당뇨병성 신증의 발생과 진행에 관여하는 산화성 스트레스의 역할

연세대학교 의과대학 약리학교실

하 헌 주 · 김 경 환

인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 혈당을 정상에 가까이 유지하면 당뇨병성 신증을 포함한 미세 혈관 합병증의 발생[1, 2]과 진행[2]이 지연되기 때문에 고혈당이 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 결정하는 주된 인자로 여겨진다. 고혈당에 의해 활성화되는 여러 생화학적 변화들[3-7] 즉, 후기 당화 산물(advanced glycosylation end products: AGEs)의 생성, polyol 대사 항진, NADH/NAD비가 증가된 pseudohypoxic 상태, 포도당 대사에 따른 diacylglycerol 생산 증가와 그에 따른 protein kinase C(PKC)의 활성화 및 산화성 스트레스등이 복합되어 당뇨병성 신증을 일으키지만 본 글은 산화성 스트레스의 병인론적 역할에 초점을 맞추고자 한다.

산화성 스트레스와 조직 손상

활성 산소란 산소가 가지는 화학적 특성으로 인하여 생성되는 산소 free radical(oxygen free radical) 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소 화합물을 일컫는데(표 1), 모두 반응성이 높은 것이 특징이다. 산소를 호흡하는 호기성 생물체인 우리 사람은 정상 생리 반응에서 superoxide anion($O_2^{\cdot -}$), 과산화수소(H_2O_2) 및 hydroxyl radical($HO^{\cdot}$) 등 활성 산소를 끊임없이 생성하여 정상 간 조직의 경우 $O_2^{\cdot -}$는 10^{-12}-10^{-11}M을 H_2O_2는 10^{-9}-10^{-7}M의 농도를 유지한다. 끊임없이 생성되는 활성 산소에 의한 조직 손상을 극소화하기 위하여 우리 생체는 세포내 구획화(cellular compartmentalization)라는 효율적인 방어 기전을 지니고 있다. 즉, 세포내 소기관인 mitochondria, lysosome, peroxisome 및 세포질에서 각각 만들어진 활성 산소는 동일 소기관 내에 존재하는 표 2에 열거한 효소계 및 비효소계 항산화계에 의해서 제거되므로 평상시에

표 1. 활성산소

$O_2^{\cdot -}$	superoxide radical(혹은 anion)
$HO_2^{\cdot}$	perhydroxy radical
H_2O_2	hydrogen peroxide
$HO^{\cdot}$	hydroxyl radical
$^1O_2$	singlet oxygen
OCl^-	hypochlorite
O_3	ozone

표 2. 내인성 항산화계

Agent	Comments
항산화 효소계	
Cytochrome oxidase system	Detoxifies 95-99% of O_2 in cell
Superoxide dismutase(SOD)	Detoxifies superoxide anion
Catalase	Detoxifies hydrogen peroxide
Glutathione peroxidase	Detoxifies hydrogen peroxide
Peroxidase	Detoxifies hydrogen peroxide
비효소적 항산화계	
지용성 항산화계	
α-Tocopherol	Vitamin E
β-Carotene	Vitamin A precursor
수용성 항산화계	
Glutathione	
Ascorbic acid	Vitamin C
Urate	Scavenges O_2, $OH^{\cdot}$
Cysteine	Scavenges O_2, $OH^{\cdot}$
Albumin	Scavenges LOOH, HOCl
Bilirubin	Scavenges O_2, $OH^{\cdot}$
Ceruloplasin	Possible mechanism similar to SOD
Transferrin	Binds circulating iron
Lactoferrin	Binds circulating iron
Ferritin	Binds tissue iron

는 큰 탈없이 지내고 있다. 그러나 어떤 원인에 의해서든지 활성 산소의 생성이 순간의 방어 기전을 넘어서게 되면 활성 산소에 의한 조직 손상이 초래된다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면, 활성 산소가 이롭게 작용하는 경우는 세균 감염 때의 산화성 살균 작용이고 그 이외의 모든 경우는 과다한 활성 산소 생성이 조직 손상을 유발하여 궁극적으로 질병을 일으킨다. 대표적인 허혈/재관류 조직 손상에서부터 각종 성인병, 발암 및 노화에 이르기까지 다양한 질병이 과다하게 생성된 활성 산소에의한 산화성 스트레스에 기인한다고 여겨진다[8].

한편, 다양한 형태의 신질환의 발생에 산화성 스트레스가 관여하고[9-12]항산화제 결핍을 유발한 흰쥐의 신장에서 간질의 섬유화가 발생한다[13]는 보고를 보면 신장은 산화성 스트레스에 대단히 예민한 장기인 듯하다. 이는 곧 당뇨병에서 산화성 스트레스가 증가하면 신장이 쉽게 손상을 받을 수 있음을 시사한다.

고혈당에 의한 산화성 스트레스의 증가

당뇨병성 신증의 발생과 진행을 결정하는 주된 인자인 고혈당[1, 2]은 활성 산소의 생성을 증가시킬 뿐 아니라 방어 기전을 약화시키는 두가지 측면 모두에서 산화성 스트레스를 증가시킬 수 있다. 즉, 포도당의 자가 산화(autooxidation), AGEs의 생성 및 polyol 대사에 수반된 증가된 NADH/NAD 비 등이 활성 산소의 생성을 증가시키고 활성 산소를 제거하는데 관여하는 효소인 superoxide dismutase나 catalase 등이 고혈당에 의해 당화되므써 효소의 기능이 약화될 수 있다.

산화성 스트레스가 조직 손상을 유발하는데 중요한 역할을 한다고 인정받기 위해서는 표 3에 요약한 조건을 충족하여야 한다. 즉, 당뇨병성 신증의 임상적 증상이 나타날 때 또는 그 이전에 신장의 산화성 스트레스가 증가하여야 하고, 생체외 실험에서 표적 조직의 산화성 스트레스가 고농도의 포도당이나 AGEs에 의해서 증가할 뿐아니라 활성산소에 의해서 당뇨병성 신증과 유사한 조직 손상이 일어나고, 나아가 항산화제에 의해서 생체외 실험 모델, 실험 동물 및 당뇨 환자의 당뇨병성 신증이 완화되어야 한다. 다음에 요약되어 있듯이, 현재까지의 결과들이 이들 조건을 어느 정도 만족시키고 있다.

표 3. 산화성 스트레스가 조직 손상에 주된 병인론으로 인정받기 위하여 충족시켜야 할 요건들

1. 활성 산소가 손상된 조직에 존재하여야 한다.
2. 적합한 농도의 활성 산소를 조직에 투여했을 때 조직 손상에서 관찰되는 대부분의 변화가 초래되어야 한다.
3. 활성산소를 제거하거나 그 생성을 억제할 때 조직 손상이 완화되어야 하고, 손상의 완화 정도와 활성산소의 제거 또는 생성 억제 정도에 상관성이 있어야 한다.

조직이나 장기내 산화성 스트레스의 정도를 정량하기 위해서는 활성 산소의 농도를 정확하게 측정하여야 한다. 그러나 활성 산소의 체내 반감기는 hydroxyl radical이 10^{-9}초 정도이고 peroxy radical이나 산화질소(nitric oxide : NO) 등이 10^{0}초로써 매우 짧기 때문에 생체내 활성 산소의 농도를 일반적인 실험실 기기로 정확하게 측정하는 데에는 한계가 있다. 현재로서는 단백질, 지질 및 핵산 등 체내 거대 분자가 활성 산소와 반응하여 생성되는 산화물을 산화성 스트레스의 지표로 측정하고 있다. 세포의 정상 기능을 유지하는데 필수적인 세포막 지질은 활성 산소와 쉽게 반응하여 산화되고 세포 독성을 유발한다. 그런데 지질의 산화물인 지질과산화물은 어렵지 않게 측정될 수 있으므로 오래 전부터 조직내 산화성 스트레스의 지표로 이용되어 왔다[14].

Streptozotocin을 투여하여 실험적 당뇨병을 유발한 흰쥐에서 단백뇨가 출현할 때 신조직과 요중 지질과산화물이 증가하므로[15-18] 당뇨병성 신증과 산화성 스트레스의 상호 관련성을 짐작할 수 있다. 당뇨쥐의 신조직내 지질과산화물이 증가하지 않는다는 보고[19]도 있는데, 이는 아마도 당뇨 유발의 정도 등 실험 조건의 차이에 기인하던지 또는 malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct 형성물로서 측정되는 지질과산화물이 산화성 스트레스의 지표로서 지니는 한계성에 기인한다고 여겨진다[20, 21]. 8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)은 DNA와 활성 산소가 생체내에서 반응하여 생성되는데 근래에 와서 조직의 산화성 스트레스의 지표로서 인정받기 시작하였다[22]. 이 8-OHdG 역시 단백뇨가 출현한 당뇨쥐의 신장에서 증가하여[16] 당뇨병성 신증과 신장의 산화성 스트레스 증가와의 상호 관련성을 좀 더 확실하게 시사하였다.

당뇨병성 신증 환자에서 신장의 특징적인 구조적

변화는 혈관간질(mesangium)의 확장과 사구체 기저막의 비후인데, 특히 혈관간질의 용적이 증가할수록 사구체 여과율이 감소하여 혈관간질의 확장이 당뇨병성 신증의 임상상과 가장 밀접한 관계를 보인다[23]. 질병의 정확한 발생 기전을 이해하여야만 확실한 치료를 제공할 수 있기 때문에 혈관간질의 확장 기전을 정확하게 이해하고자 많은 연구가 추진되고 있다. Ayo 등[24, 25]은 사구체 혈관간 세포(mesangial cells)를 고농도의 포도당으로 배양할 때에 혈관간 세포의 세포외 기질(extracellular matrix)의 mRNA 표현과 단백 합성이 증가함을 보고하여 고농도의 포도당이 혈관간질을 확장시키는 주된 인자임을 보다 직접적으로 제시하였고, 고농도의 포도당에서 배양한 혈관간 세포를 당뇨병성 신증의 발생 기전을 세포 및 분자 수준에서 이해하기에 적합한 생체외 실험 모델로 사용할 수 있는 기초를 제공하였다.

고농도의 포도당은 L형 포도당이나 mannitol과 달리 배양 혈관간 세포[26-28]와 사구체[29]의 지질과산화를 농도 의존적으로 증가시켜 단순한 삼투압의 증가가 아닌 포도당 대사에 기인한 산화성 스트레스 증가가 일어남을 알 수 있다. 그러나, 당뇨 동물의 신조직과 고농도의 포도당으로 자극한 혈관간 세포의 단순한 산화성 스트레스 증가는 당뇨병성 신증과의 상관 관계를 암시할 뿐 인과관계를 시사하기에는 충분하지 않다. 적합한 항산화제의 투여가 당뇨병성 신증의발생을 억제하여야만 산화성 스트레스가 주된 병인론임을 확인할 수 있다.

생체외 실험 모델에서 항산화제는 고농도의 포도당에 의한 배양 혈관간 세포와 사구체의 지질과산화를 의의있게 억제하였을 뿐 아니라 고농도의 포도당에 의한 혈관간 세포의 collagen[26, 27]과 firbronectin[28, 30]의 합성을 의의있게 억제하였다. 나아가 대표적 활성산소의 하나인 과산화수소 자체도 혈관간 세포의 fibronectin mRNA 표현과 단백의 합성 증가를 유발하므로[28] 고농도의 포도당에의한 산화성 스트레스 증가가 혈관간 세포의 세포외 기질 합성 증가에 주된 역할을 함을 확인 할 수 있다. 정확하게 어떤 활성 산소가 관여하는지에 대해서는 아직 분명하지 않으나, Hunt 등[31]은 포도당에 의한 단백의 산화에 hydroxyl radical이 관여한다고 하였다. Superoxide anion, 과산화수소 및 hydroxyl radical 등 각각의 활성 산소를 특이하게 제거하는 superoxide dismutase, catalase 및 dimethylthiourea가 고농도의 포도당에 의한 세포외 기질 합성에 미치는 영향을 비교 검색하므로써 각 활성 산소의 관여 정도를 판단할 수 있으리라 여겨진다.

내인성 항산화제인 taurine의 투여는 당뇨쥐의 단백뇨, 사구체 비대 및 사구체내 collagen 단백의 축적을 억제하고[18] TGF-β1 mRNA 표현 증가를 억제하여[32] 산화성 스트레스가 당뇨병성 신증의 발생에 주된 인자임을 실험 동물에서도 확인할 수 있다. TGF-β1은 당뇨병성 신장의 세포외 기질 합성을 유발하는 최종 매개물로 인정된다[33]. Vitamin E가 당뇨병성 신증에 미치는 효과는 연구자에 따라 서로 다르게 보고되고 있다[32, 35]. Vitamin E가 PKC의 활성화를 억제하므로써 당뇨쥐의 단백뇨를 의의있게 억제한[35] 반면 taurine의 신보호 효과가 관찰된 동일한 연구[32]에서는 오히려 당뇨쥐의 생존율을 감소시키고 지질과산화를 증가시키는 등 당뇨병성 신증을 악화시키는 것으로 보아 아마도 실험 조건에 따라 vitamin E가 항산화제 또는 산화 촉진제로 작용할 수 있는 듯 하다. 실험 동물의 당뇨병성 신증에대한 항산화제의 보호 효과나 그 기전에 대해서는 현재로서는 확실하지 않지만 당뇨병 환자를 대상으로한 임상 시험이 진행되고 있어[36] 그 결과가 주목된다.

고농도의 포도당에 의한 산화성 스트레스 증가에 미치는 PKC의 역할

당뇨병성 혈관 합병증의 발생에 관여하는 주된 인자[6]인 PKC는 산화성 스트레스에 관여하고 사구체는 PKC에 의한 산화성 스트레스에 민감하게 반응한다[37-39]. 본 연구진은 PKC 활성제인 phorbol ester가 혈관간 세포의 fibronectin mRNA 표현과 단백 합성을 의의있게 증가시키고 PKC 억제는 고농도의 포도당이나 과산화수소에 의한 fibronectin 생산 증가를 의의있게 억제함을 관찰하여[28] PKC 활성화가 고농도의 포도당에 의한 산화성 스트레스 증가에 관여함을 시사하였다.

한편, 고농도의 포도당에의한 AGEs의 생산[40]과 AGEs의 작용[41, 42]에도 산화성 스트레스가 관여한다. AGEs인 당화 알부민을 정상 흰쥐에게 투여할 때에 혈관벽에 지질과산화물이 침착되고 산화성 스트레스에 민감하게 반응하는 hem oxygenase의 mRNA가 증

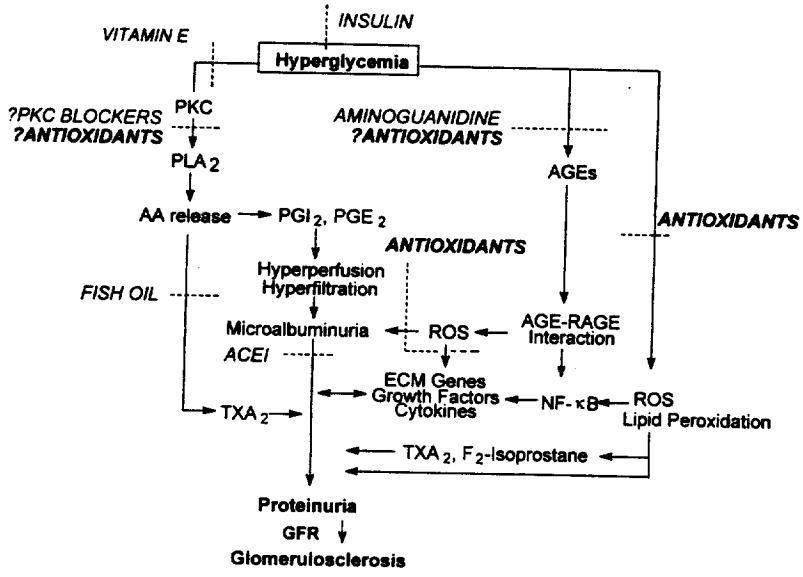


그림 1. 산화성 스트레스와 당뇨병성 신증

가할 뿐아니라 항산화제나 AGEs 수용체에 대한 항체 투여는 이들 변화를 의의있게 억제하였다[41]. 또한 당뇨쥐의 신장내 혈관 투과성의 증가도 AGEs 수용체를 억제하거나 항산화제를 투여하므로써 의의있게 억제되었다[42]. 당화 저밀도 지단백에 의한 혈관간 세포의 fibronectin mRNA 표현과 단백 합성 증가에도 PKC의 활성화가 관여하므로[43], AGEs에의한 산화성 증가에도 PKC의 활성화가 관여하는지를 검색할 필요가 있다고 생각된다.

그림 1에 요약하였듯이, 고혈당에 기인한 당뇨병성 신증의 발생과 진행에는 여러 생화학적 변화들이 복합적으로 작용하는데 산화성 스트레스 증가가 여러 단계에서 공통 인자로 작용하는 듯 하다.

참 고 문 헌

1) Reichard P, Nilsson B-Y, Roseuqvist U : *The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. N Engl J Med 329:304-309, 1993*

2) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group : *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 329:977-986, 1993*

3) Greene D, Lattimer SA, Sima AAF : *Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. N Engl J Med 316:599-606, 1987*

4) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H : *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 318:1315-1321 1988*

5) Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR Van Den Enden M, Kilo C, Tilton RG : *Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. Diabetes 42:801-813, 1993*

6) King GL Ishii H, Koya D : *Diabetic vascular dysfunctions: A model of excessive activation of protein kinase C. Kidney Int 52, Suppl 60:S77-S85, 1997*

7) Baynes JW : *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40:405-412, 1991*

8) Halliwell B, Gutteridge JMC : *Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : Clarendon Press, 1989*

9) Baud L, Ardaillou L : *Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. Am J Phsyiol 251:F765-F776, 1986*

10) Shah SV : *Role of reactive oxygen metabolites in*

experimental glomerular disease. Kidney Int 35:1093-1106, 1989

11) Diamond JR : *The role of reactive oxygen metabolites in animal models of glomerular disease. Am J Kidney Dis 19:292-300, 1992*

12) Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH : *The role of oxidants in progressive renal injury. Kidney Int 45, Suppl 45:S111-S115, 1994*

13) Nath KA, Salahudeen AK : *Introduction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. J Clin Invest 86:1179-1192, 1990*

14) Haugarrd N : *Cellular mechanisms of oxygen toxicity. Physiol Rev 48:311-373, 1968*

15) Tomino Y, Wang LN, Fukui M, Taguchi Y, Koide H : *Glomerular nonenzymatic glycosylation and lipid peroxidation are increased in the early phase of streptozotocin-induced diabetic rats prior to major histopathologic alterations. Nephron 59:632-636, 1991*

16) Ha H, Kim C, Son Y, Chung MH, Kim KH : *DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. Free Radical Biol Med 16:271-274, 1994*

17) Ha H, Kim KH : *Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropahty. Kidney Int 48, Suppl 51:S18-S21, 1995*

18) Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Ma C, Valderrrama E, Fuchs A, Tarectecan AA, Rao PS, Sturman JA, Boles TH, Fu MX, Baynes J : *Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. Am J Physiol 269:F429-F438, 1995*

19) Parinandi NL, Thompson EW, Schmid HHO : *Diabetic heart and kidney exhibit increased resistance to lipidperoxidation. Biochim Biophys Acta 1047:63-69, 1990*

20) Gutteridge JMC, Halliwell B : *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. Trends Biol Sci 15:129-135, 1990*

21) Janero DR : *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biol Med 9:515-540, 1990*

22) Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y : *Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydrox ydeoxyguanosine in rat target organ DNA. Carcinogenesis 8:1959-1961, 1987*

23) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EM, Sutherland DM, Brown DM, Goets FC : *Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest 74:1143-1155, 1984*

24) Ayo SH, Radnik RA, Garoni J, Glass II WF, Kreisberg JI : *High glucose cause an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. Am J Pathol 136:1339-1348, 1990*

25) Ayo SH, Radnik RA, Glass II WF, Garoni J, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI : *Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high glucose medium. Am J Phsyiol 260:F185-F191, 1991*

26) Trachtman H, Futterweit S, Bienkowski RS : *Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophy Res Comm 191:759-765, 1993*

27) Trachtman H : *Vitamin E prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. Micro Vasc Res 47:232-239, 1994*

28) Ha H, Lee SH, Kim KH : *Involvement of oxidative stress associated with high glucose in transforming growth factor-β and fibronectin production. (abstract) J Am Soc Nephrol 7:1870, 1996*

29) Ha H, Yoon SJ, Kim KH : *High glucose can induce lipid peroxidation in the isolated rat glomeruli. Kidney Int 46:1620-1626, 1994*

30) Ha H, Lee SH, Kim KH : *Effects of rebamipide in a model of experimental diabetes and on the synthesis of transforming growth factor-β and fibronectin, and lipid peroxidation induced by high glucose in cultured mesangial cells. J Pharmacol Exp Ther 281:1457-1462, 1997*

31) Hunt JV, Dean RT, Wolf SP : *Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Biochem J 256:205-212, 1988*

32) Ha H, Yu M, Kim KH : *Amelioraation of glomerular TGF-β1 synthesis and proteinuria in daibetic rats by antioxidants. J Am Soc Nephrol, 1997*

33) Border WA, Yamamoto T, Noble NA : Transforming growth factor-β in diabetic nephropathy. Diabetes/Metabol Rev 12:309-339, 1996

34) Ziyadeh F, Han DC : *Involvement of transforming growth factor-β and its receptors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Kidney Int 52, Suppl 60:S7-S11, 1997*

35) oya D, Lee I-K, Ishii H, Kanoh H, King GL : *Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment of d-α-tochopherol. J Am Soc Nephrol 8:426-435, 1997*

36) Gerstein HC, Bosch J, Pogue J, Taylor DW, Zinman B, Yusuf S : *Rationale and design of a large study to evaluate the renal and cardiovascular effects of an AGE inhibitor and vitamin E in high-risk patients with diabetes- The MICRO-HOPE Study. Daibetes Care 11:1225-1228, 1996*

37) Sah SV : *Light emission by isolated rat glomeruli in response to phorbol myristate acetate. J Lab Clin Med 98:46-56, 1981*

38) Myanoshita A, Takahash T, Endou H : *Inhibitory effect of cyclic AMP on phorbol-stimulated production of reactive oxygen metabolites in rat glomeruli. Biochem Biophys Res Commun 30:519-525, 1989*

39) Ha H, Endou H : *Lipid peroxidation in isolated rat nephron segments. Am J Physiol 263: F201-F207, 1992*

40) Trachtman H, Futterweit S, Prenner J, Hanon S : *Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat meangial cells. Biochem Biophys Res Commun 199:346-352, 1994*

41) Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM : *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycosylation end products with their receptors/binding proteins. J Biol Chem 269: 9889-9897, 1994*

42) Wautier JL, Chappey O, Wautier MP, Hori O, Stern D, Schmidt AM : *Recpetor mediated endothelial dysfunction in diabetic vasculopathy: sRAGE blocks hyperpermeability. J Clin Invest 97:238, 1996*

43) Ha H, Kamanna VS, Kirschenbaum MA, Kim KH : *Role of glycated low density lipoprotein in mesangial extracellular matrix synthesis. Kidney Int 52, Suppl 60:S54-S59, 1997*