

당뇨병환자에서 노증 Fibronectin농도의 증가에 관한 연구

계명대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 의과대학 생화학교실* 및
효성여자대학교 식품영양학과**

여준기 · 조성래 · 박정모 · 박근용 · 한승범 · 이인규

서성문* · 손건영* · 조준승*

박규영**

서 론

미세혈관병변으로 인한 만성당뇨합병증 발생은 유병기간이 긴 당뇨병환자에서 큰 문제가 된다. 이러한 당뇨병성 미세혈관합병증의 발병기전은 확실치 않으나 해당 장기에서의 미세혈관 기저막비후는 특징적인 소견으로 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 기저막은 주로 Type IV collagen과 laminin, heparan sulfate, proteoglycan 및 nidogen과 당단백 등으로 이루어져 있으며 이 기저막을 구성하는 당단백중 중요한 것이 바로 fibronectin이다⁵⁾.

혈장 fibronectin은 α_2 -glycoprotein으로서 주로 간⁶⁾과 혈관내피세포^{7, 8)}에서 생성되며 조직의 구성성분이 되고 혈액⁹⁾과 체액중^{10, 11)}에 존재하는 물질로 현재 그기능은 명확히 규명되지는 않았으나, 혈관내벽의 교원조직에 적혈구와 혈소판의 침착을 유도^{12, 13)}하고 적혈구의 변형능을 감소시킨다고 하며¹⁴⁾ 따라서 fibronectin이 당뇨병환자의 미세혈관병변의 발생과 관련이 있을것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁷⁾.

1984년에 Davis 등¹⁸⁾은 당뇨병성 미세혈관 질환이 있는 환자들에 있어서 혈장 fibronectin치가 높이상승되었음을 발표한 일이 있다. 그러나 Lambertson 등¹⁹⁾은 당뇨병성신병증 환자들에 있어서 단백뇨의 정도와 혈장 fibronectin치는 서로 상반되는 소견을 보인다고 발표하였다. 이와같이 당뇨병성 미세혈관합병증 발생시 혈장 fibronectin치의 의의에 대해서는 아직까지 논란이 많은 상태이며 당뇨병환자에서 노증 fibronectin치에 관한 연구는 거의 없다. 이에 본 연구자들은 당뇨병성 미세혈관병증을 동반한 환

자들에 있어서 노증 fibronectin치의 증가 의의를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

이 연구는 정상인 대조군 20례와 당뇨병환자 57례를 대상으로 시행하였고 당뇨병환자들은 크게 세군으로 나누어서 미세혈관합병증이 없는군 32례 그리고 당뇨병성 망막증만 발생된 환자 15례, 당뇨병성 신병증이 발생된 환자 10례로 구분하였다. 대상환자중 섬유성병변을 일으키는 만성간질환이나 폐섬유화증 혹은 혈액학적 질환을 가진 당뇨병 환자들은 연구대상에서 제외시켰다. 당뇨병 환자들의 치료를 살펴보면 단지 4명만 식이요법중이었으며 24명은 경구혈당강하제를 사용하였고 29명은 인슐린 치료를 받고 있었다(Table 1).

당뇨병의 진단은 National Diabetes Data Group의 진단기준²⁰⁾에 따라 이루어졌으며 미세혈관병변의 진단은 당뇨병성 망막증인 경우 검안경과 형광안저혈관조영술을 이용하였고, 당뇨병성신병증은 24시간 소변의 총단백배설량이 500mg이상인 경우로 하였다. 소변은 아침 공복시에 채취하였고 -20℃에서 보관하였으며 노 fibronectin의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)법을 이용하였고 단위는 $\mu\text{g}/\text{mg creatinine}$ 으로 표시하였다.

ELISA방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 즉 분리된 FN을 20mM carbonate buffer, pH 9.6, 0.02% sodium azide용액으로 희석하여 4℃에서 16시간 polystyrene plastic wall에 흡착시킨 다음 PBST용액(20 mM sodium phosphate, 0.15M sodium chlo-

Table 1. Clinical characteristics of control and diabetic subjects

	Control subjects		Diabetic patients	
	(n=20)	without microvascu- cular complications (n=32)	with retinopathy only (n=15)	with nephropathy (n=10)
Age(years)	57.0±2.2	56.0±2.3	54.0±9.4	63.0±2.9
Sex(Male/Female)	10/10	21/11	9/6	5/5
Duration of diabetes (months)	-	51.3±11.1	98.6±20.4* ^a	143.2±26.1* ^{b,c}
Body mass index(kg/m ²)	23.0±0.7	22.3±0.5	21.7±1.1	21.4±0.9
Fasting blood sugar (mg/dl)	85.5±10.1	212.0±17.1	227.5±26.4	255.1±28.1
Glycosylated hemoglobin(%)	7.2±0.2	11.2±0.5	11.5±0.8	10.4±0.7

Values are presented as Mean±SD. Significant differences compared with control^a, diabetic patients without microvascular complications^b, or diabetic patients with retinopathy only^c; *p<0.05.

ride buffer, pH 7.2, 0.05% Tween 20)으로 수회 세척하여 4℃에서 보관한다. PBST용액으로 희석한 항체용액과 시료를 4℃에서 16시간 반응시킨 다음 그 반응액 20μl를 FN이 흡착된 plate에 넣어 30분간 실온에서 반응시키고 PBST용액으로 희석된 효소-항체 결합액을 첨가한 후 다시 90분간 실온에서 반응시킨다. 세척후 효소기질액을 넣고 60분간 반응시키고 8 N H₂SO₄ 50μl를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 즉시 490nm에서 흡광도를 측정한다. 기질액은 o-phenylenediamine을 methanol에 10mg/ml의 농도로 녹인 다음 H₂O가 0.03% 함유된 용액으로 100배 희석하여 사용한다. 기질액은 항상 측정직전에 만들어 사용한다.

모든 자료는 평균과 표준오차로 표시하였고 통계학적 검정은 Non-paired student's T-test방법을 사용하였으며 통계학적 의의는 P value 0.05 미만으로 하였다.

결 과

정상대조군과 당뇨병군 사이에 나이, 성별, 공복시 혈당 그리고 당화 혈색소치등은 유의한 차이가 없었으나, 당뇨병 유병기간은 당뇨병성신병증군이 143개월, 망막병증군이 98개월, 합병증이 없는 군에서 51개월로 서로간에 유의한 차이를 보였으며(P<0.05), 당뇨합병증이 심할수록 유병기간이 길게 나타났다(Table 1).

정상대조군과 전체 당뇨병군에서 뇨 fibronectin치를 비교하였을 때, 당뇨병군에서 대조군에 비하여 대체적으로 높은 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었고(P>0.05), 당뇨병성신병증의 경우 6.2μg/mg creatinine으로 대조군의 0.5μg/mg creatinine보다 유의하게 높았다(P<0.05).

당뇨병군간의 뇨 fibronectin치를 비교하여 보면,

Table 2. Concentration of urine fibronectin in control and diabetic subjects

	Control subjects		Diabetic patients	
	(n=20)	without microvascu- cular complications (n=32)	with retinopathy only (n=15)	with nephropathy (n=10)
Urine Fibronectin:				
μg/ml	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	1.9±0.8* ^{ab}
μg/mg creatinine	0.5±0.1	0.4±0.1	1.2±0.8	6.2±3.1* ^{ab}

Values are presented as Mean±SD. Significant differences compared with control^a, diabetic patients without microvascular complications^b; *p<0.05.

당뇨병성신병증군이 6.2 μ g/mg creatinine, 망막병증군이 1.2 μ g/mg creatinine, 합병증이 없는 군에서 0.4 μ g/mg creatinine으로 당뇨병성신병증이 있는 경우에, 합병증이 없거나 망막병증만 있는 군에 비하여, 뇨 fibronectin치가 유의하게 높았다(P<0.05) (Table 2).

그리고 당뇨병군에서 뇨 fibronectin치는 당뇨병군의 BUN치(r=0.61), Creatinine치(r=0.83), Creatinine clearance(r=-0.42), 24시간 뇨단백 배설량(r=0.60)과 유의한 상관관이 있었다(각각 P<0.01) (Table 3).

Table 3. Correlation of urine fibronectin and parameters of kidney functions

Parameters	Urine fibronectin	
	r	P
Blood urea nitrogen	0.61	<0.01
Creatinine	0.83	<0.01
Creatinine clearance	-0.42	<0.001
24h Urine protein	0.60	<0.01

r: correlation coefficient

고 찰

당뇨병성 만성합병증은 큰 혈관에 오는 대혈관합병증과 작은 혈관에 오는 미세혈관합병증 두가지로 구분된다¹⁾. 이 중 미세혈관합병증은 만성당뇨병환자에서 특이한것으로서 현재까지 많은 연구가 진행되고 있으나 아직 그 정확한 병태생리는 밝혀져 있지 않다. 최근들어 이러한 미세혈관합병증에서 관찰되는 기저막비후에¹⁻⁴⁾ 관한 연구가 많이 진행되고 있다²¹⁻²⁵⁾.

기저막을 이루는 당단백성분중 중요한 fibronectin은 α_2 -glycoprotein으로서 주로 간¹²⁾과 혈관내피 세포에서^{7, 8)} 생성되며 결체조직과 혈장⁹⁾ 그리고 체액이나^{10, 11)} 기저막내¹⁵⁾에 존재하는 물질로 그 기능은 현재까지 잘 알려져 있지않은 상태이나, 혈관 내피 세포 손상시 내벽의 교원조직에 혈소판과 적혈구의 침착을 유도하고^{13, 14)} 적혈구의 변형능을 감소시킨다고¹⁴⁾ 알려져 있다. 혈액의 점도상승과 적혈구의 변형능 감소는 당뇨병 환자들에게서 이미 관찰되었으며, 이것은 당뇨병성 미세혈관병변의 발생과 진행에 깊은 관련이 있다고 한다¹⁶⁻¹⁷⁾.

당뇨병 환자들에 있어서 혈장 fibronectin치의 증가가 Davis 등¹⁸⁾에 의하여 처음 보고되었으며 Giorgio 등²³⁾은 인슐린치료가 필요했던 40세 미만의 당뇨병 환자들에게 있어서만 혈장 fibronectin치가 상승되었으며 이것은 당뇨병의 심한 정도보다 나이와 직접적으로 연관이 있는 것으로 보인다고 발표하였다. 그러나, 이후에 다시 발표한 그들의 보고에 따르면²⁷⁾ 연령분포가 35세부터 65세까지의 치료를 받고 있는 당뇨병 환자군과 대조군에 있어서 혈장 fibronectin치의 유의한 차이를 발견할 수 없었으며 오히려 당뇨병성 망막병증을 가진 환자군에 있어서 합병증이 없는 군이나 대조군에 비하여 혈장 fibronectin치가 유의하게 높았다고 하였다.

그러나, 이와 다르게 당뇨병성 미세혈관병변을 가진 환자들에 있어서 혈관병변의 발생과 혈장 fibronectin치는 연관성이 없다고 주장한 학자들도 있다^{19, 28)}.

Lamberton 등¹⁹⁾에 따르면 당뇨병환자들과 대조군에 있어서 혈장 fibronectin치의 유의한 차이를 볼 수 없었으며 Von Willebrand Factor도 당뇨병 환자들에게서 대조군에 비하여 높은 경향을 보였으나 당뇨병환자들 간의 당뇨병성 신병증이나 망막병증 유무에 따른 유의한 차이를 볼 수 없으므로 혈장 fibronectin과 Von Willebrand Factor 등은 당뇨병성 미세혈관 합병증 발생에 중요한 인자는 아니라고 하였다.

Alexander 등²⁹⁾도 조절되지 않은 당뇨병환자들의 혈장 fibronectin치가 감소된 것을 발표하였다. 이와같이 당뇨병성 미세혈관병변 발생시 혈장 fibronectin의 의의에 대해서는 아직까지 논란이 많은 상태이다.

한편 Giorgio 등³⁰⁾은 미세단백뇨를 보이는 초기 당뇨병성신병증 환자들에게서 혈장 fibronectin의 유의한 상승을 보였다고 하였다. 이와같이 혈장 fibronectin치의 증가는 당뇨병환자들에게서 저명하며, 특히 당뇨병성 미세혈관병증이 있을 경우 더욱 그러한 것으로 보인다.

Solerte 등¹⁵⁾은 당뇨병환자들에 있어서 혈장 fibronectin치의 증가에 대하여 두가지 가설을 제시하였는데 첫째, 손상된 미세혈관 주위의 내피세포에서 fibronectin의 생성증가와 병변주위에서의 침착증가로 인하여 혈장 fibronectin치가 상승된다고 하였으며 이는 당뇨병성 혈관합병증중 대혈관병변을 가진 환자들의 경우 혈장 fibronectin의 상승이 없는 것으로 보아 미세혈관병변이 있을 경우에만 fibronectin의 생성이 증가한다는 주장과 일치한다^{30, 31)}. 둘째, 당뇨

병환자들의 당대사 장애로 인하여 포도당이 fibronectin과 결합하는 당화현상이 일어나고 이렇게 생성된 당화산물은 효소에 잘 분해되지 않으므로 혈관벽에 축적되며 혈장내에도 그 양이 증가된다고 하였다.

본 연구에서는 1일 0.5gm 이상의 단백뇨를 보이는 당뇨병 환자군에서 뇨 fibronectin치가 유의하게 높았으며, 이것은 기저막의 대사장애로 인해 Type IV collagen이나 laminin 등과 같은 구성물질의 생성이 증가한다는 주장과 일치한다^{4, 25)}.

최근들어 당뇨병성 신병증의 조기진단에 대한 연구가 활발하며 미세단백뇨 측정이 조기진단의 지표로 주로 이용되고 있다^{26, 27)}. 본 연구의 결과로 볼때 뇨 fibronectin치는 당뇨병 환자의 신기능과 좋은 상관관계를 보이며 당뇨병성 신병증시 유의하게 높게 나타나므로 당뇨병성 신병증의 조기진단에 유용한 지표로 사용될 수 있다고 사료된다.

근래 이에대한 연구가 활발하여 만성당뇨합병증 발생의 조기진단과 치료반응 및 예후판정의 지표로 사용하기 위해서 계속적인 연구와 관찰이 필요하겠다.

요 약

1. 당뇨병군의 당뇨병 유병기간은 79.9±36.4개월이었으며 당화혈색소치는 11.1±2.7%였다.

2. 당뇨병군(n=57)의 뇨 FN치($\mu\text{g/g creatinine}$)는 1740.0±678.0로 정상대조군(n=20)의 471.0±59.0보다 높은 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다.(P>0.05)

3. 0.5g/일 이상의 단백뇨를 보이는 당뇨병성신병증 환자군(n=10)의 뇨 FN치($\mu\text{g/g creatinine}$)는 6188.0±3144.0으로 단백뇨가 0.5g/일 이하인 당뇨병군(n=47)의 뇨 FN치 645.3±251.0나 정상대조군(n=20)의 471.0±59.0보다 유의하게 높았다.(P<0.001)

4. 당뇨병군(n=57)에서 뇨 FN치는 당뇨병군의 BUN치(r=0.61), creatinine치(r=0.83), creatinine clearance(r=-0.42), 24시간 뇨단백 배설량(r=0.60)과 유의한 상관성이 있었다.(P<0.01)

이상의 결과로 볼 때 뇨 FN치는 당뇨병성신병증의 심한 정도와 좋은 상관관계를 보이며 당뇨병성신병증을 진단하는 지표로 사용될 수 있다고 사료된다.

REFERENCES

- Williamson JR, Kilo C: Basement membrane thickening and diabetic microangiopathy. Diabetes 1976; 25: 925-927.
- Timpl R: Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane. Kidney Int. 1986; 30: 293-298.
- Yodaiken RE: The basal lamina of diabetic capillaries, In Davis E(ed): The microcirculation in diabetes, S Karger, Basel, 1979, pp. 37-54.
- Raskin P: Diabetic regulation and its relationship to microangiopathy. Metabolism. 1978; 27: 235-252.
- Martin GR, Rohrbach DH, Terranova VP, Liotta LA: Structure, function and pathology of basement membranes, In Wagner BM, Fleischmajer R, Kaufman N(eds): Connective Tissue Disease, Baltimore, Williams & Wilkins, 1983, pp. 16-30.
- Owen MR, Cimino CD: Synthesis of fibronectin by the isolated perfused rat liver. Blood 59: 1982: 1305~.
- Mosesson MW, Amrani DL: The structure and biologic activities of plasma fibronectin. Blood 56: 1980: 145-158.
- Jaffe EA, Mosher DF: Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. J Exp Med 1978; 147: 1779-1791.
- Mosesson MW, Umfleet RA: The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. J Biol Chem 1970; 245: 5728-5736.
- Chen AB, Mosesson MW, Solish GI: Identification of the cold-insoluble globulin of plasma in amniotic fluid. Am J Obstetr Gynecol 1976; 125: 58.
- Kuusela P, Vaheri A, Palo J, Ruoslahti E: Demonstration of fibronectin in human cerebrospinal fluid. J Lab Clin Med 1978; 92: 595-601.

12. Matsumoto E, Mastumoto G, Ooshima A et al: Serum type IV collagen concentrations in diabetic patients with microangiopathy as determined by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies. *Diabetes* 1990; 39: 885-890.
13. Wautier JL, Paton RC, Wautier MP et al: Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications. *New Engl J Med* 1981; 305: 237-242.
14. McMillan DE, Utterback NG, La Puma J. Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes* 1978; 27: 895-901.
15. Solerte SB, Piovella F, Viola C et al: Plasma fibronectin, von willebrand factor antigen and blood rheology: Association with diabetic microvascular disease. *Acta Diabetol Lat* 1985; 22: 239-246.
16. Schmid-Schonbein H, Volger E: Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes* 1976; 25: (Suppl 2) 897-902.
17. Barnes AJ, Locke P, Scudder PR, Dormandy TL, Dormandy JA, Slack J: Is hyperviscosity a treatable component of diabetic microcirculatory disease? *Lancet* 1977; 2: 789-791.
18. Davis TME: Plasma fibronectin concentrations in diabetes and the effect of short-term, improved glucose control. *Diabetologia* 1981; 21: 262.
19. Lambertson RP, Goodman AD, Kassoff A et al: Von Willebrand Factor(VIII R: Ag), fibronectin, and insulin-like growth factors I and II in diabetic retinopathy and nephropathy. *Diabetes* 1984; 33: 125-129.
20. National diabetes data group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
21. Hogemann B, Voss B, Altenwerth M, Schneider M, Rauterberg J, Gerlach U. Concentrations of 7S collagen and laminine P1 in sera of patients with diabetes mellitus. *Klin Wochenschr* 1986; 64: 382-385.
22. Hogemann B, Balleisen L, Rauterberg J, Voss B, Gerlach U. Basement membrane components(7S collagen, laminine P1) are increased in sera of diabetics and activate platelets in vitro. *Haemostasis* 1986; 16: 428-432.
23. Niemela O, Risteri L, Sotaniemi EA, Risteli J: Type IV collagen and laminine-related antigens in human serum in alcoholic liver disease. *Eur J Clin Invest* 1985; 15: 132-137.
24. Matsumoto E, Matsumoto G, Ooshima A et al: Serum type IV collagen concentrations in diabetic patients with microangiopathy as determined by enzyme immunoassay with monoclonal antibodies. *Diabetes* 1990; 39: 885-890.
25. Hayashi Y, Makino H, Ota Z: Serum and urinary concentrations of Type IV collagen and laminin as a marker of microangiopathy in diabetes. *Diabetic Medicine* 1992; 9: 366-370.
26. Bartolomei G, Seghieri G, De Giorgio LA et al: Plasma fibronectin in diabetes. In Belfiore F, Galton DJ, Reaven GM. (eds): *Diabetes Mellitus: etiopathogenesis and metabolic aspects*. Basel, S. Karger, 1984, pp. 269.
27. Giorgio LA, Seghieri G, Gironi A, Mammini P, Bartoli U, Bartolomei G: Rasied plasma fibronectin concentration is related to the presence of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol Lat* 1984; 21: 251-256.
28. Alexander C, Weiss R, Kumar D Nimni M: Decreased plasma fibronectin in untreated diabetes mellitus. *Diabetes* 1981; 30(suppl 2): 3A
29. Giorgio LA, Bartolomei G, Gironi A, Caselli P, Seghieri G: Increased plasma fibronectin concentration in diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 1988; 11: 527-530.
30. Janka HU, Waldmann J, Mehnert H: Plasma fibronectin and factor VIII related antigen in diabetic patients with atherosclerosis: The Schwabing Study(Abstract). *Diabetologia* 1983; 25: 167.
31. Seghieri G, Bartolomei G, De Giorgio LA:

- Plasma fibronectin in diabetic retinopathy and macroangiopathy. *Diabete Metab* 1986; 12: 186-90.
32. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in

- insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982; 1: 1430-1432.
33. Nathan DM, Rosenbaum C, Protasowicki D: Single-void urine samples can be used to estimate quantitative microalbuminuria. *Diabetes Care* 1987; 10: 414-418.

=Abstract =

Increased Urine Fibronectin Concentrations in Diabetic Patients

**Jun Ki Yeo, MD; Sung Rae Cho, MD; Jung Mo Park, MD
Keun Yong Park, MD; Seung Beom Han, MD; In Kyu Lee, MD
Sung Moon Suh MD*; Kun Young Sohn, MD*; Joon Seung Jo, MD*
Gyu Young Park**.**

*Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine, and
Department of Biochemistry, Kyungbuk National University School of Medicine,*
Department of Food and Science and Nutrition, Hyosung Women's University**,
Taegu, Korea.*

Plasma fibronectin is an α_2 -glycoprotein, which is produced by vascular endothelial cells. Raised level of plasma fibronectin has been observed in diabetic patients particularly in the presence of microvascular complications. However, no available data exist about urine level of this glycoprotein in diabetic patients.

We measured urine fibronectin level by ELISA methods in 54 diabetic patients who have microvascular complications or not.

The following results were obtained

1) Urine fibronectin level($\mu\text{g/g creatinine}$) in diabetic group(1740.0 ± 678.0) is increased compared with those in normal control group(471.0 ± 59.0), but this results were not significantly different among two groups($P > 0.05$).

2) Urine fibronectin level($\mu\text{g/g creatinine}$) was significantly increased in patients with nephropathy (6188.0 ± 3144.0) compared with those in normal control group(471.0 ± 59.0) and patients without nephropathy(645.0 ± 251.0) ($P < 0.001$).

3) There were a significant correlation between BUN, creatinine, creatinine clearance, 24hr urine total protein and urine fibronectin level in diabetic patients.

Our data suggest that urine fibronectin excretion level might be used as a sensitive guide for diabetic nephropathy.

Key Words : Fibronectin, Diabetic nephropathy