

당뇨병성 미세혈관병증 환자에서 혈중 및 요증 Transforming Growth Factor- β -inducible Gene-h3의 농도

계명대학교 의과대학 내과학교실

류성열 · 도주호 · 황준영 · 박근규 · 김성열
신동우 · 이동욱 · 이인규

Blood and Urine Concentrations of Transforming Growth Factor- β -inducible Gene-h3 in Diabetic Microangiopathy

Sung Yeal Ryo, M.D., Ju Ho Do, M.D., Jun Young Hwang, M.D.,
Keun Kye Park, M.D., Seong Yeol Kim, M.D., Dong Woo Shin, M.D.,
Dong Wook Lee, M.D., In Kyu Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Abstract : Diabetic microangiopathy is a major contributing cause of mortality in patients with diabetes. Despite of conventional therapy to improve hyperglycemia and to control blood pressure, the incidence of diabetic nephropathy is reaching epidemic proportions world wide. Transforming growth factor- β (TGF- β) has been implicated in the pathogenesis of a number of kidney diseases characterized by glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis.

TGF- β -inducible gene-h3(β ig-h3) is a kind of recently identified TGF- β induced gene products. TGF- β is secreted in a latent form and requiring extracellular modification to become biologically active. In vitro, exposure of proximal tubular cells to high glucose concentrations leads to increased TGF- β 1 and collagen expansion as it does in mesangial cells. Biologically active form of TGF- β plays a pathogenetic role in diabetic renal disease and β ig-h3 may be a useful index of TGF- β 1 bioactivity in the kidney. Level of beta2-microglobulin is useful as a parameter to detect the degree of tubular injury and alterations in tubular handling of proteins in patients with proteinuria and glomerular diseases. We measure blood and urine concentrations of TGF- β in diabetic microangiopathy patient.

Since there is a substantial evidence for a cause and effect relationship between upregulation of TGF- β and the progression of diabetic kidney disease, future studies will be needed to establish specific targets along these pathways at which to intervene.

Key words : Diabetic microangiopathy, TGF- β , β ig-h3, Beta2-microglobulin.

서 론

당뇨병성 만성 혈관 합병증은 당뇨병 환자에서의 중요한 사망 원인으로 크게 대혈관 합병증과 미세혈관 합병증으로 나눌 수 있으며, 일단 발병하여 진행된 경우에는 비가역적인 장애를 유발하므로 예방과 조기 치료가 무엇보다 중요하다. 대혈관 합병증은 동맥경화증이 기본 병변으로 여기에는 혀혈성 심질환, 뇌혈관 질환, 말초혈관 질환 등이 있으며 조기에 광범위하면서 빠르게 진행하는 특징을 가지고 일반인에 비해 2-5배 높게 발생하여 주요한 사망원인이 되고 있다(The United Kingdom Prospective Diabetes Study, 1998). 미세혈관 합병증은 25세 이상 성인에서 실명하는 가장 흔한 원인인 당뇨병성 망막증(Sanchez-Thorin, 1998)과 말기 신부전 원인의 약 25%를 차지하는 당뇨병성 신증(Lapuz, 1997) 및 신경병증이 있다.

당뇨병성 혈관 합병증에서 혈관 내피세포와 혈관주위 세포의 증식과 소실은 특징적인 소견이, 혈관세포의 성장과 소실에 관여하는 많은 사이토카인 중 특히 Transforming growth factor- β (TGF- β)는 환자의 혈액에 증가되어 있으며 당뇨병성 합병증이 동반된 신장 및 망막조직에서 만성 미세혈관 합병증을 일으키는 중요한 인자의 하나로 보고되어 있다(Gilber *et al.*, 1998).

TGF- β -inducible gene-h3 (β ig-h3)는 TGF- β 에 의해 발현이 강력히 유도되어 TGF- β 의 down stream에서 중요한 기능을 하는 새로운 세포부착 단백질로서 TGF- β 에 의해 성장이 억제된 인간 폐선암 세포에서 처음으로 cloning되었다(Skonier *et al.*, 1992). Gilber *et al.* (1998)에 의하면 TGF- β 의 세포성장 억제작용과 섭유화를 매개하는 한편 동맥경화와 재협착이 일어난 혈관 내피세포에서 과발현되어 나타나므로 β ig-h3가 당뇨병성 혈관 합병증에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 이상의 사실들로 볼 때 TGF- β 유전자 발현의 증가와 관련이 있다고 알려진 당뇨병 혈관합병증에서 β ig-h3는 TGF- β 의 작용을 매개하여 합병증 발생에 중요한 역할을 할 수 있다고 사료된다.

한편 β 2-microglobulin이 신세뇨관 손상의 정도를 나타내는 척도로 유용하다는 보고가 있다(Mehta *et al.*, 1997; Branten and Wetzel, 1999). 정상적인 상태에서는 사구체에서 여과된 저분자량의 단백질인 β 2-

microglobulin은 완전하게 재흡수되나 단백뇨 환자에서는 신세뇨관 손상에 의한 배설 증가로 인해 소변으로 β 2-microglobulin 배설이 증가한다.

이에 저자들은 최근 경북의대 생화학 교실에서 개발한 β ig-h3 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하여 치료 중인 당뇨병 환자의 혈청과뇨에서 β ig-h3치를 측정하고 당뇨병성 만성 혈관 합병증의 정도와 β ig-h3치의 상관 관계를 조사하였다. 또 환자의 혈청과 소변에서 β 2-microglobulin치를 측정하여 β ig-h3치 및 신손상 정도와의 관계를 평가하였다. 동시에 β ig-h3의 혈중 및뇨중 농도가 당뇨병성 미세혈관 합병증의 발생을 예견할 수 있는지를 규명하고자 하였다.

방 법

계명대학교 동산의료원에 내원한 당뇨병 환자 중 만성 혈관 합병증이 없는 130명(제 I 군)과 당뇨병성 신증으로 진단된 환자 44명(제 II 군), 당뇨병성 증식성 망막증과 신증을 동시에 지닌 22명(제 III 군)을 포함한 총 196명을 대상으로 하였다. 당뇨병의 진단은 National Diabetes Data Group의 진단 기준(ADA, 1997)을 따랐다. 당뇨병성 망막증은 검안경과 형광 안저 혈관 조영술로 판정하였고, 당뇨병성 신증은 신증을 일으킬 수 있는 다른 질병이 없는 환자에서 24시간 소변의 총 단백 배설량이 500 mg 이상인 경우로 하였다.

β ig-h3의 정량은 환자의 혈청 및 24시간 소변을 채취하여 β ig-h3 ELISA kit (경북의대 생화학 교실)를 이용하였다. 혈청과 요중 β ig-h3 농도의 측정은 coating buffer로 희석한 β ig-h3를 well당 200 μ L씩 넣고 습도를 100%가 되도록 유지하면서 밤새 4 °C에 보관하였다가 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 다음 다시 동일한 조건에 보관하여 사용하였다. 희석한 β ig-h3에 대한 1차 항체와 시료 110 μ L를 잘 혼합하여 4 °C에서 밤새 반응을 일으킨 후 항원 항체 혼합물을 중 200 μ L를 취해 미리 β ig-h3로 coating을 한 well에 옮겨 실온에서 30분간 반응시켰다. 항원 항체 혼합물을 버리고 PBS으로 세척한 다음 희석한 2차 항체를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 200 μ L의 기질용액을 첨가

하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응증지액 50-200 μ L를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 흡광도를 분광광도계로 측정하였다.

혈청과 요증 β 2-microglobulin의 정량은 radioimmunoassay kit (Daiichi Radioisotope Labs, Japan)을 이용하여 측정하였고 이를 creatinine을 이용한 사구체 여과량으로 보정하였다. 이렇게 보정한 이유는 24시간 소변량의 차이에 따른 β 2-microglobulin치의 오차를 줄이기 위해서였다.

이상의 결과를 평균과 표준오차로 표시하였고 통계학적인 검증은 non-paired Student's T-test를 이용하였으며 P value 0.05 미만인 경우를 의미가 있는 것으로 판정하였다.

성 적

대상군의 연령은 미세혈관 합병증이 없는 제 1군이 55.1 ± 15.1 세, 당뇨병성 신증을 동반한 제 2군이 59.0 ± 12.7 세, 당뇨병성 신증과 망막증을 동시에 지니고 있는 제 3군이 56.1 ± 11.2 세이었으며 상호간의 유의

한 연령의 차이는 없었다(Table 1).

당뇨병의 유병기간은 제 1군이 86.2 ± 87.7 개월, 제 2군이 125.7 ± 92.2 개월, 제 3군이 171.7 ± 107.1 개월로 나타났다. 당뇨병성 망막증과 신증을 동시에 지닌 제 3군에서 혈관 합병증이 없는 제 1군보다 유병기간이 유의하게($P<0.05$) 길었다(Table 1).

혈청 β ig-h3치는 제 3군이 168.3 ± 50.8 ng/mL로 제 1군의 147.6 ± 56.2 mg/dL보다 유의하게 높았으나 다른 군 사이에는 유의성을 나타내지 않았다($P<0.05$) (Fig. 1, Table 2).

대상군의 소변내 β ig-h3 농도를 뇌 creatinine으로 보정한 수치는 제 1군이 295.8 ± 618.3 ng/dL, 제 2군 220.3 ± 298.6 제 3군이 310.8 ± 493.0 ng/dL 으로 각 군간 유의성있게 차이를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 2).

대상 환자의 혈청 β 2-microglobulin치는 제 1군이 1.4 ± 1.43 ng/dL, 제 2군이 1.8 ± 2.68 ng/dL 제 3군이 1.51 ± 1.81 ng/dL로 양 군간 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

요증 β 2-microglobulin치는 제 1군 1.03 ± 2.62 ng/dL, 제 3군이 1.69 ± 3.56 ng/dL로 각 군간 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table 2).

Table 1. Clinical characteristics of subjects studied

	Group I	Group II	Group III	P value
Number	130	44	22	N-S
Age (yrs)	55.1 ± 15.1	59.0 ± 12.7	56.1 ± 11.2	N-S
Sex (M/F)	54/76	15/29	11/11	N-S
Diabetic duration (months)	86.2 ± 87.7	125.7 ± 92.2	171.7 ± 107.1	<0.05 Group III vs. I

Group I: diabetic patients without complication; Group II: diabetic patients with nephropathy;
Group III: diabetic patients with proliferative retinopathy and nephropathy.
N-S: not significant

고 찰

25세 이상 성인에서 실명의 가장 많은 원인이 되고 있는 당뇨병성 망막증과 전체 말기 신부전환자의 25%를 차지하는 당뇨병성 신증 등 당뇨병으로 인한 만성 혈관 합병증은 당뇨병의 가장 중요한 사망 원인이며 일단 발병하여 진행하는 경우 비가역적인 장애를 유발하므로써 조기에 이를 진단하여 치료를 시작하여야 하

고 예방 또한 무엇보다도 중요하다고 알려져 있다 (The Diabetes Control, Complications trial Research Group, 1993). 그리고 혈당이나 혈압을 고식적인 방법으로 충분히 조절하더라도 당뇨병성 만성 혈관 합병증이 나타나 계속 진행하는 경우가 많으므로 더욱 근본적인 치료와 예방이나 새로운 시도의 필요성이 대두되고 있다(Ritz & Orth, 1999).

진행된 당뇨병성 신증의 경우 특징적인 병리학적인

Table 2. Serum β ig-h3, urine beta ig-h3/urine creatinine

	Serum		Urine	
	β ig-h3 (ng/mL)	β 2-microglobulin (ng/dL)	β ig-h3/ Creatinine (ng/mL)	β 2-microglobulin/ creatinine (ng/dL)
Group I	147.6 \pm 56.2	1.40 \pm 1.43	295.8 \pm 618.3	1.03 \pm 2.62
Group II	156.3 \pm 56.2	1.80 \pm 2.68	220.3 \pm 298.6	1.93 \pm 3.92
Group III	168.3 \pm 50.7*	1.51 \pm 1.81	310.8 \pm 493.0	1.69 \pm 3.56

* P < 0.05 compared with group I; group I: diabetic patients without complication; Group II: diabetic patients with nephropathy; Group III: diabetic patients with proliferative retinopathy and nephropathy.

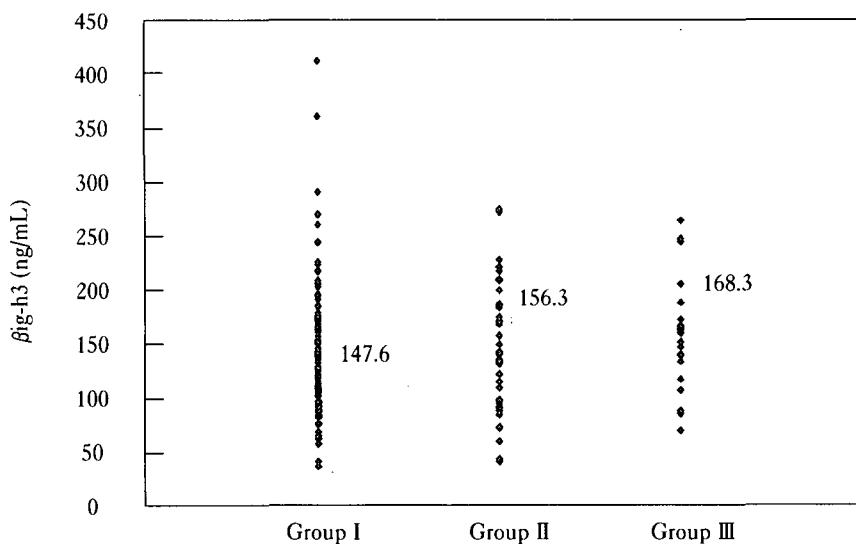


Fig. 1. Serum TGF- β -inducible gene-h3 (β ig-h3) concentration in each group.
Group I: diabetic patients without complication; Group II: diabetic patients with nephropathy; Group III: diabetic patients with proliferative retinopathy and nephropathy.

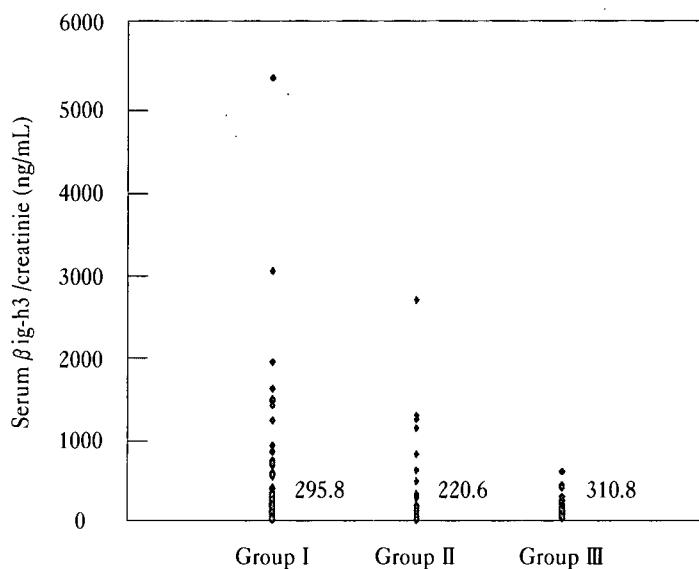


Fig. 2. Urine β ig-h3/creatinine concentration in each group.

Group I: diabetic patients without complication; Group II: diabetic patients with nephropathy; Group III: diabetic patients with proliferative retinopathy and nephropathy.

소견은 사구체 경화, arteriolar hyalinosis와 세뇨간질의 경화 등인데 이 중 미만성으로 일어나는 mesangial matrix의 팽창이 신부전의 진행과 연관이 있다고 보고되고 있다(Fioretto *et al.*, 1995). 이러한 mesangial matrix의 축적에는 TGF- β 가 가장 중요한 역할을 담당하고 있으며 TGF- β 는 국소 사구체 모세혈관암의 증가, 점진적인 mesangial matrix의 축적에 의한 사구체 내 여과면적의 감소 등의 기전을 통해 당뇨병 환자에서 점진적인 사구체 장애를 초래하게 된다(Sharma & Ziyadeh, 1995).

당뇨병 환자에서 고혈당이 만성 혈관 합병증을 유발하는 기전으로는 고혈당으로 인한 유리 산소 라디칼의 생성, 당화단백질 및 당화 최종산물의 형성(Schmidt *et al.*, 1999), 폴리올 경로의 이상 및 protein kinase C (PKC) 경로의 활성화 등에 의해 TGF- β 가 활성화되어 발생한다(Sharma & Ziyadeh, 1995).

TGF- β 는 세포외 기질의 생성에 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 3개의 아형(β 1, β 2, β 3)이 알려져 있으며 인체의 혈액에서 측정되는 아형은 TGF- β 1으로 당뇨병성 신증발현에 중요인자로 작용하며(Rocco *et al.*,

1992) 생체외 실험에서 고농도의 당에 의해 신세뇨관과 메산지움 세포의 TGF- β 1 mRNA발현이 증가하여 신세뇨관과 상피 세포를 증식시키고 collagen, fibronectin, proteoglycan 등의 세포외 기질의 생성을 증가시켜 사구체와 세뇨관 간질의 경화를 일으키게 된다(Ignatz & Massague, 1986; ; Mauer *et al.*, 1989; Barnard *et al.*, 1990; Shankland & Scholey, 1994).

Gilber *et al.* (1997 & 1998)의 연구에 의하면 당뇨에서 신장의 신세뇨관 세포의 β ig-h3 발현이 증가되어 있고 β ig-h3의 농도와 type IV collagen mRNA의 발현 사이에는 의미있는 상관관계가 있으며 β ig-h3 치 발현 정도와 배양한 근위세뇨관 세포의 TGF- β 1의 농도치에 용량 의존성 상관 관계가 있어 당뇨병성 신증에서 TGF- β 1의 활성도를 반영하는데 β ig-h3를 유용한 표식자로 이용할 수 있다고 보고한 바 있다.

β ig-h3는 TGF- β 에 의해 강력하게 발현이 유도되는 최근에 알려진 세포부착 단백질로 네 개의 반복적인 도메인을 지니고 있으며 세포의 부착과 분산에 영향을 주고(Lebaron *et al.*, 1995) 창상 치유에 중요한 역할을 담당하는 것 이외에 세포, 특히 골아세포의 분화를 억

제하는 기능을 갖는다(Lee *et al.*, 2000). 따라서 당뇨병 환자에서 만성 혈관 합병증의 발생에 β ig-h3는 TGF- β 의 작용을 매개함으로서 합병증을 일으키는 데 관여할 것으로 생각된다.

또한 Branten & Witzel (1999)이나 Mehta *et al.*(1997)의 연구에 의하면 질식이나 패혈증 등의 질병이나, 선천성 기형으로 특히 신생아에서 신세뇨관의 기능장애를 초래하는 질환에서 신기능을 나타내는 척도로 β -microglobulin치의 측정이 유용한 것으로 알려져 있다. 본원에서 치료 중인 당뇨병 환자의 혈청과 뇨에서 β ig-h3치를 측정하여 당뇨병성 만성 혈관 합병증의 발생과 β -ig-h3치의 상관 관계를 조사하였고 또 혈청과 소변에서 β 2-microglobulin치를 측정하여 환자의 신장애정도와 비교하였다. 그 결과 증식성 망막증과 신증을 가진 군에서 β ig-h3의 농도가 합병증이 없는 군보다 높게 측정되었으나, 신장애 유무와 혈청과 소변의 β 2-microglobulin치는 합병증 없는 군보다 합병증 있는 군에서 높게 나타났으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 그리고 ELISA방법으로 측정한 소변 및 혈청 β ig-h3치와 소변의 미세 단백뇨 배설량은 도표상 상관성이 있는 경향을 보였다.

그러나 각 군의 편차가 크고, 대상 환자의 수가 적었기 때문에 통계적인 유의성은 없어 앞으로 대상군의 수를 더 늘리고 향후 추시가 필요하다고 사료된다.

요 약

당뇨병 환자에서 혈청 및 요중 β ig-h3농도의 측정이 당뇨병성 미세 혈관 합병증을 판정함에 도움이 되는지를 평가하고, 혈청과 요의 β 2-microglobulin치를 측정하여 신 손상 정도를 나타내는 지표로 β 2-microglobulin을 이용할 수 있는가에 대하여 연구하였다.

계명대학교 동산의료원에 당뇨병으로 내원한 환자 196명을 대상으로 당뇨병성 합병증이 없는 군 130명, 당뇨병성 신증을 지닌 군 44명, 당뇨병성 증식성 망막증과 신증을 동시에 지닌 군 22명으로 분류하여 각각의 군에서 혈청 및 소변의 β ig-h3와 β 2-microglobulin치를 측정하여 비교하였다.

증식성 망막증과 신증을 모두 지닌 군의 혈청 β ig-h3

치가 미세 혈관 합병증이 없는 군보다 유의하게 증가된 반면, 혈청과 소변의 β 2-microglobulin치는 각 군간 유의하게 차이를 나타나지 않았다.

결론적으로 ELISA법으로 측정한 소변 및 혈청의 β ig-h3치와 소변의 미세 단백뇨 배설량간에 통계적으로 유의한 상관성은 관찰할 수 없었으나 연관성이 있으므로 앞으로 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Barnard AJ, Lyons RM, Moses HL: The cell biology of transforming growth factor β . *Biochem Biophys* 1990; **1032**: 79-87.
- Branten AJ, Wetzel JF: Influence of albumin infusion on the urinary excretion of beta2- microglobulin in patients with proteinuria. *Nephron* 1999; **81**: 329-333.
- Fioretto P, Steffes M, Sutherland D, Mauer M: Sequential renal biopsies in insulin dependent diabetic patients. *Kidney Int* 1995; **48**: 1929-1935.
- Gilbert ER, Cox A, McNally PG, *et al.*: Increased epidermal growth factor expression in diabetes related kidney growth. *Diabetologia* 1997; **40**: 778-785.
- Gilber ER, Wilkinson-Berka JL, Johnson, DW, *et al.*: Renal expression of transforming growth factor- β inducible gene-h3 (β ig-h3) in normal and diabetic rats. *Kidney Int* 1998; **10**: 1052-1062.
- Ignatz RA, Massague J: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; **261**: 4337-4345.
- Lapuz MH: Diabetic nephropathy. *Med Clin North Am* 1997; **81**: 679-688.
- Lebaron RG, Bezverkov KI, Zimber MP, Pavelec R, Skonier J, Purchio AF: β ig-h3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor- β , is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 844-849.

- Lee EH, Hwang KH, Kim JE, Kim IS, Kim JH, Joo CK: Overexpression of TGF- β -inducible gene β ig-h3 in anterior polar cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; *in press*.
- Mauer SM, Ellis EN, Bilous RW, Steffes MW: The pathology of diabetic nephropathy. In: *Complication of diabetes mellitus* 1989, 95-101.
- Mehta KP, Ali US, Shankar L, Tirthani D, Ambadekar M: Renal dysfunction detected by beta-2 microglobulinuria in sick neonates. *Indian Pediatrics* 1997; **34**: 101-111.
- Ritz E, Orth S: Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1127-1133.
- Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyaden FN: Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992; **41**: 107-114.
- Sanchez-Thorin JC: The epidemiology of diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin* 1998; **38**: 11-8.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; **84**: 489-497.
- Shankland SJ, Scholey JW: Expression of transforming growth factor- β 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1994; **46**: 430-442.
- Sharma K, Ziyadeh FN: Hyperglycemia and diabetic kidney disease: the case for transforming growth factor- β as a key mediator. *Diabetes* 1995; **44**: 1139-1146.
- Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF: cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* 1992; **11**: 511-522.
- The Diabetes Control, Complications Trial Research Group: The effects of intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; **329**: 977-986.
- UK Prospective Diabetes Study Group: Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS* 1998; **317**: 703-713.