

만성합병증을 동반한 제2형 당뇨병 환자에서 산화 스트레스와 항산화 방어체계

아주대학교 의과대학 내분비대사내과학교실, 명지대학교 이과대학 식품영양학과¹

하애화 · 노혜림 · 조정순¹ · 정윤석 · 이관우 · 김현만

서 론

당뇨병은 유전적 및 환경적인 요인에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있지만 그 기전은 확실하지 않다¹⁾. 최근에는 제2형 당뇨병의 발생에 있어서 각종 원인으로 생성되는 자유라디칼 및 이로 인한 산화적 손상이 관여된다는 연구들이 보고되고 있다²⁾. 또한 당뇨병 환자에서 나타나는 만성 합병증의 발생에도 산화적 손상이 관련될 것으로 보고되고 있으며, 특히 고혈당에 의한 폴리올 대사과정의 활성화, 단당류의 자기산화(autooxidation) 때 발생하는 자유라디칼의 증가, 단백질의 당화 등이 산화적 손상을 일으키는 요인으로 추정되고 있다. 또한 체내 항산화 방어기전의 저하로 인한 산화 스트레스의 증가도 당뇨병성 합병증의 발생에 관여될 것으로 제시되어 있다^{3~5)}.

당뇨병 환자에서 산화 스트레스에 관한 연구는 혈청이나 적혈구의 과산화지질도 또는 항산화 효소의 활성도를 측정 한 보고들이 알려져 있다. 일부 생체의 연구에서는 고혈당으로 인해 지질산화도가 증가되었거나 또는 항산화효소의 활성도가 저하됨이 보고된 바 있으며^{6~8)} 일부의 임상연구나 동물 실험을 통해서도 대조군에 비해 당뇨병군이 높은 산화 스트레스를 받고 있음이 보고되었다^{9~12)}. 그러나 당뇨병성 합병증 환자에

서의 과산화지질의 정도나 항산화 효소에 관한 연구는 매우 드문 편이다.

체내 항산화 방어체계에는 항산화효소 이외에 항산화 비타민인 비타민 E, 비타민 C, β -carotene 등이 포함되며, 이러한 비타민들은 자연계에 널리 분포하여 쉽게 식품으로 섭취할 수 있는 대표적인 영양소들이다. 역학조사나 임상연구 결과, 항산화 비타민의 식이 섭취가 부족한 경우 암이나 관상동맥질환, 심장병 등에 걸릴 위험도가 증가되며 암환자나 죽상동맥경화증 환자들의 혈청 항산화 비타민의 농도가 정상인에 비하여 유의하게 낮은 것으로 알려져 있다^{13~15)}. 당뇨병 환자에서 혈청 항산화 비타민의 농도에 대한 연구는 드물며, 대부분 비타민 E나 비타민 C에 국한되어 있다^{16~20)}. β -carotene을 포함한 일부 carotenoids는 단일 산소를 제거시키는 능력이 있고 특히 지질과산화에 관련되는 과산화 라디칼을 직접 저지시키는 항산화 기능이 있음이 보고되었다²¹⁾. 한편 스트렙토조토신으로 유발된 당뇨병 쥐에서 β -carotene을 투여하므로써 신장의 항산화체계를 향상시키고 과산화지질의 생성을 억제시키는데 효과적임이 보고되었다²²⁾. Davie 등²³⁾은 제2형 당뇨병 환자에 있어 carotene의 농도가 정상인보다 유의하게 낮으며 비타민 E나 β -carotene 농도가 당뇨병성 백내장과 관련된다고 보고하였다. 그러나 최근에 항산화 기능이 밝혀진 lycopene, lutein 등 carotenoids와 당뇨병 또는 당뇨병성 만성 합병증에 관한 연구는 알려지지 않았다.

저자들은 정상인과 제2형 당뇨병 환자에서 적혈구 과산화지질도, 항산화효소 활성도, 지용성 항산화 비타민 E, β -carotene, lutein, lycopene 및 retinol의 상태

본 논문의 요지는 The 11th Asia-Oceania Congress of Endocrinology에서 발표되었음.

접수일자: 1998년 5월 30일

통과일자: 1998년 7월 28일

책임저자: 김현만, 아주대학교 의과대학 내분비대사내과

를 측정하므로써 당뇨병 환자의 체내 산화적 손상 및 항산화 체계를 조사하고자 하였다. 또한 당뇨병성 만성 합병증 상태에 따른 체내 산화적 손상 및 항산화 체계를 비교해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

본 연구는 1996년 12월부터 1997년 4월까지 아주 대학교병원 내분비대사내과에 내원한 제2형 당뇨병 환자(당뇨병군 94예)와 건강검진센터에 내원한 수진자 중 질병이 없는 경우(정상군 44예)를 대상으로 하였다. 환자들은 3명의 전문의에 의하여 NDDG 기준으로 당뇨병이 진단 및 분류되었다. 지질의 변화를 초래할 수 있는 급성 질환에 이환된 경우, 인슐린 및 경구 혈당 강하제를 제외한 비타민 등 기타 약제를 사용하는 경우 및 흡연자는 대상에서 제외하였다. 환자들의 임상적 소견, 신경학적 검사, 망막관찰 및 안과전문의의 진료, 임상검사 소견 등에 따라 당뇨병성 만성 합병증이 진단되었다. 당뇨병군은 만성합병증을 동반한 군(합병증군 44예)과 비합병증군(50예)으로 세분하였다. 환자들의 연령, 성별, 키 및 몸무게는 합병증군과 비합병증군 간에 유의한 차이가 없었으며, 당뇨병의 유병기간은 각각 5.5 ± 4.8 년과 5.2 ± 4.9 년이었다.

2. 방 법

1) 신체 계측학적 검사

신장과 체중을 측정하고, 체지방량은 전기저항의 원리를 이용한 체지방분석기(bio-impedence analyzer, RJL, USA)로 측정하였다.

2) 일반 혈액검사

혈당은 포도당 산화효소법으로 측정하였으며, 총 콜레스테롤과 중성지방은 효소법을 이용한 자동분석기로 측정하였다. 또한 고밀도지단백은 침전제를 이용하여 유미립자, 저밀도지단백, 초저밀도지단백을 침전시킨 후 효소법으로 측정하였다.

3) 항산화 효소

헤파린 처리된 시험관에 채혈한 혈액으로부터 적혈구를 분리하여 생리 식염수에 3번 세척하고 냉각수로 6배 희석하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 활성도: SOD의 활성도는 Crapo 등²⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 0.1mM EDTA를 포함한 50mM phosphate buffer(PH 7.8) 2.3mL에 0.2mM xanthine과 0.04mM cytochrome c를 각각 0.3mL씩 혼합하였다. 그후 다양한 농도의 xanthine oxidase를 0.1mL씩 첨가한 후, 550nm에서 측정된 흡광도가 1분당 0.02 증가되도록 xanthine oxidase의 농도를 정하였다. 동일한 방법으로 buffer 대신 희석된 적혈구표본을 사용하여 흡광도 변화를 2분간 측정하였다. 효소활성도는 동일한 조건에서 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 정하였다.

Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성도: GSH-Px는 수정된 Flohe 방법²⁵⁾과 Paglia와 Valentine의 방법²⁶⁾으로 측정하였다. 1mM EDTA를 포함한 100mM phosphate buffer(PH 7.0) 1mL에 50 μ L의 적혈구와 5mM glutathion 200 μ L, 20mM Na₃N 100 μ L, 0.72U glutathion reductase 100 μ L, 0.45mM NADPH 200 μ L를 혼합한 후 340nm에서 3분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 그후 1.5mM H₂O₂ 200 μ L를 첨가하여 잘 섞은 후 5분 동안 흡광도의 변화를 다시 조사하였다. GSH의 비효소적 산화는 동일한 조건하에서 적혈구 대신 동량의 buffer를 첨가함으로써 측정하였고, 효소 활성도는 효소적 산화에서 비효소적 산화를 뺀 값을 사용하였다. 동일한 조건하에서 GSH-Px를 첨가하였을 때 1 μ mol NADPH가 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다.

Catalase 활성도: Catalase 활성도는 Aebi H²⁶⁾의 방법으로 측정하였다. 100mM Phosphate buffer 2.5mL로 희석된 다양한 농도의 catalase 10 μ L, 10mM H₂O₂ 1.0mL를 첨가하고 240nm에서 30초간의 흡광도 변화를 측정하고, 검체의 효소활성도 계산을 위한 표준곡선을 만들었다. 동일한 조건하에서 catalase 대신 적혈구를 10 μ L 첨가하여 검체의 효소활성도를 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 μ mol의 H₂O₂를 분해

시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Hemoglobin 정량: Hb 정량은 hemoglobin kit (Sigma Chemical Co.)를 사용하여 측정하였다.

4) 적혈구 지질 산화

적혈구의 과산화지질(thiobarbituric acid reactive substance, TBA-RS)의 농도는 수정된 Stocks과 Dormandy의 방법²⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 순수한 적혈구 2mL와 PBS 8mL를 혼합한 후 butylated hydroxy-toluene 용액을 넣었다. 그후 30% trichloroacetic acid 용액 0.5mL를 첨가하여 혼합한 후 2시간동안 얼음에 세워 놓았다. 실험관을 2,000rpm으로 원심 분리한 후 상층액 1mL를 채취하여 1% thiobarbituric acid(TBA) 용액과 혼합하여 끓는 물에 중탕하였다. 시험관을 흐르는 물에서 식힌 후 분광측정기를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였고, TBA-RS 농도는 MDA (malondialdehyde)-TBA 흡수계수($1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)를 이용하여 계산하였다.

5) 혈장 항산화 비타민

혈액으로부터 분리된 혈장의 항산화 비타민 농도는 수정된 Bieri 등²⁸⁾과 Craft 등²⁹⁾의 방법으로 측정하였다. HPLC(Hewlett Packard 1100), diodoray detector 및 Supelcosil C18, 5 μm (250 \times 4.6mm)를 사용하여 450nm 290nm과 300nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 측정에 사용한 mobile phase는 acetonitrile/methylene chloride/methanol(70/20/10 by vol)을 실험 당일 만들어서 여과하였다. 검체를 1.7mL/분 속도로 주입한 후 20분 동안 측정하였다.

1) 표준용액으로 lycopene, lutein, β -carotene, α -tocopherol 및 retinol(Sigma Chemical Co.)과 internal standard로서 echinenone(Fluka Chemical Company)과 tocopherol acetate(Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. 각각의 carotenoids와 retinol 1mg을 hexane 2mL에 용해시킨 후 ethanol 50mL로 희석하였다. α -tocopherol과 tocopherol acetate는 ethanol 50mL에 용해시키고 최종 농도가 1 μg /mL가 되도록 mobile phase로 희석한 후 여과하였다. 이때 표준용액의 농도는 각각의 흡광계수를 이용하여 계산하였다.

2) 혈장 200 μL , internal standard 200 μL 및 ethanol 300 μL 를 혼합하고 hexane 1mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 그후 검체를 원심 분리하여(2,000rpm, 10분, 4 $^{\circ}\text{C}$) 상층액을 취하여 고속진공건조기로 건조시켰다. 그후 mobile phase 200 μL 로 다시 용해한 후 20 μL 을 채 취하여 HPLC에 주입하였다.

6. 통 계

연구결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였으며, 각 결과들은 SPSS PC+를 이용하여 Student t 검정 및 ANOVA로 통계적 분석하였고 유의수준은 0.05 미만으로 정하였다.

결 과

당뇨병성 합병증을 가진 환자 44명 중 한 가지의 합병증이 동반된 환자는 19명(당뇨병성 신증 5예, 신경병증 10예, 망막병증 4예), 두 가지 합병증을 동반한 환자는 14명(신증과 신경병증 6예, 신증과 망막병증 5예, 신경병증과 망막병증 3예), 세 가지 합병증이 모두 동반된 환자는 11명이었다. 총 콜레스테롤 및 중성지방의 혈장농도는 정상군과 당뇨병군간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 고밀도지단백의 농도는 정상군이 당뇨병군에 비해 유의하게 높았다. 합병증군과 비합병증군간에 당화혈색소는 유의한 차이가 없었다($8.7 \pm 2.6\%$ vs $8.2 \pm 2.1\%$) (Table 1).

TBA-RS는 당뇨병군($1.33 \pm 0.30 \text{nmol/mL}$)이 정상군($1.10 \pm 0.16 \text{nmol/mL}$) 보다 유의하게 높았으며, 당뇨병군 중에서는 합병증군($1.37 \pm 0.27 \text{nmol/mL}$)이 비합병증군($1.28 \pm 0.17 \text{nmol/mL}$)보다 유의하게 높았다. Catalase의 활성도는 당뇨병군이 정상군 보다 낮았으나 통계적 유의성은 없었다. 한편 당뇨병군이 정상군 보다 SOD 활성도(2.99 ± 0.80 vs $3.54 \pm 0.44 \text{U/mgHb}$)와 GSH-Px 활성도(2.88 ± 0.39 vs $3.14 \pm 0.39 \text{U/mgHb}$)가 유의하게 낮았다(Table 2). 당뇨병군 중에서는 합병증군이 비합병증군에 비하여 낮은 catalase와 SOD 활성도를 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 GSH-Px의 경우 합병증군($2.81 \pm 0.6 \text{U/mgHb}$)이 비합병증군($3.17 \pm 0.4 \text{U/mgHb}$)에 비하여 유

Table 1. The Characteristics of Diabetic and Normal Subjects

Clinical characteristics	Groups	Normal (n=44)	Type 2 Diabetics		
			total (n=94)	with Cx (n=44)	without Cx (n=50)
Age(year)		45.1±6.9	51.8±9.9**	53.0±8.9	50.9±10.7
Height(cm)		162.8±7.7	161.6±9.1	163.1±9.3	160.0±8.7
Weight(kg)		63.9±10.2	63.3±9.2	64.6±9.7	61.8±8.5
BMI(kg/m ²)		23.9±3.0	25.0±2.6	25.7±2.9	24.2±1.9
HDL(mmol/L)		2.30±1.61	1.54±1.16*	1.57±0.99	1.51±1.33
LDL(mmol/L)		2.31±1.08	2.57±1.16	2.66±1.28	2.30±1.39
Cholesterol(mmol/L)		5.35±1.50	5.26±1.13	5.17±1.17	5.35±1.09
TG(mmol/L)		1.54±0.69	1.75±0.94	1.87±1.05	1.64±0.82
Uric acid(umol/L)		321.2±83.3	267.7±71.4*	273.6±71.4	261.8±71.4
FBS(mmol/L)		5.33±1.02	9.11±3.03**	9.12±3.28	9.10±2.70
PC 2hr(mmol/L)				14.20±6.41	12.68±4.78
HbA1c(%)				8.7±2.6	8.2±2.1
Duration(year)				5.5±4.8	5.2±4.9

* p<0.05, significance between diabetic and normal groups.

** p<0.001, significance between diabetic and normal groups.

Table 2. The Antioxidant Enzyme Activity(U/mgHb) in Diabetics and Controls

Enzyme	Groups	Normal	Type 2 Diabetics		
			total	with Cx	without Cx
Catalase		2.71±0.72	2.63±0.71	2.68±0.7	2.57±0.7
SOD		3.54±0.44	2.99±0.8*	2.84±0.4	2.92±0.4
GSH-Px		3.14±0.39	2.88±0.39*	2.81±0.6**	3.17±0.4

* p<0.05, significance between diabetic and normal groups.

** p<0.05, significance between complication and non-complication groups.

Table 3. The Concentrations of Antioxidant Vitamins(μmol/L) in Diabetics and controls

Vitamins	Groups	Normal	Type 2 diabetics		
			total	with Cx	without Cx
β-carotene		0.67±0.32	0.54±0.27*	0.45±0.23**	0.62±0.30
Lycopene		0.14±0.06	0.07±0.05*	0.05±0.04**	0.08±0.06
Lutein		1.04±0.29	0.83±0.29*	0.86±0.28	0.80±0.30
Retinol		2.03±0.67	2.02±0.77	1.96±0.64	1.75±0.87
α-tocopherol		18.43±0.81	19.04±0.86	19.42±0.93	18.66±0.79

* p<0.05, significance between diabetic and normal groups.

** p<0.05, significance between complication and non-complication groups.

의하게 낮았다(Table 2).

Lycopene은 조사된 carotenoids중 당뇨병군(0.07±0.05μmol/L)과 정상군(0.14±0.06μmol/L) 모두에서 가

장 낮은 혈장 농도를 보였으며, β-carotene의 경우 각각 0.54±0.27μmol/L과 0.67±0.32μmol/L, 그리고 lutein은 각각 0.83±0.29μmol/L과 1.04±0.29μmol/L

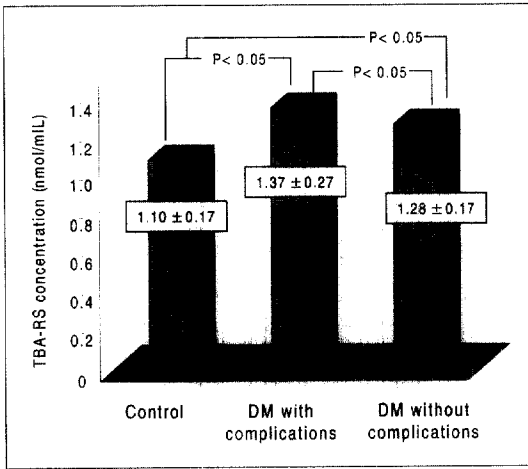


Fig. 1. Thiobarbituric acid reactive substance concentrations among three groups.

로 모든 carotenoids의 혈장농도는 당뇨병군이 정상군보다 유의하게 낮았다. 그러나 혈장 retinol은 두 군간에 유의한 차이가 없었으며, α -tocopherol은 당뇨병군이 정상군보다 높았으나 통계적인 유의성이 없었다. β -carotene은 당뇨병 환자중 합병증군($0.45 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$)이 비합병증군($0.62 \pm 0.30 \mu\text{mol/L}$)에 비하여 유의하게 낮았으며, lycopene은 양 군간의 차이가 더욱 뚜렷하였다($0.05 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ vs $0.08 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$). 그러나 lutein, retinol 및 α -tocopherol의 혈장농도는 합병증군과 비합병증군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 3).

고 안

각종 질병의 발생기전을 밝히는데 있어서 산화 스트레스가 중요한 위치를 차지하고 있음에도 불구하고 생체내에서 이를 측정하는 것은 쉽지 않다. 산화적 손상을 측정하는 것은 두 가지 방향으로 수행될 수 있는데, 한 가지는 지질과산화와 같은 산화적 손상의 반응 생성물을 측정하는 방법이며 다른 한 가지는 항산화제의 결핍 정도를 측정하는 것이다. 이와 같은 목적을 위하여 적혈구를 이용하는 경우가 많은데, 적혈구는 풍부한 혈색소를 함유하고 있어서 자유라디칼이 노출되어 산화가 일어나기 쉬우며 또한 적혈구에는 산화를 방지

할 수 있는 항산화 방어기전이 잘 발달되어 있기 때문이다. 실제로 당뇨병 및 당뇨병성 만성 합병증의 발생에서 산화적 손상을 연구함에 있어서 적혈구를 이용한 지질과산화와 항산화 체계의 측정이 유용하다고 알려져 있다³⁰. 본 연구에서도 적혈구를 이용하여 지질과산화의 정도와 항산화 효소들의 활성도를 측정하므로써 당뇨병 환자의 산화적 손상정도를 알아보고자 하였다. 또한 본 연구에서는 당뇨병 환자에서 합병증군과 비합병증군 사이에 연령, 유병기간, 혈당조절정도, 혈중 지단백 농도 등 적혈구의 지질과산화 또는 항산화 효소의 활성도에 영향을 미칠 수 있는 요인들을 배제하고자 하였다.

본 연구에서는 당뇨병 환자에서의 지질과산화의 정도가 정상인보다 높았으며 특히 만성 합병증을 동반한 환자들에서 뚜렷하게 높았다. 이와 같은 결과는 당뇨병에 이환된 동물들의 신장과 망막에서 지질 산화물의 농도가 높다는 연구보고 및 당뇨병성 만성 합병증이 동반된 경우에 지질 산화물이 증가한다는 연구결과와 일치한다^{31~34}. 이러한 결과들로써, 당뇨병 환자들이 산화적 스트레스를 많이 받고 있으며 이것이 당뇨병성 합병증과 관련될 수 있을 것임을 추정할 수 있겠다. 당뇨병 환자들에서 지질과산화가 증가하는 기전으로는, 지속적인 고혈당 상태에서 단백질이 당화되는 과정에서 많은 자유라디칼이 생성되며, 이러한 자유라디칼은 적혈구 막의 지방 성분과 결합하므로써 지질과산화가 유발되는 것으로 알려져 있다. 세포의 지질과산화의 증가는 세포의 구조변형 및 기능상실을 초래하여 당뇨병성 만성 합병증을 유발할 것으로 생각할 수 있겠다.

산화적 손상에 노출되기 쉬운 적혈구에는 항산화 체계가 비교적 잘 발달되어 있으며 SOD, GSH-Px 및 catalase는 대표적인 항산화 효소로 알려져 있다. 이 중에서 SOD는 생성된 자유라디칼을 과산화 수소로 전환시키는데 우선적으로 관여하며 catalase와 GSH-Px는 과산화수소를 물로 전환시키므로 산화적 손상을 방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁰. 본 연구에서 SOD와 GSH-Px 활성도는 당뇨병군이 대조군에 비하여 유의하게 저하되었는데 이와 같은 결과는 다른 보고들과 유사하였다³⁵. 당뇨병 환자에서는 단백질의 비효소매개성 당화가 증가하여 단백질의 구조 및 기능

을 변형시킬 수 있는데, GSH-Px의 당화증가로 인하여 그 활성이 저하되었을 가능성을 생각해 볼 수 있겠다.

한편 당뇨병 환자중에서 합병증군은 비합병증군에 비하여 GSH-Px 활성도만 유의하게 저하되어 있었다. GSH-Px는 구조적으로 4개의 셀레니움을 가지고 있으며 이것은 적혈구에서 세포막의 지질과 단백질을 보호하는데 상승적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{36,37}. 셀레니움이 결핍되면 체내의 과산화지질의 증가와 prostaglandin/thromboxane의 비율의 감소를 초래하여 심근경색증이나 죽상동맥경화증의 심장질환에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나³⁸, 당뇨병성 합병증과 셀레니움에 대한 연구가 없으므로 명확한 결론을 위해서는 이에 관한 더 많은 연구가 필요하다 하겠다.

산화적 스트레스의 증가가 각종 질병과 관련된다는 보고들로 인하여 최근에는 항산화 식품에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있으나 당뇨병 환자에서 항산화 식품에 대한 연구는 아직까지 많이 알려지지 않았다. 본 연구에서 당뇨병 환자들은 정상인에 비하여 혈장 carotenoids 농도가 낮으며 특히 만성 합병증을 동반한 경우에 심한 것으로 나타났다. 저자들은 항산화 비타민의 혈장농도에 크게 영향을 미칠 수 있는 요인들을 가진 흡연자, 비타민제 복용자, 고지혈증환자 등을 배제하도록 고안하였고, 본 연구과정 중 시행한 섭취빈도조사(미발표자료)를 통한 β -carotene, lycopene, lutein 등의 carotenoids와 비타민 E 등 항산화비타민의 섭취량이 합병증군과 비합병증군 사이에 차이가 나타나지 않았으므로 합병증군에서 유의하게 낮은 혈장 carotenoids 농도가 당뇨병 자체와 관련된 것으로 생각하였다. 아직까지는 이에 관한 연구가 드물기 때문에 carotenoids가 어떠한 기전으로 당뇨병 및 당뇨병성 합병증과 관련이 있는지는 알 수 없지만 만성적인 고혈당에 의하여 증가된 산화적 스트레스를 제거하기 위하여 carotenoids가 소모되었을 가능성을 생각할 수 있겠다. β -carotene은 대혈관 합병증보다는 미세혈관 합병증인 당뇨병성 신증, 신경병증 및 망막증에 더 효과적인 항산화제 작용이 있다는 연구결과가 보고²³된 바 있으며, 향후 이에 대한 연구들이 진행된다면 당뇨병 환자에서 만성 합병증을 예방 또는 지연시키는 데에도 도움이 될 것으로 생각한다.

요 약

연구배경: 자유라디칼에 의한 산화적 손상은 제2형 당뇨병과 그 합병증의 발생에 관련된다는 보고들이 알려져 있다. 저자들은 한국인 제2형 당뇨병 환자에서 적혈구 산화지질도, 항산화효소 활성도, 지용성 항산화 비타민들의 상태를 측정하므로써 정상인, 당뇨병성 합병증 환자 및 비합병증 환자의 산화적 손상과 항산화 체계를 비교해 보고자 하였다.

방법: 제2형 당뇨병 환자 94예(합병증군 44예, 비합병증군 50예)와 정상군 44예를 대상으로 신체계측학적 검사, 일반 혈액 검사를 실시하였으며 적혈구로부터 항산화효소들의 활성도와 과산화지질을 측정하고 혈장으로부터 지용성 항산화비타민의 농도를 측정하였다.

결과: TBA-RS는 당뇨병군($1.33 \pm 0.30 \text{ nmol/mL}$)이 정상군($1.10 \pm 0.17 \text{ nmol/mL}$)보다 유의하게 높았으며, 당뇨병군 중에서는 합병증군($1.37 \pm 0.27 \text{ nmol/mL}$)이 비합병증군($1.28 \pm 0.17 \text{ nmol/mL}$)보다 유의하게 높았다. Catalase의 활성도는 당뇨병군이 정상군보다 낮았으나 차이가 없었다. 한편 당뇨병군이 정상군보다 SOD 활성도(2.99 ± 0.80 vs $3.54 \pm 0.44 \text{ U/mgHb}$)와 GSH-Px 활성도(2.88 ± 0.39 vs $3.14 \pm 0.39 \text{ U/mgHb}$)가 유의하게 낮았다. 특히, GSH-Px의 경우 합병증군($2.81 \pm 0.70 \text{ U/mgHb}$)이 비합병증군($3.17 \pm 0.80 \text{ U/mgHb}$)에 비하여 유의하게 낮았다.

Lycopene은 조사된 carotenoids중 당뇨병군($0.07 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$)과 정상군($0.14 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$) 모두에서 가장 낮은 혈장 농도를 보였으며, β -carotene의 경우 각각 $0.54 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$ 과 $0.67 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$, 그리고 lutein은 각각 $0.83 \pm 0.29 \mu\text{mol/L}$ 과 $1.04 \pm 0.29 \mu\text{mol/L}$ 로 모든 carotenoids의 혈장농도는 당뇨병군이 정상군보다 유의하게 낮았다. 그러나 혈장 retinol, α -tocopherol은 두군간에 유의한 차이가 없었다. β -carotene은 당뇨병 환자중 합병증군($0.45 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$)이 비합병증군($0.62 \pm 0.30 \mu\text{mol/L}$)에 비하여 유의하게 낮았으며, lycopene($0.05 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ vs $0.08 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$)은 두군간의 차이가 더욱 뚜렷하였다($p < 0.05$).

결론: 본 연구는 당뇨병성 합병증을 동반한 당뇨병 환자의 경우 비합병증 환자보다 항산화효소의 저하가 심함을 보여주었으며, 당뇨병성 합병증에 있어 항산화효소 중 GSH-Px의 중요성을 제시하였다. 당뇨병성 만성합병증군의 carotenoids의 농도가 비합병증군 보다 유의적으로 낮아 산화적 손상의 위험도가 더 많음을 알 수 있었고, 앞으로 당뇨병성 만성합병증과 항산화비타민인 carotenoids의 연관성에 관한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구를 수행함에 있어 실험적인 여건을 마련하는데 도움을 주신 아주대학교 병원 임상병리과 광연식 교수님, 신옥현 팀장님과 혈액 검체 수집에 도움을 주신 아주대학교 병원 내분비검사실 임현채씨 및 종합검진센터의 협조에 감사드립니다. 본 연구는 한국 학술진흥재단의 학술연구조성비(박사후 연수과정 연구지원, 과제번호 #96-542)에 의하여 연구됨.

= Abstract =

The Oxidative Stress and the Antioxidant System in Type 2 Diabetics with Complications

Aewha Ha, Hye-Lim Noh,
Yoon-Sok Chung, M.D., Kawn-Woo Lee, M.D.,
Hyeon-Man Kim, M.D. and Jung-Soon Cho¹

*Department of Endocrinology and Metabolism,
School of Medicine Ajou University*

¹*Department of Food & Nutrition, MyongJi
University*

Background: Diabetes mellitus represents a state of increased oxidative stress which is based on the evidence of increased peroxidation and glycosylation, and reduced antioxidant system. It has been suggested that increased oxidative stress may play an important role on the pathogenesis of diabetic

complication in type 2 diabetes. However, limited informations regarding the oxidative stress and antioxidant system in diabetic complications are available. Therefore the purpose of this study is to determine the oxidative stress and antioxidant system in type 2 diabetes with diabetic complications.

Methods: The study population consisted of 94 type 2 diabetic patients and 44 normal subjects. The concentration of thiobarbituric acid reactive substance(TBA-RS) and the activities of antioxidants enzymes, catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) in erythrocyte were determined by using spectrophotometer. The plasma concentrations of β -carotene, lycopene, lutein, α -tocopherol and retinol were determined by using HPLC.

Results: The TBA-RS concentrations in type 2 diabetes($1.33 \pm 0.30 \text{ nmol/mL}$) were significantly higher than those in normal subjects($1.10 \pm 0.17 \text{ nmol/mL}$). Also the TBA-RS concentrations between subjects with complications($1.37 \pm 0.27 \text{ nmol/mL}$) and without complications($1.28 \pm 0.17 \text{ nmol/mL}$) differed ($p < 0.05$). The activities of SOD and GSH-Px in type 2 diabetes($2.99 \pm 0.80 \text{ U/mgHb}$, $2.88 \pm 0.39 \text{ U/mgHb}$) were significantly lower than those in normal subjects($3.54 \pm 0.44 \text{ U/mgHb}$, $3.14 \pm 0.39 \text{ U/mgHb}$). GSH-Px between diabetics with($2.81 \pm 0.6 \text{ U/mgHb}$) and without complications($3.17 \pm 0.4 \text{ U/mgHb}$) differed significantly. The plasma concentrations of lycopene and β -carotene were significantly lower in type 2 diabetes($0.07 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$, $0.54 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$) than in control subjects($0.14 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$, $0.67 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$). Also, lycopene and β -carotene in subjects with complications($0.05 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$, $0.45 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$) were lower than in subjects without complications($0.08 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$, $0.62 \pm 0.30 \mu\text{mol/L}$). No significant differences in plasma α -tocopherol concentrations between subjects with and without complications($19.42 \pm 0.93 \mu\text{mol/L}$ vs $18.66 \pm 0.79 \mu\text{mol/L}$).

Conclusion: This study showed that in diabetes with diabetic complications, the lipid peroxidation of erythrocytes are highly increased and the antioxidant reserves are significantly depleted, compared with diabetes without diabetic complications, which suggests that diabetes with complications are under high oxidative stress and the supplementations of carotenoids could decrease the oxidative stress in diabetes with diabetic complications.

Key Words: Oxidative stress, Diabetic complication, Antioxidant system

참 고 문 헌

1. Marks HH, Krall LP: *Onset, cause, prognosis, and mortality in diabetes mellitus. In: Marble A, White P, Bradley RF, eds. Joslin's diabetes mellitus. 11th ed. p227, Philadelphia: Lea & Febiger 1971*
2. Wolff SP: *Diabetes mellitus and free radicals. Br Med Bull 49:642-652, 1993*
3. 정명희: *Overview of Cell Damage by Oxygen Radicals: Involvement of Oxygen Radicals in Various Pathological Conditions. 21차 대한당뇨병학회 추계학술대회 초록집 10-15, 1994*
4. 유형준: *당뇨병합병증 발생에서 자유라디칼의 역할. 21차 대한 당뇨병학회 추계학술대회 초록집 22-28, 1994*
5. Alan JS: *Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. Diabetes Rev 2:7-10, 1993*
6. Ceriello A, Russo P D, Amstad P, Cerutti P: *High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Diabetes 45:471-477, 1996*
7. 조희충, 김미자, 서정철, 조영호, 안기완, 정종훈, 박찬국, 이승일, 배학연, 이병래: *제2형당뇨병 환자의 적혈구에서 당농도에 따른 항산화효소 활성도의 변화. 당뇨병 18:337-343, 1994*
8. Janjic D, Anderegg E, Deng S: *Improved insulin secretion of cryopreserved human islet by antioxidant treatment. Pancreas 13:166-172, 1996*
9. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, Oberley L: *Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 35:503-507, 1986*
10. Nath N, Chari SN, Rathi AB: *Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. Diabetes 33:586-589, 1984*
11. Roza MA, Pieper, GM, Johnson, CP, Adams, MB: *Pancreatic antioxidant enzyme activities in normoglycemic diabetic prone BB rats. Pancreas 10:53-58, 1995*
12. Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK: *Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia 36:299-304, 1993*
13. Block G: *Health habits and history questionnaire: diet history and other risk factors. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 1989*
14. Malone WF: *Studies evaluating antioxidants and β -carotene as chemopreventives. Am J Clin Nutr 53(Suppl):305-313, 1991*
15. Shumidt K: *Antioxidant vitamins and β -carotene: effects on immunocompetence. Am J Clin Nutr 53(Suppl):383-385, 1991*
16. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Bishnoi I, Begom R: *Plasma levels of antioxidant vitamins and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. Acta Cardiologica 49:441-452, 1994*
17. Reaven P: *Dietary and pharmacologic regimens to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Clin Nutr 62 (Suppl):1483-1489, 1995*

18. Higuichi Y: *Lipid peroxides and α -tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. Acta Med Okayama* 36:165-175, 1982
19. Karpen CW, Cataland S, O'Dorisio TM, Panganamala RV: *Interrelation of platelet vitamin E and thromboxane synthesis in type I diabetes mellitus. Diabetes* 33:239-243, 1984
20. McLennan S, Yue DK, Fisher E, Capogreco C, Heffernan S, Ross GR, Turtle JR: *Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. Diabetes* 37:359-361, 1988
21. Krinsky NI: *Antioxidant functions of carotenoids. Free Radic Biol Med* 7:617-35, 1989
22. Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK: *Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia* 36:299-304, 1993.
23. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS: *Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. Diabetes* 41:167-173, 1992
24. Crapo CH, MacCord, JM, Fridovich I: *Preparation and assay of superoxide dismutase. Methods Enzymol* 53:382-290, 1978
25. Flohe L, Wolfng A, Gunzler WA: *Assay of glutathione peroxidase. Methods Enzymol* 105: 114-130, 1984
26. Paglia DE, Valentine WN: *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase J Lab Clin Med* 70:158-169, 1967
27. Aebi H: *Catalase, methods of enzymatic analysis, Ergmeyer HU, Bergmeyer J, Gra BI eds, 3rd ed. p 273, Verlag Chemie, 1983*
28. Stocks J, Dormandy TL: *The antioxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br J Haematol* 20:95-111, 1971
29. Bieri JG, Brown ED, Smith JC: *Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography. J Liquid Chromatography* 8:473-484, 1985
30. Craft NE, Brown ED, Smith JC: *Effects of storage and handling conditions on concentrations of individual carotenoids retinol and tocopherol in plasma. Clin Chem* 34:44-48, 1988
31. Jain SK: *Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. J Biol Chem* 264:21340-21345, 1989
32. Rungby J, Flyvbjerg A, Andersen HB, Nyborg K: *Lipid peroxidation in early experimental diabetes in rats : Effects of diabetes and insulin. Acta Endocrinol* 126:378-383, 1992
33. Wolff SP: *The potential role of oxidative stress in the diabetic complications: novel implications for theory and therapy. In Diabetic Complications. Scientific and Clinical Aspects. p 167, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1987*
34. Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK: *Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia* 37:449-459, 1994
35. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B: *Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. Metabolism* 39:971-975, 1990
36. 유병전, 배학연, 이병래: *당뇨병 환자의 적혈구에서 항산화효소 활성도의 변화. 대한내과학회지* 44:766-774, 1993
37. Griffith OW: *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem* 106:207-212, 1980
38. Günzler W, Floh L: *Glutathione peroxidase. In: Handbook of methods for Oxygen Radical Research. Greenwald R, Ed. p 285, Boca Raton, FL, CRC Press, 1985*