

당뇨병성 신증환자에서 혈청 크레아티닌치와 적혈구의 Malondialdehyde(MDA) 및 항산화효소의 상관 관계에 관한 연구

계명대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*, 예방의학교실**

박근용 · 박성배 · 김현철 · 문교철* · 곽춘식* · 강미정**

마산성모병원 내과

장 종 익 · 신 원 승

〈요 약〉

당뇨병에서 활성산소는 증가되어 있으며 이러한 활성산소의 증가가 당뇨병의 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 연구들에 의하면 활성산소에 의한 peritubular microcirculation의 변화와 endothelial dysfunction 등이 신장기능의 악화에 관여하는 것으로 알려져 있다.

이에 저자들은 당뇨병 유병기간이 5년이상, 24시간 요 알부민 배설량이 1000mg이상인 인슐린 의존형 당뇨병 환자 21명을 혈청 크레아티닌치에 따라 세군(group 1(n=7); serum creatinine; 1.6~3.0mg/dL, group 2(n=7); 3.1~5.0mg/dL, group 3(n=7); 5.1mg/dL이상)으로 분류하여 이들과 정상대조군 15명을 대상으로 적혈구에서 MDA, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase(GPX)를 각각 측정 비교하였고, 당뇨병성 신증 환자 각군에서 혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 MDA, SOD, catalase, GPX치와의 상관관계를 비교하였다.

적혈구에서 측정한 MDA는 당뇨병성 신증 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았고($p<0.05$), 항산화 효소는 당뇨병성 신증 환자군에서 정상대조군보다 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.05$).

또한 group 1($r=0.13$, $p>0.05$)과 group 2($r=-0.18$, $p>0.05$)에서 혈청 크레아티닌과 적혈구에서 측정한 MDA와는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았고, group 3($r=0.96$, $p<0.05$)에서는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다.

적혈구에서 측정한 SOD는 group 1($r=0.59$, $p>0.05$), group 2($r=-0.67$, $p>0.05$), group 3($r=0.12$, $p>0.05$)에서 각각 혈청 크레아티닌과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았고, catalase도 group 1($r=-0.12$, $p>0.05$), group 2($r=-0.15$, $p>0.05$), group 3($r=-0.65$, $p>0.05$)에서 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았으며, glutathione peroxidase도 group 1($r=-0.34$, $p>0.05$), group 2($r=0.34$, $p>0.05$), group 3($r=0.43$, $p>0.05$)에서 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

인슐린 의존형 당뇨병에 의한 당뇨병성 신증 환자군에서 oxidative stress가 정상대조군 보다

증가되어 있었고, 동시에 혈청 크레아티닌치가 높을수록(5mg/dL 이상) 혈청 크레아티닌과 양의 상관관계를 보였고, 이러한 oxidative stress의 증가와 이에 대한 방어기전의 저하가 당뇨병성 신증 유발에 기여할 것으로 생각된다.

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 dysfunction 등이 중요한 원인인자로 알려지고 있다^{3,4)}. 이러한 활성산소는 glucose의 autoxidation에 의해서 생성되기도 하며 사구체 혈관내피세포나 신세뇨관 세포 등에서 생성되어 신장기능을 악화시키는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 이에 저자들은 인슐린 의존형 당뇨병환자에서 당뇨병성 신증을 동반한 환자를 대상으로 이들에서 oxidative stress 및 혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 활성산소에 의한 지질 파산화물인 malondialdehyde와의 상관관계를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

당뇨병 유병기간이 5년 이상, 24시간 요 알부민 배설량이 1000mg 이상인 인슐린 의존형 당뇨병 환자군 21명(M/F: 10/11, 평균연령: 28.14±5.96세)과 당뇨병 및 기타질환에 이환 과거력이 없는 정상대조군 15명(M/F: 8/7, 평균연령: 28.04±3.36세)을 대상으로 하였으며 당뇨병 환자군과 정상 대조군 모두에서 활성산소에 영향을 미치는 vitamin C와 vitamin E 등의 약제를 복용중인 자는 연구대상에서 제외하였다. 또한 당뇨병성 신증환자군은 혈청 크레아티닌치에 따라 1.6-3.0mg/dL(group 1, n=7), 3.1-5.0mg/dL(group 2, n=7), 5.1mg/dL 이상(group 3, n=7) 세군으로 분류하였다.

2. 방법

당뇨병 환자군과 정상대조군에서 Ek-EDTA tube와 plain tube에 각각 5cc씩 채혈하여 2500rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 혈청 creatinine, 혈청 cholesterol, fasting blood sugar는 chem-I auto-analyser(Abbott,USA)를 이용하여 측정하였다. 24시간 요 알부민은 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. 적혈구의 malondialdehyde(MDA) 측정은 MDA가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은색을 535nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay kit에 의하였다⁹⁾. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD)는 SOD를 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. 적혈구의 catalase의 활성 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 사용하여 catalase에 의해 파괴되는 hydrogen peroxide양을 측정하는 Nelson과 Kiesow의 방법¹²⁾을 이용하였다. 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.

3. 통계 처리

통계처리는 PC-SAS version 6.04 통계처리 프로그램을 이용하여 기술통계를 얻었고, 상관분석은 Pearson법으로 시행하였고, 유의수준은 P value 0.05 이하로 하였다.

결 과

당뇨병성 신증환자 세군과 정상대조군에서 혈청 cholesterol치는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$)(Table 1). Fasting blood sugar, glycated HbA_{1c}, 24시간 요 알부민 배설량 및 혈청 크레아티닌치는 당뇨병성 신증환자 세군에서 정상대조군보다 각각 통계학적으로 유의하게 높았다($p<0.05$) (Table 1). 적혈구에서 측정한 MDA는 당뇨병성 신증환자 3군에서 정상대조군보다 통계학적으로 각각 유의하게 높았고($p<0.05$), SOD, catalase, GPX의 활성도는 당뇨병성 신증환자 3군에서 각각 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.05$)(Table 2).

혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 MDA와의

상관관계는 group 1($r=0.13$, $p>0.05$), group 2($r=-0.18$, $p>0.05$)에서는 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았고, group 3에서는($r=0.96$, $p<0.05$) 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다 (Table 3).

혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 SOD와의 상관관계는 group 1($r=0.79$, $p>0.05$), group 2($r=-0.67$, $p>0.05$), group 3($r=0.12$, $p>0.05$)에서 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (Table 3).

혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 catalase와의 상관관계는 group 1($r=-0.12$, $p>0.05$), group 2($r=-0.15$, $p>0.05$), group 3($r=-0.65$, $p>0.05$)에서 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (Table 3).

Table 1. Clinical Characteristics of Study Population

	Control(n=15)	Diabetic nephropathy		
		Group 1(n=7)	Group 2(n=7)	Group 3(n=7)
Age(years)	28.04±3.36	27.09± 2.24	26.78± 4.41	29.11± 6.07
Male/Female	8/7	4/3	4/3	2/5
Duration of IDDM(years)	—	7.31± 2.26	6.11± 2.05	8.45± 1.54
FBS(mg/dl)	94.33±14.26	149.76± 22.88*	150.70± 11.32*	148.69± 14.51*
Glycated HbA _{1c} (%)	4.08± 1.14	8.92± 3.01*	8.84± 2.72*	7.96± 3.85*
Serum creatinine(mg/dL)	0.89± 0.19	2.47± 0.36*	3.83± 0.51*	6.50± 1.26*
Serum cholesterol(mg/dL)	164.83±11.45	169.72± 9.81	170.72± 12.76	166.29± 10.03
24 hour urine albumin(mg/day)	14.65± 2.06	1960.34±170.08*	1860.07±210.45*	1900.08±190.14*

* : p value<0.05 vs. control

values are expressed as mean±SD

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

RBC	Control(n=15)	Diabetic nephropathy		
		Group 1(n=7)	Group 2(n=7)	Group 3(n=7)
Malondialdehyde	0.29±0.06	0.43±0.05*	0.44±0.06*	0.42±0.08*
SOD	9.23±2.26	5.45±1.19*	5.62±1.51*	5.34±1.21*
Catalase	29.71±1.88	17.85±3.39*	20.91±3.81*	19.04±1.25*
GPX	20.33±1.71	17.45±2.02*	17.84±2.37*	17.73±1.91*

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

* p value<0.05 vs. controls

values are expressed as mean±SD

Table 3. Correlation Between Serum Creatinine and Erythrocytic MDA, SOD, Catalase, GPX in Patients with Diabetic Nephropathy

correlation coefficient	Group 1(n=7)	Group 2(n=7)	Group 3(n=7)
MDA	0.13	-0.18	0.96*
SOD	0.79	-0.67	0.12
Catalase	-0.12	-0.15	-0.65
GPX	-0.34	0.34	0.43

*: $p < 0.05$

혈청 크레아티닌치와 적혈구에서 측정한 GPX와의 상관관계는 group 1($r=-0.34$, $p>0.05$), group 2 ($r=0.34$, $p>0.05$), group 3($r=0.43$, $p>0.05$)에서 각각 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (Table 3).

고 찰

당뇨병성 신증은 만성적 고혈당의 결과로 신사구체 미세혈관에 PAS 양성 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 시행되어왔으나 미세혈관 병변의 원인에 대해서는 자세히 알려져 있지 않다.

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

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

저자들의 연구에서는 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 당뇨병성 신증을 가진 환자 세군을 대상으로 활성 산소에 의한 지질과산화물인 MDA를 측정하여 당뇨병성 신증 환자 세군에서 모두 정상대조군보다 통계학

적으로 유의하게 높아 oxidative stress가 당뇨병성 신증 환자군에서 높음을 알 수 있었다. 또한 적혈구에서 측정한 SOD, catalase, GPX는 당뇨병성 신증환자 세군에서 모두 정상 대조군보다 통계학적으로 유의하게 감소되어 Yaqoob 등⁵⁾의 연구결과와 유사하였고, 일반적으로 free radicals의 생성이 증가되면 SOD, catalase, GPX 등이 증가되는 것으로 알려져 있으나 저자들의 연구에서는 당뇨병성 신증 환자 세군에서 정상대조군보다 모두 oxidative stress가 증가되어 있음에도 불구하고 적혈구의 SOD, catalase, GPX 등이 감소되어 있었다. 이러한 현상은 당뇨병성 신증 환자군에서 정상 대조군보다 oxidative stress에 대한 방어기전이 떨어져 있음을 간접적으로 시사한다고 할 수 있겠다.

또한 저자들의 연구에서 혈청 크레아티닌치에 따른 적혈구의 SOD, catalase, GPX의 상관관계를 조사한 결과 통계학적으로 유의한 상관관계를 발견할 수 없었고, free radicals에 의한 지질 과산화물인 MDA는 혈청 크레아티닌치가 5mg/dL 이하인 군에서는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았으나, 혈청 크레아티닌치가 5.1mg/dL 이상인 군에서는 통계학적으로 유의한 양의 상관관계를 나타내어 혈청 크레아티닌치가 높을수록 oxidative stress가 높음을 간접적으로 시사하였다.

이상의 결과에서 인슐린 의존형 당뇨병에 의한 당뇨병성 신증 환자군에서 oxidative stress가 정상 대조군보다 증가되어 있었고, 동시에 혈청 크레아티닌치가 높을수록(5mg/dL 이상) 혈청 크레아티닌과 양의 상관관계를 보였고, 이러한 oxidative stress의 증가와 이에 대한 방어기전의 저하가 당뇨병성 신증의 유발에 기여할 것으로 생각된다.

= Abstract =

Correlation between Levels of Serum Creatinine and Erythrocytic Malondialdehyde(MDA) and Antioxidant Enzymes in Patients with Diabetic Nephropathy

Keun Yong Park, M.D., Sung Bae Park, M.D.
Hyun Chul Kim, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.¹
Chun Sik Kwak, M.D.¹ and Mi Jeong Kang, M.D.²

Department of internal Medicine, ¹Department of Biochemistry and ²Department of Preventive Medicine and Public Health Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

Jong Eog Jang, M.D. and Weon Seung Shin, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Ma San Sung Mo Hospital, Na San, Korea*

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 might deteriorate renal function in patients with IDDM.

We performed this study to examine the oxidative stress and correlation between levels of serum creatinine and erythrocytic MDA, SOD, catalase, GPX in IDDM patients with diabetic nephropathy.

Twenty one patients with IDDM(diabetic duration >5 years) and persistent albuminuria(albumin excretion>1000mg/day) and 15 normal healthy controls were investigated prospectively for erythrocytic MDA(thiobarbituric acid assay) and antioxidant enzymes[SOD(Hyland et al.), catalase(Nelson and Kiesow), GPX(Palgia and Valentine)] and correlation to serum creatinine levels.

Levels of erythrocytic MDA were significantly higher in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls($p<0.05$) and levels of erythrocytic antioxidant enzymes were significantly lower in patients with diabetic nephropathy than in normal healthy controls($p<0.05$).

There was no significant correlation between

serum levels of creatinine and erythrocytic MDA in group 1($r=0.12$, $p>0.05$) and group 2($r=0.12$, $p>0.05$) but there was significant correlation between serum levels of creatine and erythrocytic MDA in group 3($r=0.96$, $p<0.05$).

There was no significant correlation between serum levels of creatinine and erythrocytic antioxidant enzymes in all patients with diabetic nephropathy groups(group 1, group 2, and group 3; $p>0.05$).

We concluded that increased oxidative stress and decreased antioxidative defense mechanism might be factors in the initiation of diabetic nephropathy and the oxidative stress correlated with higher serum levels of creatinine(more than 5mg/dL)($p<0.05$).

Key Words : Diabetic nephropathy, MDA, Antioxidant enzymes, Serum creatinine

참 고 문 헌

- 1) Deckert T, Anderson AR, Christiansen JS, Anderson JK: *Course of diabetic nephropathy: factors related to development*. Acta Endocrinol 97:14-15, 1981
- 2) Viberti GC, Walker JD: *Diabetic nephropathy: etiology and prevention*. Diabetes/Metab Rev 4: 147-159, 1988
- 3) Wardle EN: *Cell biology and the function changes of diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant 7:889-895, 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 2:303-309, 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: 601-607, 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 85:557-562, 1993
- 7) Paller MS, Neumann TV: *Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation*. Kinney Int 40: 1041-1049, 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 85:46-51, 1988*
- 9) Buege JA, Aust SD, Colowick SP, Kaplan NO: *Superoxide dismutase assay using alkaline dimethyl sulfoxide as superoxide anion-generation system. Anal Biochem 135:280-288, 1983*
- 10) Hyland K, Voisin I, Bandin H, Auclair C: *Microsomal lipid peroxidation: Methods in Enzymology. p302-314, 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 70:158-165, 1967*
- 12) Nelson DP, Kiesow LA: *Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. Anal Biochem 49:474-480, 1972*
- 13) Viberti GC, Wiseman MJ: *The kidney in diabetes: Significance of the early abnormalities. Clin Endocrinol Metab 15:753-760, 1986*
- 14) Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS: *Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: a study of glomerular barrier function. Kidney Int 21:633-640, 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 107:526-545, 1987*
- 16) Dormandy TL: *An approach to free radicals. Lancet 2:1010-1014, 1983*
- 17) Fridovich I: *The biology of oxygen radicals. Science 201:875-880, 1978*