 외부로부터의 자극에 의해 혈관내피세포가 가지를 쳐서 새로운 혈관을 형성하는 일련의 과정을 따르며 이렇게 가지를 치는 과정에서 단백분해효소에 의해 기저막을 분해시키고, 새로 생성된 내피세포가 주변으로 이동하며, 증식하여 관의 형태를 이룬다. 이러한 신생 혈관의 생성에 특이적으로 조절능력을 가지는 여러 인자들 중 VEGF가 가장 강력한 인자로 알려져 있고, 태생기의 뇌혈관 형성에 기여함은[12] 물론, 뇌경색[13,14]뿐만 아니라 심근경색,[15] 망막 허혈,[16] 종양[17]과 같은 병태적 상황에서 신생 혈관 형성의 매개 물질로 밝혀진 상태이다.

지금까지의 뇌 허혈 모델에서 VEGF에 대한 연구[11,13,14,18-29]는 대체로 뇌의 허혈 손상 이후 내인적 VEGF의 수일 내 증가 발현이 공통적인 결과였으며, 이의 관찰을 1주일 이내로 국한시킨 한계점이 있으며, 뇌허혈의 강도 조차도 각각 달라서 그 발현의 세포학적 위치와 시간적인 상호 관계를 서로 비교하기 어려웠다. 저자들은 전뇌 허혈 모델을 이용하여, VEGF 발현의 시간적, 공간적 양상의 변화를 관찰하고, 아급성기(28일)까지의 VEGF 발현 정도를 관찰함으로써 뇌의 허혈성 손상에 대한 VEGF의 작용 기전을 연구하고자 하였다.

대상과 방법

1. Global ischemia model

체중 50-70 g의 암컷 모래쥐(Mongolian gerbil, Meriones unguiculatus, n=25)을 수술 전 24시간 동안 금식시킨 후 xylazine hydrochloride(10 mg/kg)와 ketamine(50 mg/kg)을 혼합해 복강 내로 주입해 마취를 유도하였다. 직장 내 온도계 소식자를 삽입하여 수술 시작에서부터 수술 후 30분까지 체온 감시를 하여 가열판과 냉각팬을 사용하여 36.5±1.0℃로 조절하였다. 앙와위로 고정시킨 저빌의 경부를 정중절개하고 양측 총경동맥을 주위의 결체조직 및 미주신경으로부터 박리한 후 양측 총경동맥을 동맥류용 클립으로 동시에 결찰해 10분 동안 전뇌 허혈을 유발한 후 클립을 제거하고 재관류하였다.

2. Immunohistochemistry

전뇌 허헐-재관류 후 각각 1일, 3일, 7일, 14일, 28일째 파라핀에 포매된 조직편을 4 ㎛로 잘라 슬라이드에 부착한 후 파라핀을 제거하고 100%, 95%, 90%알코올에 단계적으로 탈수하였다. 3% 과산화수소수에 10분간처리한 후, 일차 항체로 rabbit anti-VEGF polyclonal antibody(NeoMarkers, USA)와 rabbit anti-flk-1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA)를 이용하였고, 두 항체를 각각 1:800으로 희석하여 넣고 anti-VEGF antibody는 4℃에서 하루 밤 동안, anti-flk-1 antibody는 실온에서 1시간 반응시킨후 Tris Buffered Saline tween buffer(Lab Vision, TA-125-TT, pH 7.4)로 5분간 3회 수세하였다. 이차항체와 발색반응을 위해 Envision™, peroxidase, rabbit 용액(DAKO, K4003)을 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, Tris Buffered Saline tween buffer에 역시 5분간 3회 수세하며, 이후 발색을 위해 DAB로 10분 정도 반응시켰다. 대조염색으로 헤마톡실린에 1분간 핵염색하고 수세 후 95%알코올에 30초씩 2회 탈수시켜 실렌으로 투명화하여 봉입제로 봉입하였다. 일차항체인 rabbit anti-VEGF polyclonal antibody를 제외하고 이차항체만으로 염색하여 동일한 방법으로 면역활성을 비교하였다.

3. Histologic analysis

분석은 광학현미경으로 40배에서 해마와 그 주변 조직, 그리고 두정후두피질 영역에서 면역조직화학적 염색 양상을 확인하고 400배의 배율에서 각각 세포의 형태로 신경세포, 혈관내피세포, 아교세포를 판별하여(김영아, 보라매병원) 그 염색 정도를 두명의 저자(박경일, 박희권)에 의해 0(음성), 1+(약양성), 2+(해당영역 세포의 50% 미만 양성), 3+(해당영역 세포의 50% 이상에서 양성)의 4단계로 구별하였다.[22]

4. Western blotting

마취 후 절두하여 얻은 뇌조직에서 양측 해마를 도려내어 완충액(50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS)에서 균질화한 후, 표본 단백질 추출액(40 ㎍) 을 얻었다. 단백질을 SDS-polyacrylamide 겔 상에서 전기영동에 걸고, 겔을 nitrocellulose 막에 이전시킨다. 일차항체로 anti-VEGF polyclonal antibody 또는 anti-flk-1 polyclonal antibody를 막과 하루 밤 동안 4℃에서 부란시키고, 이후 페록시다아제-접합의 1:10,000 배로 희석된 이차 항체를 상온에서 1시간 동안 부란시켰다. 면역

활성의 관찰을 위해 ECL kit를 이용하였다

결 과

1. Immunohistochemistry

전뇌 허혈 후 VEGF에 대한 면역활성은 허혈-재관류 1일째 뇌피질과 해마 부위에 걸쳐 신경세포와 혈관내피세포에서 주로 강하게 나타나며 아교세포에서는 상대적으로 면역 활성 정도가 떨어졌다(Fig.1, 2). 그러나, 3일 이후부터 아교세포의 면역 활성이 다른 세포들과 비슷한 정도로 활발하였다.

주로 VEGF의 면역 활성은 이전의 보고와 같이 세포질에서 염색되었으며, flk-1에 대한 면역조직화학염색상 대체적으로 VEGF와 비슷한 세포학적 위치를 가지고 발현하였다(data not shown). 일차 항체를 제외하고 이차 항체만으로 염색한 조직에서는 면역 활성이 없었다.

2. Western blotting

전뇌 허혈 후 VEGF 발현의 정량적인 시간적 양상을 보기 위해 해마에서 추출된 단백질로 western blotting을 시행하였으며, 1일 후 발현이 현저하게 증가하고, 이후 3일째 기저 수준 이하로 그 발현이 하향 조절되었다. 시간이 지나면서 14일째 다시 VEGF가 활발히 발현되고, 이러한 지연성 증가 발현은 28일째에도 지속하였다(Fig. 3a).

수용체인 flk-1에 대한 western blotting을 보면 VEGF의 결과와 비슷하게 전뇌 허혈-재관류 후 1일째 일시적으로 발현이 증가하고, 3일에는 기저 수준으로 감소하여 거의 band가 관찰되지 않았다가, 14일에 그 발현이 다시 정점에 도달한 이후 감소하는 추세를 보였다(Fig. 3b).

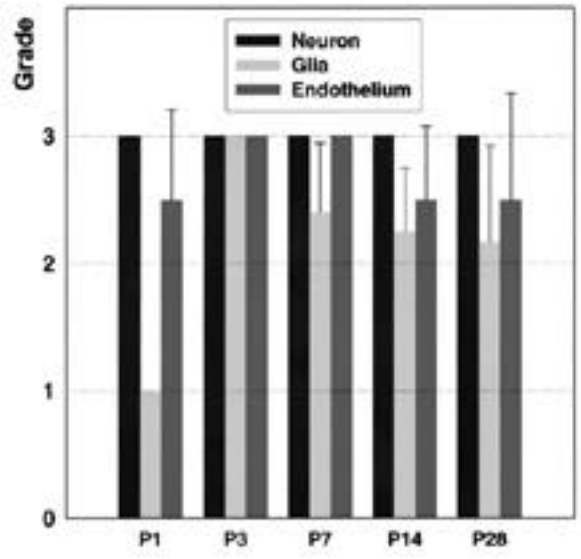

Figure 1. Temporal and cellular patterns of VEGF expression. Immunohistochemical staining for VEGF in hippocampal area shows frequent immunoreactivity mainly on the neuron and endothelium at day 1, and neuron, endothelium, and glial cell from day 14 to 28. The letter ' P ' below the x-axis stands for the post-operative day.

고 찰

이번 연구는 전뇌 허혈 후 급성기뿐 아니라 아급성기의 VEGF의 발현 양상을 관찰하여, 이전의 보고에서 보였던 초기의 일시적인 상승뿐 아니라 아급성기에 이차적인 상승을 관찰하여 의의가 있다. 더불어 수용체인 flk-1도 VEGF와 시간적으로 유사한 후기의 이차 동반 상승 발현을 확인하였으며, VEGF의 이차적인 후기 상승 발현이 아교세포의 발현 증가와 관련이 있다는 점에서 새로운 가치가 있다.

국소 뇌허혈 모델에서 허혈 손상을 실험적으로 가한 이후 VEGF의 유전자와 그 형성인자 자체의 분비가 허혈 심부(ischemic core)와 주변부(penumbra)에 유도 된다는 사실을 보고하였고,[13,14,21,22] Marti 등은 허혈 손상 후 6시간과 24시간에 VEGF의 발현이 현저하게 증가하고, 그 수용체인 flk-1과 flt-1의 발현은 주로 허혈 주변부에서 48시간째 상승하는 사실을 보고 하였으며,[11] Lennmyr 등은 영구적, 일시적 허혈모델 모두에서 허혈 손상 1일째 VEGF의 면역 활성(immunoreactivity)이 양측 대뇌에서 동시에 증가하고 3일이 되면 주로 병변측의 허혈 주변부로 그 활성이 한정됨을 관찰하였다. 또한 전뇌 허혈모델에서도 VEGF 발현의 시간적인 양상이 유사하여 허혈 재관류 12시간 이후에 해마에서 VEGF mRNA가 증가하기 시작하여 1일째 정점에 도달하며, 3일 후에는 그 발현이 관찰되지 않아서 본 연구의 결과와 일치하였다.[23] 또 다른 보고에서는 western blot과 면역형광염색을 통하여 전뇌 허혈에 의한 VEGF의 유도가 4시간에서 3일까지 지속하였으며,[24] 이러한 발현 양상이 7일 후에는 기저 수준으로 다시 낮아져서, 초기에 VEGF의 증가가 혈관투과성을 증가시켜 혈관-뇌 장벽(blood-brain barrier)의 개방에 일조할 것이라고 주장하였다.[26] 이러한 VEGF의 발현 양상은 대체적으로 수용체의 발현과 유사한 시간적인 관계를 가지며 본 연구에서도 동일한 결과를 얻었다.

이러한 국소 또는 전뇌 허혈의 초기에 VEGF의 발현 증가는 면역조직화학염색 결과, 허혈 손상에 취약한 부위에서 현저하며, 주로 신경세포,[24] 또는 성상세포에서 나타나고,[23,25] 혈관내피세포, 아교세포,[22] 그리고 미세아교세포(microglia) 계통의 세포에서도 발현이 관찰되었다.[21] 이러한 다양한 세포의 국소적 발현 결과는 각기 다른 허혈 손상의 방법과 정도에 따라 나타난 결과로 생각한다. 한편, VEGF는 혈관내피세포에 직접 작용하여 혈관 투과성을 증가시키는 인자이며,[26,27] 이러한 혈관 투과성의 증가 효과는 혈관 형성 과정보다 신속히 일어난다. 결국 뇌허혈 상태에서 VEGF에 의해 혈관 형성이라는 긍정적인 효과는 뇌부종의 악화라는 부정적인 효과에 의해 상쇄될 수 있는 가능성 있다.

전뇌 허혈모델에서 뇌허혈 조작에 의한 국소 뇌혈류의 감소는 24시간 이내에 정상 수준으로 회복하나,[30] 실험적으로 VEGF의 발현이 24시간째에 일시적 상승을 나타낸 점을

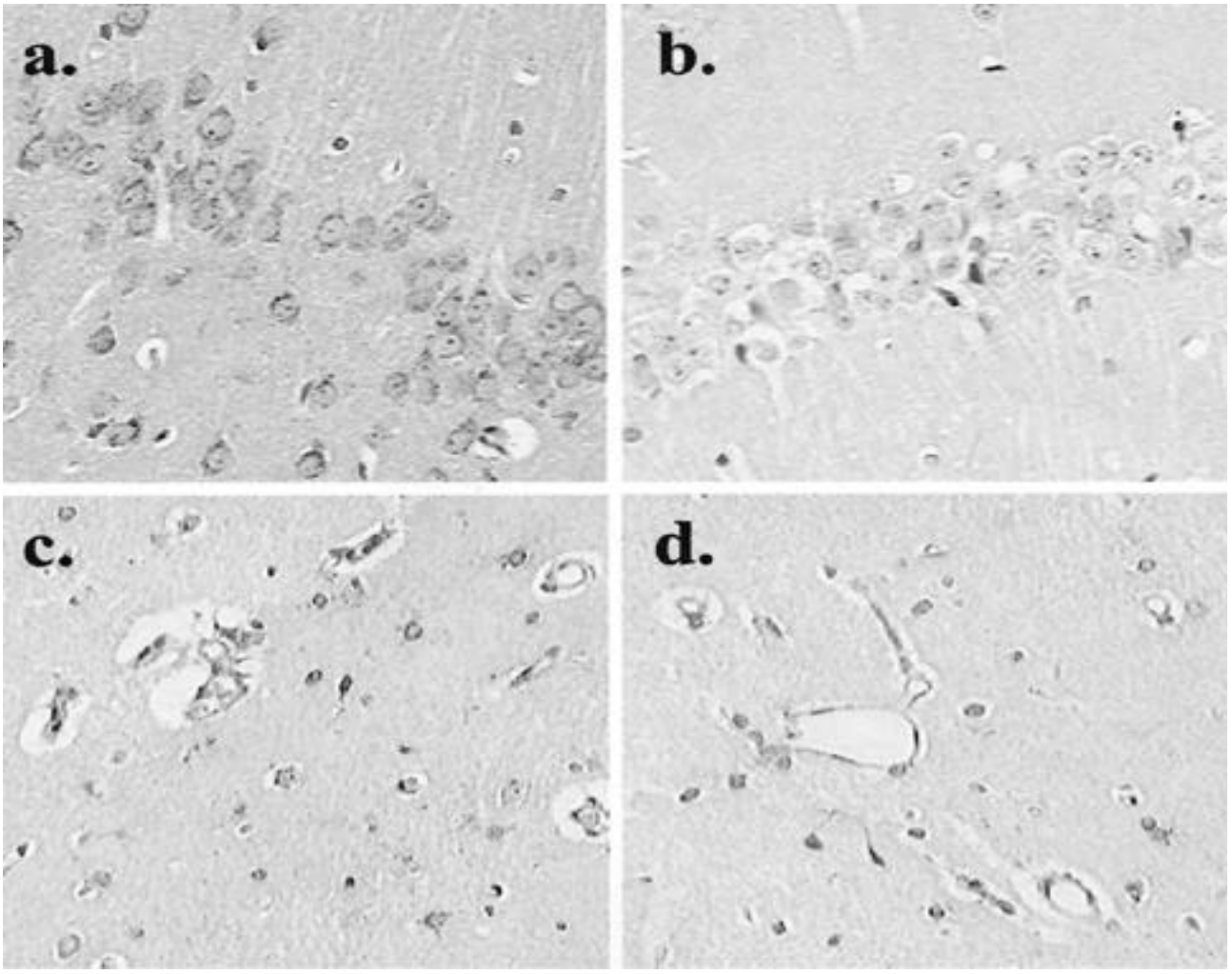

Figure 2. Immunohistochemical staining for VEGF in hippocampus (×400). **A.** Almost all neurons show immunoreactivity for VEGF, which is graded 3. **B.** The numbers of neurons below 50% are stained for VEGF, which is graded 2. Panel **C.** and **D.** shows the immunopositive endothelial cells and glial cells for VEGF.

고려하면 뇌허혈에 의한 자극은 단순히 뇌혈류뿐 아니라 그 이후 지속되는 하류(downstream)의 대사 변화 때문일 가능성이 높다고 생각한다. 일시적 전뇌허혈에 의한 세포사의 경우 대체적으로 4일에서 7일사이에 주로 일어나므로,[31] 허혈에 따른 세포의 생존 상태와 VEGF의 발현정도를 직접 연관 시키기엔 무리가 있다.

한편, VEGF의 양은 뇌막종(meningioma) 주위의 부종의 정도와 잘 연관되고,[32] 국소 허혈모델에서 허혈 주위의 부종 정도와도 연관성이 깊다.[33] 또, 뇌내 주입 또는 국소 뇌허혈 모델을 이용한 초기 경정맥 투여에 의해 혈관-뇌 장벽이 느슨해져, 결국은 뇌부종을 악화시킨다.[34,35] 혈관내피세포의 방해 항체(mFlt(1-3)-IgG)를 실험적으로 만들어 중대뇌동맥 폐색 30분 전에 주입하여 뇌부종 형성의 감소를 보였던 실험도 이의 효과를 보여주는 증거이다.[36]

Pluta 등의 보고에 따르면 일시적 전뇌 허혈모델에서 허혈 후 24시간에 혈관-뇌 장벽의 개방이 관찰된다.[37] 실험에서 보였던 10분 허혈 모델에서 1일째의 일시적 발현 증가는 이러한 허혈 후 뇌부종의 증가와 시간적인 행보에 유사성을 보여 VEGF에 의한 뇌부종 증가 효과와 관련성을 짐

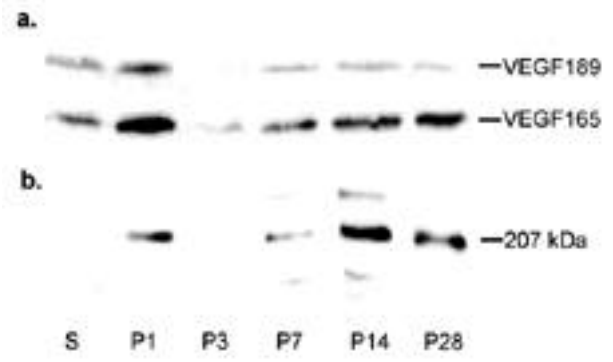

Figure 3. Western blots for VEGF and flk-1 in hippocampus of gerbil subjected to 10-min transient global ischemia. Panel **a.** demonstrates the bands corresponding to the VEGF165 and 189 respectively and Panel **b.** demonstrates the band for flk-1 sized 207 kDa.

작하게 한다. 더구나 국소 허혈모델에서 뇌허혈 1시간 후에 정맥을 통한 VEGF의 투여가 혈관-뇌 장벽의 누출을 악화시켜 뇌부종을 증가시키고 결국 기능적 저하를 가져온

Zhang 등의 연구에서 간접적인 뒷받침을 해 준다.[34]

본 연구에서 뇌 허혈 후 14일째 VEGF의 발현이 다시 증가하는 양상을 발견하였고 이는 이전에 보고되지 않은 소견이다. 면역조직화학염색에서 보듯이 초기에 비해 신경세포와 혈관내피세포에서의 면역 활성은 큰 차이를 보이지 않는 것에 비해 아교세포의 경우 초기에 비해 14일째 더욱 증가하여 아마도 14일째, 28일째 나타난 VEGF의 지연성 상승 발현은 아교세포에서의 VEGF 발현과 상당한 연관성이 있다고 생각한다. 신경세포와 아교세포에서 이와 같이 상이한 시간적 발현 양상은 Lee 등에 의해 전뇌 허혈모델에서 VEGF mRNA의 발현이 northern blot 상에서 각각 12시간째와 1일째 정점에 이른다는 결과에서 밝혀졌으며,[23] Jin 등은 초기의 신경세포에서만 발견된 VEGF의 면역활성을 설명하면서 아교세포의 지연성 발현 가능성을 제시하였다.[24]

최근 포유류의 기성숙한 뇌에서도 해마의 dentate gyrus 과실하 부위(subgranular zone), 뇌실하 부위(subventricular zone) 등에서 신경세포 또는 아교세포로 분화되는 기원세포(progenitor cell)가 지속적으로 생성(proliferation) 되고 이동(migration)한다는 사실이 밝혀졌으며,[38-40] 동물 실험에서 허혈성 손상을 받은 이후 기원세포의 증식과 함께 신경세포로의 분화가 4주째에 대조군에 비해 현저히 증가되었다.[41] 이러한 신경세포의 생성(neurogenesis)은 초기, 무리(cluster)를 지어 분열하며, 주변 세포들과 유기적인 관계(interaction)를 가지면서 이루어져, 혈관구조물 근처에서 많이 보이고, 혈관내피세포의 표식자(marker)의 면역 활성을 나타내며, 또 이 기원세포의 무리 근처에서 VEGF와 flk-1의 면역 활성이 관찰되어, 신경세포와 혈관세포 등의 상호 의존적 또는 공통의 신호 과정을 가질 것이라고 하였다.[42] 기원세포(progenitor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 성상에 대해서는 아직 확실히 알려지지 않았으나, Seri 등은 아교세포의 일종인 성상세포의 면역학적 특성을 가진 세포가 분열하여 새로운 신경세포를 생성한다고 하였으며 성인 해마에서의 신생 신경세포의 기원일 것이라고 주장하였다.[43] 한편, 중추신경계에서 손상에 대한 자연적인 대처 반응의 하나인 신경교증(gliosis)이 신경손상 후 신경의 생성과 함께 일어난다. 이러한 신경교증과 신경세포의 신생이, 성상세포의 증가와 이에서 발현하는 VEGF의 양적 증가 그리고 혈관내피세포의 분열-신경혈관생성(neuroangiogenesis)과 함께 서로 시간적 공간적으로 평행하게 나타난다.[44] 이러한 사실을 고려해 본다면, 본 연구에서 허혈 후기에 관찰한 지연성 상승 발현 양상은 신경혈관생성을 반영한다고 예측할 수 있고, 즉 VEGF의 지연성 증가가 신경생성에 있어서의 적절한 미세환경(microenvironment)을 이루는 역할을 할 것으로 생각한다.

뇌허혈 모델에서 VEGF가 내인성 신경보호 효과와 혈관생성의 기능을 한다는 실험적 증거[11,18] 들을 근거로, 치료적 연구들이 진행되어 왔다. Rat에 국소 뇌허혈을 가한 후, VEGF의 외부 주입이 혈관 형성을 촉진하는 결과와,[19] 병변내로의 국소 주입에 의해 뇌경색의 크기가 감소하였다는 보고[20]는 뇌허혈에 대한 치료적 잠재성을 제시하였다.

혈관생성 효과 이외에도 혈관보호 효과가 있다는 주장이 있고, 이러한 혈관보호 효과는 내피세포의 증식과 새로운 혈관의 생성과는 독립적으로, 항증식, 항혈전 효과로 나타날 것이라고 보고하였다,[28,29] 이러한 배경으로 최근 VEGF가 뇌혈관질환 또는 심혈관질환의 치료에 있어 중요한 부분으로 관심을 모으고 있다.

이러한 결과는, 뇌허혈로 인해 손상된 조직의 재건과, 줄기세포의 이식과 관련하여 VEGF의 치료적 역할에 대한 기대를 가지게 한다. 향후 연구에서는 뇌허혈 손상 후 아급성기 또는 만성기에서 기원세포, 신경세포의 표식자를 이용하여, 이 들의 분열 양상, 신경신생(neurogenesis)과 VEGF/flk-1와의 직접적인 관계를 규명할 필요성이 있다.

Acknowledgement

조직학적 분석에 도움을 주신 김영아선생님께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151-7158.
2. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS. Human Muller cell express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:752-759.
3. Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1393-1408.
4. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 15809-15814.
5. 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.
6. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
7. Brogi E. Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90:649-652.
8. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:6271-6274.
9. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno

K, et al. Induction of vascular endothelial growth factors by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 1996;271:28220-28 228.

10. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270:308-312.
11. 12. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000;156:965-976.
12. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114:521-532
13. Cobbs CS, Chen J, Greenberg DA, Graham SH. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1998;249:79-82.
14. 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.
15. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996;270:1803-1811.
16. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994;145:574-584.
17. 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.
18. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 2000;29:10242-10247.
19. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7086-7091.
20. Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:887-895.
21. Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996;27:1865-1871.
22. Lennmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:874-882.
23. Lee MY, Ju WK, Cha JH, Son BC, Chun MH, JK Kang, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA following transient forebrain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 1999;265:107-110.
24. Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Introduction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 αby global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 2000;99:577-585.
25. Pichiule P, Chavez JC, Xu K , LaManna JC. Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;74:83-90.
26. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 1996; 183:1981-1986.
27. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
28. Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: the basis of a cytoprotective effect? *Cardiovasc Res* 1999;41:509-510.
29. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin JF. Vascular protection: a novel, non-angiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1512-1520.
30. LaManna JC, Crumrine RC, Jackson DL. No correlation between cerebral blood flow and neurologic recovery after reversible total cerebral ischemia in the dog. *Exp Neurol* 1988;101:234-247.
31. Colbourne F, Li H, Buchan AM, Clemens JA. Continuing postischemic neuronal death in CA1-influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rat. *Stroke* 1999;30:662-668.
32. Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, Vitek J, Tsai JC, Weiss HL, et al. Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. *Neurosurgery* 1997;40:1269-1277.
33. Strugar J, Rothbart D, Harrington W, Criscuolo GR. Vascular permeability factor in brain metastases: correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis. *J Neurosurg* 1994;81:560-566.
34. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. VEGF enhanced angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000;106:829-838.
35. Dobrogowska DH, Lossinsky AS, Tarnawski M, Vorbrodt AW. Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *J Neurocytol* 1998;27:163-173.

36. van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999;104:1613-1620.
37. Pluta R, Lossinsky HM, Mossakovski MJ. Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res* 1994;633:41-52
38. Shen Q, Qian X, Capela A, Temple S. Stem cells in the embryonic cerebral cortex: their role in histogenesis and patterning. *J Neurobio*l 1998;36:162-174.
39. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999;19:8487-8497.
40. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313-1317.
41. Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa Ki, Miyata T, Okano H, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001;32:1890-1896.
42. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000; 425:479-494.
43. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:7153-7160.
44. Salhia B, Angelov L, Roncari L, Wu X, Shannon P, Guha A. Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neuroangiogenesis. *Brain Res* 2000;883:87-97.