

## 당뇨병 혈관합병증 발생기전으로 세포사의 역할 및 신호전달체계의 이상

계명대학교 의과대학 내과학 교실 및 의과학 연구소

### 이 인 규

당뇨병환자의 만성혈관합병증은 정도의 차이는 있으나, 당뇨병 발생후 10-20년이 지난 대부분의 당뇨병환자에서 관찰된다. 당뇨병 혈관합병증의 호발하는 부위로는 망막, 신사구체 및 신경조직의 미세혈관(microvascular blood vessels), 하지, 경동맥 및 관상동맥의 대혈관(macrovacular blood vessel) 등을 들 수 있다. 이러한 혈관합병증의 중요한 원인으로는 고혈당 그 자체를 들 수 있으며 최근 DCCT (Diabetes Control and Complication Trial)의 연구결과<sup>1)</sup>로 이와 같은 사실은 더욱 분명해졌다. 그러나 현재까지 많은 연구에도 불구하고 고혈당이 어떤 경로를 통해 혈관 합병증을 초래할 수 있는지를 설명할 수 있는 단일 가설은 없다. 최근까지 고혈당이 당뇨병 합병증을 유발시키는 기전으로 알려진 것으로는 당화단백질 및 당화종산물(advanced glycosylation and product)의 형성<sup>2)</sup>, 폴리올(polyol) 경로의 이상<sup>3)</sup>, 미오인노시톨(myoinositol)의 감소<sup>4)</sup>, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성의 감소<sup>5)</sup>, Superoxide와 산화지질단백(oxidized lipoprotein)을 포함하는 포도당 산화(glycoxidation) 산물의 생성<sup>6,7)</sup> 및 Diacylglycerol (DAG), Protein Kinase C(PKC) 경로의 활성화<sup>5,6,7)</sup> 등이 있다.

### 당뇨병 혈관합병증발생기전으로서 세포사

당뇨병 혈관합병증에서 나타나는 혈관의 형태학적 변화는 장기마다 다른 양상으로 나타난다. 이를 가운데 세포의 소실이 형태학적 특징으로 잘 알려진 경우는 망막의 모세혈관 pericyte와 대혈관내피세포의 소실이다. 대개의 일반적인 말초혈관의 구성세포는 혈관내피세포의 수가 pericyte수보다 10-20배가 많다. 이와는 달리 정상 망막혈관은

혈관내피세포와 pericyte의 비율이 1:1 정도로 구성되어 있다<sup>8)</sup>. 그러나 당뇨병 상태에서는 pericyte가 수적 감소를 보이며 이 비율이 변한다. 즉, Cogan과 Kuwabara 등은 당뇨병이 발생한지 수년이 지난 당뇨병 환자의 망막에서는 혈관내피세포에 대한 pericyte의 비율이 1:4-1:10까지 감소되어 있는 것을 발견하였다. Pericyte의 소실로 모세혈관의 변화가 심하게 초래되면 모세혈관은 혈액을 받아들일 능력을 소실하게 되고 혈액이 없는 유령모세혈관(ghost capillaries)를 형성하게 된다. 그리고 이런 모세혈관이 혈액을 공급하던 장소는 심한 저산소증(anoxia) 상태가 된다. 그리고 손상된 일부혈관에서는 혈액이 누출되고, 혈액내의 성장인자와 저산소상태에서 유발된 국소 성장인자로 이한 신생혈관의 증식이 일어나 증식성 망막변화를 초래하게 된다. 이러한 변화의 원인을 밝히기 위하여 최근의 pericyte의 세포배양을 통한 연구결과를 보면 고포도당 농도의 배양액은 직접적으로 pericyte 증식을 억제한다.

당뇨병환자에서 동맥경화증의 발생은 매우 증가되어 있으며 이런 현상은 대혈관내피세포의 소실이나 증식억제와 깊은 연관이 있다고 사료된다. 즉, 어떠한 원인으로 혈관내피세포의 손상이 일어나면 주위의 혈관내피세포의 증식과 이동으로 손상부위가 회복되나<sup>14)</sup>, 당뇨병 상태에서는 회복이 어렵다. 당뇨병, 즉 고혈당은 혈관내피세포의 손상과 기능에 이상을 초래한다. Lorenzi 등<sup>11)</sup>과 Stout 등<sup>12)</sup>은 고포도당 농도상태에서 혈관내피세포의 증식이 억제된다는 것을 보고하였고 Naeser 등<sup>13)</sup>도 고포도당 농도가 망막모세혈관 내피세포의 증식을 억제한다고 하였다. 그리고 혈관내피세포가 손상된 부위에는 혈소판의 침착, 평활근세포의 증식

등이 일어나 동맥경화증이 발생한다. Sabina 등<sup>32)</sup>은 사람의 제대정맥혈관 내피세포(HUVEC)를 사용한 실험에서 30mmol/l의 포도당이 든 배양액이 단기(48-72시간) 및 장기(13±1일)간 배양에서 apoptosis가 유발된다고 한다. [3H] thymidine 섭취율 연구에서, 5mmol/l의 포도당 농도에서 배양한 것과 비교해 볼때는 48시간에는 20%정도, 장기간(13±1일)에서는 40%정도의 HUVEC 세포의 세포사가 유발되었다.

### 고혈당과 PKC 활성화

체내에서 혈관내피세포는 phospholipase 관련 수용체를 자극하는  $\text{Ca}^{++}$ -이동호르몬, 성장인자들의 영향을 받고 있다. 이런 인자들은 혈관내피세포에서 세포막의 인지질을 가수분해시키는 phospholipase C을 활성화시켜 DAG를 생성한다. Phospholipase D는 phosphatidic acid를 형성한다. 이것도 역시 가수분해되어 DAG를 형성한다. 그러므로 성장인자들에 의해 생성된 DAG는 PKC 활성화를 유도한다. 1990년 이래, 배양한 혈관세포에서 고농도 포도당이 DAG치를 상승시키며 PKC를 활성화시킨다는 보고와 함께 당뇨병 동물의 혈관조직에서도 DAG치의 상승 및 PKC 활성화 되어있다는 여러 보고가 있었다<sup>10, 15, 16)</sup>. 그리고 고농도 포도당은 DAG 신생(de novo synthesis)에 관여한다. 세포 배양액의 포도당 농도를 증가시키면 세포내 포도당 농도가 증가하게 된다. 세포내의 상승된 포도당은 NADH/NAD<sup>+</sup> 비율을 올리며 sorbitol 생성을 증가시킨다. 또 glycerol-3-phosphate 생성을 증가시키며 1, 2 diacylglycerol (DAG) 신생을 증가시킨다. 이때 신생되는 DAG는 주로 Palmitate labeled DAG이며 특히 PKC  $\beta$ II 아형의 활성화를 유발한다. 그리고 활성화된 PKC  $\beta$ II는 세포내 여러가지 문제를 일으킨다. Inoguchi 등은 당뇨병 환자의 Monocyte에서 증가된 Palmitate labeled DAG치는 철저한 혈당조절로 정상화 시킬 수 있다고 하였다<sup>10)</sup>. 그러나 당뇨병이 유발된 후 3-4주가 지난 쥐에서는 이런 현상을 볼 수 없었다<sup>10)</sup>고 한다.

고혈당으로 야기된 DAG-PKC 경로의 활성화는 세포질(cytosolic) 혹은 칼슘(clacium)에 민감한 phospholipase A2(cPLA2)의 활성화를 유발하며 Prostaglandin(PG) E2의 생성을 증가시키고  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase<sup>10, 16)</sup>를 억제시킨다. 그리고 고혈당은 PKC 활성화를 통하여 caldesmon, plasmonogen

activator inhibitor 1, fibronectin 및 그외 기저막 단백질의 유전자를 활성화시킨다<sup>16, 17, 18)</sup>.

또한 PKC 활성화<sup>15)</sup>는 endothelin과 vascular endothelial growth factor 등의 여러 성장인자들과 시토킨 등의 분비를 촉진시키고 epidermal growth factor receptor의 phosphorylation을 증가시키며 C-fos expression을 증가시킨다. 이상의 PKC 활성화로 야기된 여러 호르몬, 성장인자 및 시토킨들은 혈관투과성의 증가, 흐름의 증가, 수축력의 이상, 응고력의 증가, 기저막 비후, 신생혈관의 생성 등 혈관의 여러가지 이상을 초래하게 한다<sup>16, 17, 18, 19)</sup>.

최근 King 등은 Vitamin E의 투여로 DAG-PKC 활성화를 정상화시켜서 당뇨병의 합병증을 예방하려는 시도에 관한 여러편의 연구결과를 보고하였다. 이 중 혈관 합병증에 관한 Vitamin E 투여 결과로 보면, Vitamin E는 DAG치를 감소시키고 PKC 활성화를 억제시켜 당뇨병 쥐에서 대동맥, 심장의 PKC 활성화를 정상화시킨다. Vitamin E 투여로 인한 PKC 활성화의 억제는 PKC  $\beta$ II 아형(isoform)에 특이적으로 나타난다<sup>19)</sup>(Fig.3).

### 고혈당과 Oxidative stress

비특이적인 방법이지만 thiobarbituric acid (TBA) 검사방법을 사용하여 조사해보면 당뇨병 환자의 혈장내 과산화지질(lipid peroxide)치는 정상인에 비하여 유의하게 높으며 망막증이 없는 당뇨병 환자군과 비교해볼때는 망막증을 동반한 당뇨병 환자군에서 혈장내 과산화지질치가 유의하게 높고 최근에 보고에 의하면 conjugated diene 치도 높다고 한다. 당뇨병 상태의 쥐에서도 보면 신장, 망막의 과산화지질치가 정상쥐에 비해 2배 이상 증가되어 있으며 망막증의 정도에 따라 망막의 과산화지질치가 더 증가되어 있다.

한편 혈장내 아스코르бин산(ascorbic acid)치는 당뇨병 동물과 환자에서 저하되어 있으며 아스코르빈산의 일차적 산화산물인 dehydroascorbate치는 증가되어 있다. 그리고 항산화제인 Vitamin E치도 당뇨쥐의 여러조직, IDDM 환자의 혈소판 및 망막합병증을 동반한 NIDDM 환자 등에서 저하되어 있다고 한다. 이러한 체내 항산화제치의 저하는 고혈당 상태에서 oxidative stress가 증가하였거나 transition metal과의 반응이 증가하여 체내 항산화제의 소모가 많았음을 나타낸다. 그 증거들로서 아주 경한 hemochromatosis 환자가 당뇨병

상태에서는 증상이 심해지거나 iron chelator인 desferrioxamine을 사용하면 혈당, 고지질증을 쉽게 호전시킬 수 있고 당뇨병 환자의 혈중 copper치는 정상인에 비해 유의하게 높으며 합병증을 동반하였을 경우 더욱 상승되어 있다는 점들을 들 수 있다.

그리고 당화 단백질의 생성시에는 포도당의 autoxidation이 일어나 유리산소기(oxygen free radical)과 과산화수소(hydrogen peroxide)의 생성이 증가하고 이때 생성된 유리산소기나 과산화수소는 단백질의 구조변화를 유발한다. 이러한 변화는 매우 천천히(수일에서 수주) 유발되나 고혈당의 정도에 비례하여 일어난다. Bayne 등은 당화단백의 생성시에 만들어진 Amadori adduct도 산화가 일어나 erythronic acid와 carboxy-methylated lysine residues(CML)을 생성하는데 이 CML치는 정상인에 비해 당뇨병 환자 피부의 collagen층에 유의하게 증가되어 있으며 합병증을 동반한 당뇨병 환자군에서 더욱 증가되어 있음을 볼 수 있다고 하였다.

일상적인 세포간의 작용시에 발생하는 산소유리기(oxygen free radical, OFR) 혹은 반응성산소군(Reactive oxygen species, ROS)은 세포막에서 지질의 과산화, DNA의 손상 등을 초래하므로 체내에서는 이를 제거하기 위한 체계가 상존한다. 이런 항산화제제들로는 Vitamin C, Vitamin E, beta-carotene, coenzyme Q10, catalase, superoxide dismutase 및 selenium, zinc를 포함하는 trace element 등이 있다.

이상의 여러 주장들을 요약하여 보면, 아직까지 당뇨병 혈관 합병증의 기전은 단순하지 않은 다양한 상호작용을 바탕으로 하고 있으며 향후 세포신호 전달체계와 세포사에 대한 보다 깊은 연구가 요구된다.

### 참 고 문 헌

- 1) 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 329:977-86, 1993
- 2) Brownlee M, Cerami A, Vilassara H: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication. N Eng J Med 320: 1161-65, 1989
- 3) Sato Y, Rifkin DB: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells; Activation of a latent transforming growth factor B 1 like molecule by plasmin during coculture, J cell Biol 109: 309-15, 1989
- 4) Greene DA, Lattimer SA, Sima AF: Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complication. N Engl J Med 316:599-606, 1987
- 5) Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Van den Eeden M, Kilo C, Tilton RG: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complication. Diabetes 42:801-13, 1993
- 6) Larkins RG, dunlop ME: The link between hyperglycemia and diabetic neuropathy. Diabetologia 35:499-504, 1992
- 7) Craven PA, DeRubertis FR: Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozocin diabetic rats: Possible medication by glucose. J Clin Invest 83:1667-75, 1989
- 8) Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Moller DE, King GL: Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells Diabetes 42: 80-89, 1992
- 9) Greene DA, Lattimer SA, Siman AA: Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. N Eng J Med 316:599-606, 1987
- 10) Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sortman JR, Heath W, King GL: Preferential elevation of protein kinase C isoform BII and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rat : Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation, Proc Natl Acad Sci 89:11059-63, 1992
- 11) Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S : Glucose toxicity for human endothelial cells in culture: delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. Diabetes 34: 621-627, 1985
- 12) Stout R W : Glucose inhibits replication of cultured human endothelial cells. Diabetologia

- 23: 436-439, 1982
- 13) Naeser P : Cell replication in retinal vessels of streptozotocin diabetic mice. *Acta Ophthalmol* 64: 439-440, 1986
- 14) Reidy M A : Biology of disease: a reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest* 53: 513-520, 1985
- 15) Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL: Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43: 1122-1129, 1994
- 16) Nishio Y, Warren C, Buczek-Thomas JA, Rulfs J, Arelllo LP, Reener EP, Miller TB Jr, Dennis JW, King GL: Identification, cloning and characterization of diabetes and hyperglycemia-induced genes in rat cardiac tissue using mRNA differential display. *J Clin Invest* 96: 1759-1767, 1995
- 17) Nishio Y, Aiello LP, King GL : Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cells identified by mRNA differential display. *FASEB J* 8: 103-106, 1994
- 18) Aiello LP, Robinson GS, Lin Y-W, Nishio Y, King GL: Identification of multiple glucose-related genes in bovine retinal pericytes by mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6231-6234, 1994
- 19) Nishizuka Y : intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614, 1992
- 20) Kramer RM, Roberts EF, Manetta JV, Hyslop PA, Jakubowski JA: Thrombin-induced phospholipase A2 in human platelets. *J Biol Chem* 268: 26796-26804, 1993
- 21) Elledge S J, Richman R, Hall F L et al CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2907-2911, 1992
- 22) Girard F, Strausfeld U, Fernandez A et al Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67 : 1169-1179, 1991
- 23) Levine A J The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 62: 623-651, 1993
- 24) Kosaka C, Sasaguri T, Masuda J et al : Protein kinase C-mediated inhibition of cyclin A expression in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 991-998
- 25) Resnitzky D, Tiefenburn N, Berissi H et al : Interferons and interleukin 6 suppress phosphorylation of the retinoblastoma protein in growth-sensitive hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 402-406, 1992
- 26) Kerr JFR, Wyllie AH< Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 27) Sellins KS, Cohen JJ: Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 139: 3199-3206, 1987
- 28) Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980
- 29) Meraji S, Jayakody L, Senaratne MPJ, Thomson ABR, Kappagoda T: Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes* 36: 987-981, 1987
- 30) Dolgov VV, Zaikina OE, Bondarenko MR et al: Aortic endothelium of alloxan diabetic rabbits: a quantitative study using scanning electron microscopy. *Diabetes* 22: 338-343, 1982
- 31) Kohner EM, Henking P: Correlation of fluorescein angiogram and retinal digest in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 69: 403-414, 1970
- 32) Sabina M, BAumgartner-Parzer, Ludwig Wagner et al : High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells : Diabetes 44:1323-1327, 1995
- 33) De Silva HV, Stuart WD, Park JB et al: Purification and characterization of apolipoprotein. *J Biol Chem* 265: 14292- 14297, 1990
- 34) James RW, Hochstrasser AC, Borghini I et al: Characterization of a human high density

lipoprotein associated protein NA1/NA2: identity with SV-40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis. Arterioscler Thromb 11: 645-652, 1991

35) Murphy BF, Saunders JR, O'Brien MK et al: SP-40, 40 is an inhibitor of C5b-6 initiated hemolysis. Int immunol 1:551-554, 1989