

당뇨병성 신증환자에서 Malondialdehyde(MDA)와 항산화효소의 변화에 관한 연구

계명대학교 의과대학 내과학교실

박 근 용

서 론

당뇨병성 신증은 인슐린 의존형 당뇨병 환자 30-40%에서 말기 신부전으로 진행되어 혈액투석이나 신장이식술을 요하는 심각한 미세혈관 합병증으로 알려져 있다^{1,2)}. 당뇨병성 신증에 대한 병인론은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으나 최근의 연구에 의하면 당뇨병성 신증은 활성산소에 의한 peritubular microcirculation의 변화와 endothelial dysfunction이 한 가지 중요한 원인인자로 알려지고 있다^{3,4)}. 이러한 활성산소는 glucose의 autooxidation에 의해서 생성되기도 하며 사구체 혈관내피세포나 신세뇨관 세포 등에서 생성되는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 이에 저자는 인슐린 의존형 당뇨병환자에서 당뇨병성 신증을 동반한 환자를 대상으로 이들에서 oxidative stress가 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 알아보고자 적혈구와 혈장에서 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 활성산소에 의한 지질 과산화물인 malondialdehyde의 생성정도를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

당뇨병 유병기간이 5년 이상, 24시간 요 알부민 배설량이 100mg 이상인 인슐린 의존형 당뇨병 환자군 9명(M/F : 4/5, 평균연령 : 25.11±6.97세)과 당뇨병 및 기타질환에 이환 과거력이 없는 정상대조군 15명

(M/F : 8/7, 평균연령 : 27.84±3.26세)을 대상으로 하였으며 당뇨병 환자군과 정상 대조군 모두에서 활성산소에 영향을 미치는 vitamin C와 vitamin E 등의 약제를 복용 중인 자는 연구대상에서 제외하였다.

2. 방법

당뇨병 환자군과 정상대조군에서 Ek-EDTA tube와 plain tube에 각각 5cc씩 채혈하여 2500rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 혈청 creatinine, 혈중 cholesterol, fasting blood sugar는 chem-I autoanalyser(Abbott,USA)를 이용하여 측정하였다. 24시간 요알부민은 albumin RIA kit(DPC,USA)를 이용하여 측정하였고, glycated HbA1c는 Dia-stat (Bio-LAD)를 이용하여 측정하였다. 분리된 적혈구는 phosphate buffered saline으로 3회 세척하여 용해시켰다. 혈장과 적혈구의 malondialdehyde(MDA) 측정은 MDA가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은색을 535nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay kit에 의하였다⁹⁾. 혈장과 적혈구의 superoxide dismutase(SOD)를 superoxide anion-generation system으로 사용하여 cytochrome C가 환원되는 양을 측정하는 Hyland 등의 방법¹⁰⁾을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 cytochrome C가 50% 환원되는 양으로 하였다. 혈장과 적혈구의 glutathione peroxidase(GPX)는 glutathione reductase를 glutathione의 환원 system으로 사용하여 GPX에 의해 glutathione이 산화될 때 소모되는 NADPH의 양으로 효소의 활성을 측정하는 Palgia와 Valentine의 방법¹¹⁾을 이용하였다. 혈장과 적혈구의 catalase의 활성 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 사용하여 catalase에 의해 파괴되는 hydrogen peroxide 양을 측정하는 Nelson과 Kiesow의 방법¹²⁾을 이용하였다. 통계

접수 : 1996년 11월 19일

통과 : 1997년 3월 25일

* 이 논문은 96년도 동산의료원 특수과제연구비로 이루어졌다.

Table 1. Clinical Characteristics of Study Population

	Control(n=15)	Diabetic nephropathy(n=9)
Age(years)	27.84± 3.26	25.11± 6.97
Male/Female	8/7	4/5
Duration of IDDM(years)	—	7.11± 1.54
FBS(mg/dl)	94.33± 14.26	148.71± 22.89*
Glycated HbA1c(%)	4.28± 1.14	8.94± 3.01*
Serum creatinine (mg/dl)	0.98± 0.04	1.01± 0.05
Serum cholesterol (mg/dl)	164.93± 11.45	170.20± 12.73
24hours urine albumin (mg/day) [11.65~18.4mg/day]	14.65± 2.06	186.33± 20.08*

* : P value<0.05 vs. control

[] : normal range of 24hours urine albumin values and expressed as mean±SD

Table 2. Comparision of Activities of the Erythrocytic Antioxidant Enzymes and MDA between Normal Controls and Patients with Diabetic Nephropathy

RBC	Control(n=15)	Diabetic nephropathy(n=9)	P value
Malondialdehyde(MDA)	0.37± 0.03	0.41± 0.03	<0.05
Superoxide dismutase(SOD)	9.90± 3.52	4.88± 2.69	<0.05
Catalase	30.65± 3.66	22.47± 6.25	<0.05
Glutathione peroxidase(GPX)	20.02± 3.23	15.98± 2.49	<0.05

Unit : MDA: nmol MDA/mg protein in RBC, SOD : Unit/mg protein in RBC/min,

Catalase : μ mol H_2O_2 destroyed/mg protein in RBC/min

GPX : nmol NADPH reduced/mg protein in RBC/min

Table 3. Comparision of Activities of the Antioxidant Enzymes and MDA in Plasma between Normal Controls and Patients with Diabetic Nephropathy

Plasma	Control(n=15)	Diabetic nephropathy(n=9)	P value
Malondialdehyde(MDA)	1.86± 0.31	2.35± 0.28	<0.05
Superoxide dismutase(SOD)	2.76± 1.52	0.83± 0.49	<0.05
Catalase	6.05± 2.33	3.57± 2.21	<0.05
Glutathione peroxidase(GPX)	54.98± 8.26	53.84± 7.93	0.65

Unit : MDA : nmol MDA/ml plasma, SOD : Unit/ml plasma/min,

Catalase : μ mol H_2O_2 destroyed/ml plasma/min, GP : nmol NADPH reduced/ml plasma/min

처리는 PC-SAS version 6.04 통계처리 프로그램을 이용하여 기술통계를 얻었고 유의수준은 P value 0.05 이하로 하였다.

결 과

당뇨병 환자군과 정상대조군에서 혈청 creatinine 치와 cholesterol치는 두 군에서 통계학적으로 유의한

차이를 보이지 않았다($P>0.05$)(Table 1). Fasting blood sugar, glycated HbA1c, 24시간 요알부민 배설량은 당뇨병 환자군에서 정상대조군보다 각각 통계학적으로 유의하게 높았다($P<0.05$)(Table 1). RBC에서 측정한 MDA는 당뇨병 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았고($P<0.05$), SOD, catalase, GPX의 활성도는 당뇨병 환자군에서 각각 통계학적으로 유의하게 낮았다($P<0.05$)(Table 1). 혈

장에서 측정한 MDA는 당뇨병 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았고($P<0.05$), SOD 와 catalase는 당뇨병 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 낮았다($P<0.05$)(Table 3). 혈장 GPX는 당뇨병 환자군과 정상대조군에서 통계학적으로 유리한 차이를 보이지 않았다($P=0.65$)(Table 3).

고 안

당뇨병성 신증은 만성적 고혈당의 결과로 신사구체의 미세혈관에 PAS양성 물질인 탄수화물을 함유한 혈장 단백들이 침착하고 아울러 세포의 비대, 증식 및 기저막의 비후 등이 공통적으로 나타나는 미세혈관 합병증의 하나로 알려져 있다^{13, 14)}. 이러한 만성적 고혈당이 미세혈관에 어떠한 병변을 유발하는지 그 기전에 대해서 많은 연구가 시행되어 왔으나 미세혈관 병변의 원인이 자세히 알려져 있지는 않다.

최근의 연구에 의하면 지속적인 고혈당에 의해 생성되는 free radical이 사구체 혈관 및 신세뇨관에 손상을 초래하여 당뇨병성 신증을 유발하는 하나의 요인으로 알려져 있다^{5, 15, 16)}.

그러나 이러한 free radical들은 혈액내에 잔류시간이 짧으므로 측정에 어려움이 있다¹⁷⁾. 따라서 이러한 free radical들의 활성도는 free radical에 대한 효소적 측면에서 SOD, catalase, GPX 등과 free radical에 의한 지질 과산화물인 MDA를 측정함으로서 간접적으로 알 수 있다.

저자의 연구에서는 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 당뇨병성 신증을 가진 환자군을 대상으로 혈장과 적혈구에서 SOD, catalase, GPX와 동시에 지질 과산화물인 MDA를 측정하여 당뇨병성 신증 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높아 oxidative stress가 당뇨병성 신증환자에서 높음을 알 수 있었다. 또한 혈장 GPX를 제외하고, 혈장과 적혈구에서 SOD, catalase와 적혈구에서 GPX는 당뇨병성 신증 환자에서 정상 대조군 보다 통계학적으로 유의하게 감소되어 Yaqoob 등⁵⁾의 연구결과와 유사하였다. 그러나 일반적으로 free radical의 생성이 증가되면 SOD, catalase, GPX 등이 증가되는 것으로 알려져 있으나 저자의 연구에서는 혈장 GPX외에 다른 효소들이 당뇨병성 신증 환자군에서 정상대조군보다 oxidative

stress가 증가되어 있음에도 불구하고 감소되어 있었다. 이러한 현상은 당뇨병성 신증 환자에서 정상 대조군보다 oxidative stress에 대한 방어기전이 떨어져 있음을 간접적으로 시사한다고 할 수 있겠다.

이상의 결과에서 인슐린 의존형 당뇨병에 의한 당뇨병성 신증 환자군에서 oxidative stress가 정상 대조군보다 증가되어 있었고 이러한 oxidative stress의 증가와 이에 대한 방어기전의 저하가 당뇨병성 신증의 발생에 기여할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 당뇨병에서 활성산소는 증가되어 있으며 이러한 활성산소의 증가는 난뇨병의 미세혈관 합병증을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다. 당뇨병성 신증은 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 심각한 미세혈관 합병증으로 이에 대한 병인론은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으나 최근의 연구에 의하면 활성산소에 의한 peritubular microcirculation의 변화와 endothelial dysfunction에 기인한다고 알려져 있다.

본 연구는 인슐린 의존형 당뇨병환자에서 oxidative stress가 당뇨병성 신증에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행하였다.

방 법 : 당뇨병 유병기간이 5년 이상, 24시간 요 알부민 배설량이 100gm 이상인 인슐린 의존형 당뇨병 환자군 9명과 정상대조군 15명을 대상으로 적혈구와 혈장에서 MDA(thiobarbituric acid assay), superoxide dismutase(Hyland et al.), catalase(Nelson and Kiesow), glutathione peroxidase(Palgia and Valentine)를 각각 측정 비교하였다.

결 과 : 적혈구에서 측정한 MDA는 당뇨병환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았고($P<0.05$), 항산화 효소는 당뇨병 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 낮았다($P<0.05$).

혈장에서 측정한 MDA는 당뇨병환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았고($P<0.05$), glutathione peroxidase를 제외한 항산화 효소는 당뇨병환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 낮았다($P<0.05$).

결 론 : 당뇨병성 신증 환자군에서 oxidative stress가 정상대조군에 비해 증가되어 있으며, 이러한

oxidative stress의 증가가 당뇨병성 신증 유발에 기여할 것으로 생각된다.

= Abstract =

Changes of Malondialdehyde(MDA) and Antioxidant Enzymes in Patients with Diabetic Nephropathy

Keun Yong Park, M.D.

Department of Internal Medicine and Institute for Medical Science, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

Objective : Oxygen free radical activity is elevated in diabetes mellitus and has been implicated in the etiology of vascular complications and diabetic nephropathy is a serious microvascular complication in patients with IDDM.

Despite intensive investigation, the pathophysiology of diabetic renal disease has not been fully elucidated. However, several clinical and experimental studies have suggested that endothelial dysfunction and changes of peritubular microcirculation.

I performed this study to examine the oxidative stress in IDDM patients with diabetic nephropathy.

Methods : Nine patients with IDDM(diabetic duration>5 years) and persistent albuminuria(albumin excretion>100mg/day) and 15 normal healthy controls were investigated prospectively for MDA(thiobarbituric acid assay), and antioxidant enzymes[SOD (Hyland et al.), catalase(Nelson and Kiesow), GPX (Palgia and Valentine)]

Results : In RBC, levels of MDA were significantly higher in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls and levels of antioxidant enzymes were significantly lower in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls.

In plasma, levels of MDA were significantly higher in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls and levels of antioxidant enzymes except GPX were significantly lower in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls.

Conclusion : We conclude that increased oxidative stress and decreased antioxidative defense mechanism may be factors in the initiation of diabetic nephropathy.

Key Words : Diabetic nephropathy, MDA, Antioxidant enzymes

REFERENCES

- 1) Deckert T, Anderson AR, Christiansen JS, Anderson JK: *Course of diabetic nephropathy: factors related to development.* Acta Endocrinol 97:14, 1981
- 2) Viberti GC, Walker JD: *Diabetic nephropathy: etiology and prevention.* Diabetes/Metab Rev 4: 147, 1988
- 3) Wardle EN: *Cell biology and the function changes of diabetic nephropathy.* Nephrol Dial Transplant 7:889, 1992
- 4) Yagoob M, McClelland P, Patrick AW, McGregor A, Mason H, Patterson D, Rugman F, Hay C, White MC, Bell GM: *Antioxidant depletion and endothelial damage in diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol 2:303, 1991
- 5) Yagoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, White MC, Bell GM: *Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy.* Q J Med 87:601, 1994
- 6) Yagoob M, Patrick AW, McClelland P, Stevenson A, Mason H, White MC, Bell GM: *Relationship between makers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus.* Clin Sci Colch 85:557, 1993
- 7) Paller MS, Neumann TV: *Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation.* Kinney Int 40:1041, 1991
- 8) Zweier JL, Kupposamy P, Lutty GA: *Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in post-ischemic tissues.* Proc Natl Acad Sci USA 85:46, 1988
- 9) Buege JA, Aust SD, Colowick SP, Kaplan NO: *Superoxide dismutase assay using alkaline dimethyl sulfoxide as superoxide anion-generation system.* Anal Biochem 135:280, 1983
- 10) Hyland K, Voisin I, Bandin H, Auclair C: *Microsomal lipid peroxidation; Methods in Enzymology.* P302, Academic Press, New York, 1978
- 11) Paglia ED, Valentine WN: *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.* J Lab Clin Med 70:158, 1967

- 12) Nelson DP, Kiesow LA : *Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C.* *Anal biochem* 49:474, 1972
- 13) Viberti GC, Wiseman MJ : *The kidney in diabetes : Significance of the early abnormalities.* *Clin Endocrinol Metab* 15:753, 1986
- 14) Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS : *Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy : a study of glomerular barrier function.* *Kidney Int* 21:633, 1982
- 15) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saud RL, McCord JM, Harman D : *Oxygen radicals and human disease.* *Ann Intern Med* 107:526, 1987
- 16) Dormandy TL : *An approach to free radicals.* *Lancet* 2:1010, 1983
- 17) Fridovich I : *The biology of oxygen radicals.* *Science* 201:875, 1978