□ 원 저 □

당뇨병 환자에서 산화 스트레스에 의한 NF-κB 및 AP-1의 활성화가 죽상동맥경화증에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실

김철식·이근택·박진아·조민호·남주영·박종숙
김똘미·안철우·차봉수·임승길·김경래·이현철

Role of Activation of NF-κB and AP-1 by Oxidative Stress in Atherosclerosis in Diabetic Patients

Chul Sik Kim, Geun Taek Lee, Jina Park, Min Ho Cho, Joo Young Nam, Jong Suk Park, Dol Mi Kim, Chul Woo Ahn, Bong Soo Cha, Sung Kil Lim, Kyung Rae Kim, Hyun Chul Lee

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

- Abstract -

Background: The aim of this study was to evaluate the possible role of NF-κB activation and AP-1 by oxidative stress in atherosclerosis in diabetic patients by measuring the carotid intima-media thickness, intracellular ROS generation and activation of transcription factors, including nuclear factor-kappa B (NF-κB) and activator protein-1 (AP-1).

Methods: Sixty-six patients (28 males, 38 females; age 56.1±13.4 years; duration of diabetes 115.7±83.4 months) with type 2 diabetes mellitus (DM) were selected for this study. The DM patients included in this study were divided into those with a normal carotid intima-media thickness (Group II) and those with an increased intima-media thickness (Group III). 57 healthy controls matched for age and sex with the DM patients (Group I) were randomly selected. Dichlorodifluorescein (DCF)-sensitive intracellular ROS was measured by fluorescent spectrometry. The activities of NF-κB and AP-1 in PBMCs were measured by an electrophoretic mobility shift assay.

Results: No differences were evident between the groups in terms of gender, age, BMI, blood pressure, total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol. Spontaneous and H_2O_2 (or phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) stimulated ROS were significantly higher in the PBMCs from the DM patients

접수일자: 2003년 11월 5일, 통과일자: 2004년 7월 31일, 책임저자: 안철우, 연세대학교 의과대학 내과학교실
* 본 논문은 2002년도 한국 학술진흥재단(KRF-2002-003-E00073)의 지원에 의하여 이루어진 것임

with an increased intima-media thickness (Group III) than in those without (Group II), and were also higher in the control group (Group I). Moreover, the activities of NF-κB and AP-1 were significantly higher in Group III than in Groups I or II.
Conclusion: The present study demonstrates that intracellular ROS generation, and NF-κB and AP-1 activation in PBMCs strongly correlates with the carotid artery IMT. These clinical results suggest that increased oxidative stress in PBMCs may play a role in the pathogenesis of atherosclerosis in DM patients **(J Kor Diabetes Assoc 28:255 ~ 264, 2004).**

Key Words: NF-κB, AP-1, Oxidative stress, Intima media thickness, Atherosclerosis, Diabetes mellitus

서 론

당뇨병의 합병증으로 과거에는 감염이나 급성 대사성 합병증 및 미세혈관 합병증 등이 주된 문제였으나, 점차 당뇨병 환자의 중요한 사망원인을 차지하는 가속화된 동맥경화에 기인한 대혈관 합병증이 중요한 문제로 대두되고 있다[1]. 하지만 이러한 합병증의 발생 기전은 아직 규명이 되지 않았으므로 당뇨병의 만성 합병증과 가속화된 동맥경화에 대한 기전의 규명 및 이를 통한 치료방법의 개발에 대한 연구가 필요한 상태이다.

최근의 여러 연구들에서 당뇨병 환자의 죽상동맥경화증 및 혈관이상의 발생에 내피세포의 산화환원상태와 혈관 벽에서 산화환원에 민감한 염증성 유전자의 발현 증가가 기여함을 보고하고 있는데[2~7] 이러한 전달과정에서 산화환원 체계의 전사인자인 nuclear factor-kappa B (NF-κB) 및 activator protein-1 (AP-1)의 활성화가 중요하게 대두되고 있다.

한편, 죽상동맥경화증의 유무 또는 진행정도는 임상적으로 증상이 나타나기 전까지는 진단하기가 쉽지 않다. 일반적으로 혈관조영술이 자주 사용되고 있으나 혈관 내경의 협착이 생긴 이미 진행된 병변만을 확인할 수 있으므로 죽상동맥경화증의 조기진단은 어렵다. 이에 비해 고해상도의 B-mode 초음파를 이용한 경동맥 내중막두께의 측정은 비침습적인 검사방법으로서 반복적으로 시행하기가 용이하고 조기 죽상동맥경화증의 병변을 관찰할 수 있으므로 죽상동맥경화증의 추적관찰에 유용하게 사용되고 있다. 또한 경동맥 내중막두께는 관상동맥질환 및 뇌혈관질환의 유무와 상관관계를 보이고[8] 전신 죽상경화증의 정도를 나타내는 지표로서 유의함이 여러 연구에서 보고 된 바 있어[10] 죽상경화증의 정도를 측정하는 검사방법으로 보편화되어 있다.

따라서 본 연구에서는 당뇨병 환자와 정상 대조군의 경동맥 내중막두께를 측정하고 산화 스트레스와 그에 따른 산화환원시스템에 관여하는 전사인자인 NF-κB 및 AP-1의 활성도의 차이를 평가하고 대상자들의 임상 및 생화학적 특징과의 관계를 분석함으로써 산화스트레스에 의해 유발되는 NF-κB 및 AP-1의 활성화와 당뇨병 환자에의 죽상동맥경화증과의 관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 치료받고 있는 제2형 당뇨병 환자 중 66명과 이들과 연령, 성별에 맞춘 정상 대조군 57명 등 총 123명을 대상으로 하였다.

출혈성 소인을 가진 환자, 원발성 고지혈증이 의심되는 환자, 신기능이 저하된 환자(혈청 크레아티닌 >2.0 mg/dL), 간기능 장애자는 대상으로 포함하지 않

았다. 또한 안지오텐신 전환효소 억제제, 안지오텐신 수용체 길항제, PPAR-γ activator, vitamin C, E, α-lipoic acid, 부신피질호르몬제제 등 AP-1 및 NF-κB의 활성에 영향을 미치는 약제를 복용하는 경우는 대상에서 제외하였으며 흡연, HMG CoA 환원효소억제제, 여성호르몬제제 등의 내중막두께에 영향을 미칠 수 있는 약제를 복용하는 경우 또한 대상에서 제외하였다.

2. 연구 방법

1) 연구대상자의 경동맥 내중막두께에 따른 분류

당뇨병 환자들을 경동맥 내중막두께 증가 유무에 따라 두 군으로 나누고, 연령, 성별에 맞추어 정상 대조군을 선정하여 다음의 세 군으로 분류하여 연구의 대상으로 하였다. 연령, 성별에 따른 경동맥 내중막두께 증가유무는 조 등[9]이 건강한 성인 757명을 대상으로 한 연구결과를 따랐다.

① '정상 대조군' (Group I)
: 환자군과 성별과 연령을 일치시킨 건강한 사람
② 경동맥 내중막두께가 정상인 당뇨병 환자군 ('정상 IMT 당뇨병 환자군', Group II)
: 경동맥 내중막두께의 평균값이 성별 및 연령에 비해 정상인 당뇨병 환자군
③ 경동맥 내중막두께가 증가된 당뇨병 환자군 ('증가된 IMT 당뇨병 환자군', Group III)
: 경동맥 내중막두께의 평균값이 성별 및 연령에 비해 증가한 당뇨병 환자군

2) 임상적 및 생화학적 특징 조사: 공복혈당, 당화혈색소 및 혈청 지질 농도

흡연력, 수축기 및 이완기 혈압 조사, 당뇨병의 유병기간, 동반된 질환 및 복용하고 있는 약제를 조사하였고, 또한 당뇨병 환자의 경우 당뇨병의 합병증에 대해서 충분한 조사를 시행하였다.

대상자들에게서 각각 채혈하여 혈당, C-peptide, 인슐린 및 당화혈색소 및 혈청 지질 농도를 측정하고, 혈당은 포도당 산화효소법으로, C-peptide와 인슐린은 방사면역법으로 각각 측정하고 유리지방산은 Hitachi 7150 auto-analyzer (Tokyo, Japan)로 측정하였다. 이와 함께 공복혈청을 이용하여 총콜레스테롤, 중성지방 및 HDL-콜레스테롤을 측정하였으며 LDL-콜레스테롤 수치는 아래의 Fridelwald 공식을 이용하여 산출하였다.

LDL-콜레스테롤 (mg/dL) = 총콜레스테롤 (mg/dL) - [HDL-콜레스테롤 (mg/dL) + 중성지방 (mg/dL) / 5]

3) 경동맥 내중막두께 측정

경동맥 내중막두께는 좌측과 우측 경동맥의 종단면을 따라 총경동맥이 내경동맥과 외경동맥으로 분리되는 분지점의 근위부에 위치한 총경동맥의 원벽 (far wall)에서 내중막두께가 최고인 지점을 정하고 이 지점과 이를 중심으로 근위 10 mm, 원위 10 mm 위치에서 내중막두께를 측정하여 평균치와 최고치를 구하는 방법으로 측정하였다. 이 때 경동맥 내중막두께의 측정이 예정된 부위에 석회화나 혈관의 내강내로 돌출된 병변인 죽전 (plaque)이 있는 경우에는 죽전이 포함되지 않은 근위부에서 측정하였다. 경동맥 내중막두께는 원벽의 내막에 해당되는 첫번째 반향적선과 중막과 외막의 경계를 나타내는 두번째 반향적선 사이의 거리를 캘리퍼의 일종인 Digimatic (Mitutoyo CD-15B, Japan)을 이용하여 측정하였고 고해상도 B-mode 초음파기기 (Aloka Prosound SSD-5000, Tokyo, Japan)의 7.5 MHz 선상 탐촉자 (Axial resolution: 0.2 mm)를 이용하여 동일 검사자에 의해 시행되었다.

4) 환자의 혈액으로부터 말초혈액 단핵구세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 분리 및 산화 스트레스 및 PBMC 세포 내 산화물질의 활성도 측정

채혈한 전혈에 항응고제인 3.8% sodium citrate (9:1; vol/vol)를 처리하여 Ficoll Paque Plus™ gradient (Pharmacia, Freiburg, Germany) 처리과정을 거친 후 상온에서 500×G로 30분간 원심분리하여 PBMC를 포함하고 있는 층을 흡입하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척 후 현미경으로 PBMC를 확인하고, PBMC의 수를 측정하였다.

형광염료인 5 mmol 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA

: Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)를 사용하여 PBMC 세포내 반응성 산소족(reactive oxygen species, ROS)의 활성도를 형광분광광도계를 이용하여 측정하였다(excitation, 488 nm; emission, 515-540 nm). 이때 기저치의 활성도는 물론 산화 스트레스를 가한 후 활성도도 측정하였다. 세포 내 산화 스트레스의 자극에는 H_2O_2와 protein kinase C (PKC) 활성제인 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)를 사용하였다.

5) NF-κB 및 AP-1의 활성도 측정

① PBMC에서 핵 및 세포질 추출물 준비

배양 후에 세포들을 2회 세척하고 3,500 rpm으로 4분간 원심분리 한 후, 섭씨 4도에서 재부유하고 완충액[10 mmol/l HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/l $MgCl_2$, 10 mol/l KCl, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]로 세척하였다. 10 μg/μL antipain과 leupeptin 및 2.4 μg/μL aprotinin으로 용해하였다. Lysates는 4분간 3,500 rpm으로 원심분리 하고, 상층액은 제거하고 세포질 분획을 얻은 후 섭씨 4℃에서 보관하였다. 핵침전물을 완충액(20 mmol/l HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mmol/l NaCl, 1.5 mmol/l $MgCl_2$, and 0.2 mmol/l EDTA)으로 세척하고, 단백분해효소억제제를 처리한 다음 섭씨 4도에서 30분간 배양하고 10,000G로 원심분리 하면 남은 상층액은 핵단백질을 포함하게 되며, 이를 섭씨 -80℃에서 보관하였다.

② Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF-κB의 oligonucleotides (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')와 AP-1 (C-jun)의 oligonucleotides (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3')는 Promega (Madison, WI)를 사용하였다. 이들을 γ-32P-ATP 및 T4 kinase (Strategene, La Jolla, CA)로 표지하고 Sephadex G-25 column으로 정제하였다. 핵단백질은(5~10μg) 32P-labeled oligonucleotide probe로 상온에서 배양하고(20,000 cpm), 20분간 결합 완충액[12 mmol/l HEPES (pH 7.9), 4 mmol/l Tris-HCl (pH 7.9), 60 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 1 mmol/l PMSF, 12% glycerol, 5 μg of BSA, 2 μg of poly deoxyinosinic deoxycytidylic acid]을 처리하였다. Protein-DNA 복합체를 4% native polyacrylamide gels 및 1× Tris-glycine buffer (pH 8.5)로 용해하고, supershift 분석을 위해서 2 μg의 NF-κB subunit 단백질 항체를 처리한 후 핵 추출물과 함께 배양하고, 섭씨4도에서 표지탐색자와 1시간 처치한 후 gel shift analysis를 시행하였다. Gel을 건조시킨 후 PhosphorImager (Molecular Dynamics, San Jose, CA)를 사용하여 Image Quant software (National Institutes of Health, Bethesda, MD)로 방사능대를 시각화하여 정량화하였다.

3. 통계적 분석 방법

각 측정치는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군간의 성별, 흡연여부, 고혈압 및 당뇨병의 합병증 유무와 혈당조절방법의 차이, 그리고 연령, 체질량지수, 당뇨병 이환기간, 수축기 및 이완기 혈압, 혈당, 당화혈색소, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방의 차이는 ANOVA 및 독립적 표본의 t-검정을 이용하였다. 통계분석은 SPSS for windows 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였고, p값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 평가하였다.

결 과

1. 대상자들의 임상적 특성

본 연구에 참여한 세 군간의 연령, 성별에 유의한 차이는 없으며 체질량지수에서도 각 군 간의 차이가 없었다. 수축기 혈압은 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에게서 '정상 대조군'보다 높게 나타났으나 이완기 혈압은 차이가 없었다.

총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수치는 세 군간의 차이가 없었으며 '정상 IMT 당뇨병 환자군'과 '증가된 IMT 당뇨병 환자군' 간의 당뇨병 이환기간, 공복 및 식후 혈당, 혈청 C-peptide 및 당화혈색소 농도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. '증가된 IMT 당뇨병 환자군'의 경동맥

Table 1. Clinical and Biochemical Characteristics of Subjects

	Group I	Group II	Group III
N (male:female)	57 (25:32)	31 (15:16)	35 (13:22)
Age (year)	48.6±13.3	54.5±14.7	57.0±11.9
Body Mass Index (kg/m^2)	24.6±3.4	23.9±2.0	24.3±3.4
Systolic Blood Pressure (mmHg)	118.4±20.4	129.5±15.5	132.2±17.3*
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	83.8±46.6	82.1±7.9	83.1±9.6
Fasting C-peptide (μg/L)	-	1.2±0.4	1.4±0.5
Fasting glucose (mmol/L)	5.12±0.72	10.39±4.49*	9.92±3.50*
Postprandial glucose (mmol/L)	6.34±1.16	14.57±9.16*	15.53±4.36*
HbA_{1C} (%)	-	10.8±2.5	10.5±2.9
Total cholestrerol (mmol/L)	5.09±0.80	5.21±1.61	5.10±1.44
Triglyceride (mmol/L)	1.96±1.06	2.55±1.25	2.44±0.99
HDL-cholestrerol (mmol/L)	1.26±0.36	1.24±0.44	1.15±0.37
LDL-cholestrerol (mmol/L)	3.18±0.66	3.11±0.88	3.14±1.13
Duration of diabetes (month)	-	95.1±84.0	136.4±82.3
Intima Media Thickness (mm)	0.56±0.01	0.68±0.02*	1.00±0.06*†

Values are the mean±SD except for the frequency data, *: p <0.05, compared to group I, †: p <0.05, compared to group II

Table 2. Spontaneous and H_2O_2 or PMA Stimulated ROS in PBMCs of each Groups

	Group I (n=57)	Group II (n=31)	Group III (n=35)
Spontaneous ROS production (%)	40.9±2.2	59.8±2.1*	60.5±3.1*
Increment of H_2O_2 induced ROS production (%)	8.9±3.8	12.4±2.2*	18.7±2.2*†
Increment of PMA induced ROS production (%)	12.6±2.8	20.1±2.4*	24.1±3.5*†

Values are the mean±SD, *: p <0.05, compared to group I, †: p <0.05, compared to group II

내중막두께는 1.00±0.06 mm, '정상 IMT 당뇨병 환자군'의 경동맥 내중막두께는 0.68±0.02 mm, '정상 대조군'의 경동맥 내중막두께는 0.56±0.01 mm였다 (Table 1).

2. 각 군 간의 반응성 산소족 활성도의 차이

형광분석법으로 측정한 산화 스트레스의 지표인 기저 반응성 산소족은 '정상 대조군'에 비하여 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 현저히 높게 관찰되었으나, '정상 IMT 당뇨병 환자군'과 '증가된 IMT 당뇨병 환자군' 간의 차이는 없었다. 또한 H_2O_2 및 PKC activator인 PMA로 처리하여 자극한 경우에도 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 자극에 의한 반응성 산소족이 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비하여 유의하게 높게 관찰되었다 (Table 2).

3. EMSA에 사용한 NF-κB, AP-1에 대한 올리고핵산염의 특이성 분석 결과 (Competition assay)

본 연구에 사용한 NF-κB 및 AP-1의 분석에 사용한 각각의 올리고핵산염의 신빙성에 대한 평가를 위해

Table 3. The Activities of NF-κB and AP-1 in PBMCs of Each Groups

	Group I (n=57)	Group II (n=31)	Group III (n=35)
NF-κB	1.00±0.13	1.04±0.11	2.64±0.68*†
AP-1	1.00±0.15	1.33±0.47*	1.79±0.25*†

Values are the mean±SD, *: p <0.05, compared to group I, †: p <0.05, compared to group II

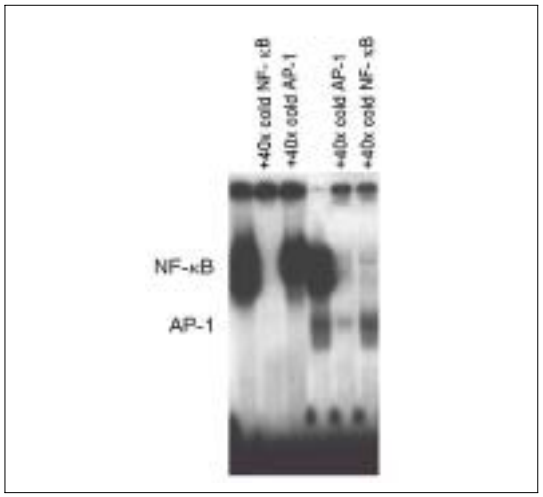

Fig. 1. Competition assay shows oligonucleotide for NF-κB, AP-1 had the specificity of the complex formation

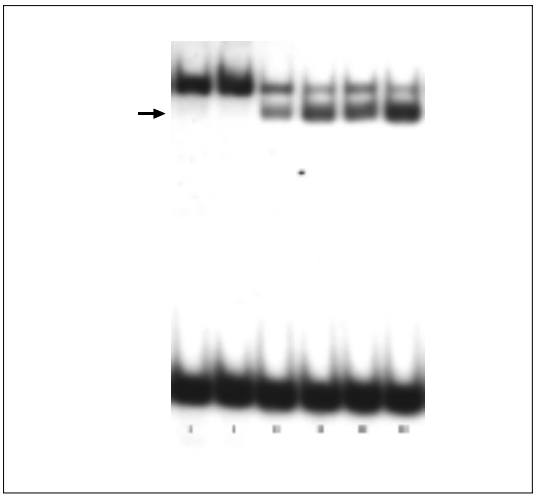

Fig. 3. Activation of AP-1 binding activity in PBMC. Group II had a higher AP-1 activity compared with Group I. Group III had a higher AP-1 activity than Group I, II.

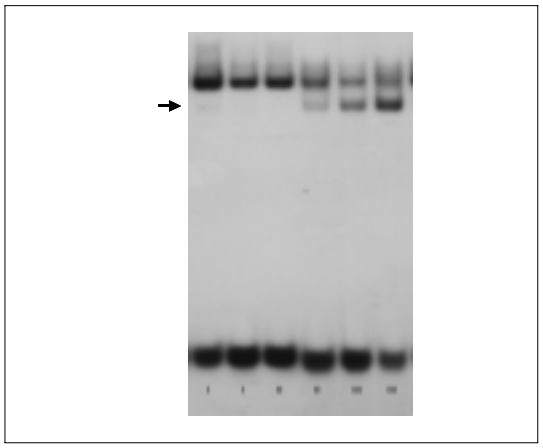

Fig. 2. Activation of NF-κB binding activity in PBMC. Group II had a similar NF-κB activity compared with Group I. On the other hand, Group III had a higher NF-κB activity than Group I, II.

competition assay를 시행한 결과, NF-κB 및 AP-1의 분석에 사용한 각각의 올리고핵산염은 각각 특이적으로 반응함을 알 수 있었다(Fig. 1).

4. 각 군 간의 NF-κB, AP-1의 차이

EMSA로 측정한 산화환원 체계에 관여하는 여러 전사인자들 중에서 NF-κB는 '정상 대조군'과 '정상 IMT 당뇨병 환자군'에서 유의한 차이가 없었고, AP-1은 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 '정상 대조군'에 비해 유의하게 증가되어 있었다. '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비해 NF-κB 및 AP-1이 유의하게 증가되어 있었다(Table 3, Fig. 2, 3).

고 찰

죽상동맥경화증은 인슐린 저항성과 고혈당을 대표로 하는 당뇨병의 대사장애와 고혈압, 이상지질혈증 및 혈액응고 장애 등 관련인자의 복합적 작용에 의하여 발생한다. 당뇨병 환자에서 대혈관 합병증인 죽상동맥경화증은 가장 흔하고 중대한 만성 합병증의 하나로, 이에 의한 관상동맥 질환, 뇌혈관 및 말초혈액 질환 등은 당뇨병 환자들에게서 주된 사망 원인이 되고 있다[11].

최근 고지혈증, 고혈압, 당뇨병 등 죽상동맥경화의 위험인자들이 산화 스트레스 증가를 통하여 세포 내 신호전달체계 및 염증성 반응에 작용함에 따라 동맥경화증을 야기한다는 증거가 제시되어[12,13], 죽상동맥경화증에서 산화 스트레스 및 항산화 체계의 역할을 규명하여 치료와 예방에 적용하고자 하는 시도가 증가하고 있다. 이러한 위험인자들은 혈관 내피세포로부터 반응성 산소족을 만들도록 자극하고, 생성된 반응성 산소족은 죽상동맥경화증 유전자의 발현을 증가시키는 신호로 작용하게 된다. 유도된 유전자의 산물들은 혈관벽 내로 단핵구의 침윤을 증가시키고 부가적인 염증반응을 계속 일으키게 된다.

자유기(free radical)나 반응성 산소족의 혈관 내피세포에서의 역할은 아직 확실하지 않다. 혈관에서의 반응성 산소족 전달체계(ROS signaling system)는 아직 입증되지 않았으나, 내피세포와 혈관 평활근세포에서 NADPH 산화효소가 과산화물 음이온(superoxide anion)의 형성에 중요한 역할을 한다는 보고들이 있다[14-16].

당뇨병에서는 고혈당으로 인해 유리 당이나 단백질에 결합된 당의 자가 산화반응으로 반응성 산소족이 생길 수 있으며[2], 시험관 내에서 고농도의 포도당에 의해 과산화물이 생성됨으로써 저밀도 지단백의 산화가 증가됨이 관찰된 바 있다[3,4]. 당뇨병 환자에서 분리한 저밀도 지단백과 중간 밀도 지단백이 배양된 사람 혈관 내피세포에서 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA와 NF-κB의 활성을 증가시킨다는 보고가[5] 있었고, 당뇨병의 합병증 발생에 중요한 후기 당화생성물(advanced glycation endproduct, AGE)도 세포표면수용체(RAGEs)와의 반응을 통해 NF-κB를 활성화시킨다는 보고들이 있었다[6,7]. 이러한 결과들은 당뇨병 상태에서 나타나는 혈관이상에 내피세포의 산화환원 상태 및 산화환원반응에 민감한 염증성 유전자의 발현 증가가 기여함을 보여주고 있다.

NF-κB는 세포내의 산화환원 상태에 따라 조절되는 유전자 전사요소로서 다양한 병리학적 신호전달에 관여한다. 주로 세포질에 위치해 있는데 반응성 산소화합물과 다양한 병원성 자극들에 의해 활성화되면 핵안으로 전위되어 유전자의 촉진제 및 증강인자요소(enhancer element)에 작용하여 급성염증반응을 비롯한 동맥경화, 당뇨병, 암, AIDS 등과 연관된 유전자의 발현을 조절한다[17,18].

뿐만 아니라 NF-κB는 부신피질호르몬이나[1], 종양괴사인자-α(TNF-α)[20]와 같이 면역기능을 조절하는 물질의 신호 전달에 관여하며 사이토카인 분비 등 면역기능에 직간접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[21]. 그 외에도 급성 염증반응, 사이토카인 생성, nitric oxide synthase (NOS) 발현과도 연관되는 등 다양한 측면에서 면역계를 조절하는 것으로 알려져 있다[22].

AP-1은 원발암유전자 계열(protooncogene family)인 c-jun과 c-fos의 동종이합체(homodimer)나 이종이합체(heterodimer)로 이루어지며, 과산화물(superoxide), H_2O_2, 자외선(ultraviolet light), 감마방사선(γ-radiation), 사이토카인 등의 산화적 환경을 초래하는 물질들에 의해 활성화되는 것이 관찰되었다[23-27]. 혈관에 존재하는 세포에서도 AP-1은 유사하게 반응하여, 내피세포에서는 H_2O_2[28], 저밀도 지단백[2], 산화 저밀도 지단백[30] 등이, 평활근세포에서는 산화 저밀도 지단백[31], H_2O_2[32], 지질과산화물[33] 등이 AP-1의 DNA 결합능력을 증가시킴이 관찰되었다. 또한 H_2O_2에 의한 MCP-1과 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 유전자 발현 시에도 promotor의 AP-1 binding element가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[34,35]. 그러나, 산화 스트레스가 AP-1에 영향을 미치는 정확한 기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없으며 현재 jun 단백질의 인산화가 부분적으로 작용할 것으로 추정하고 있다[12].

본 연구에서 형광분석법으로 측정한 산화 스트레스

의 지표인 기저 반응성 산소족 생산량뿐만 아니라 H_2O_2 및 PKC 활성제인 PMA로 자극하여 증가시킨 반응성 산소족 생산량도 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비하여 유의하게 높게 관찰되어, 당뇨병 환자에서 산화환원체계의 이상이 죽상동맥경화증에 영향을 미침을 짐작할 수 있었다. 즉, H_2O_2로 자극한 경우에 당뇨병성 죽상동맥경화증에서 유의하게 높게 나타난 것은 산화 스트레스에 대한 청소제 체계(scavenger system)의 이상이 당뇨병성 죽상동맥경화증의 하나의 병인으로서 작용할 가능성을 시사하고, PMA로 처리하였을 때 자극치의 유의한 차이는 PKC에 의해 활성화되는 신호전달체계가 당뇨병성 죽상동맥경화증의 병인으로 작용할 가능성을 시사한다고 사료된다.

또한 산화환원체계에 관여하는 전사인자들을 EMSA로 측정한 결과 '정상 IMT 당뇨병 환자군'에서 NF-κB는 '정상 대조군'과 유의한 차이가 없었고, AP-1은 '정상 대조군'에 비해 유의하게 증가되어 있었다. 한편, '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서는 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비해 NF-κB 및 AP-1이 모두 유의하게 증가되어 있었다. 그러므로 본 연구의 연구를 종합하면 당뇨병환자에서 증가한 반응성 산소족이 AP-1과 NF-κB의 활성화를 증가시키며, 이러한 과정을 통해 당뇨병성 죽상동맥경화증의 발생에 기여할 것으로 사료된다.

이상의 결과로, 당뇨병 환자의 PBMC에서 산화 스트레스가 당뇨병성 죽상동맥경화증에 관계하며, NF-κB 및 AP-1과 연관성이 있음이 알 수 있었다. 따라서 향후 당뇨병성 죽상동맥경화증을 억제 및 예방하고자 하는 임상 시도에 산화 스트레스의 역할을 신중히 고려하여야 할 것이다.

요 약

연구배경: 당뇨병 환자와 정상 대조군의 경동맥 내중막두께(intima-media thickness, IMT)를 측정하고 NF-κB 및 AP-1의 활성도의 차이를 평가하고, 대상자들의 임상 및 생화학적 특징과의 관계를 분석함으로써 산화스트레스에 의해 유발되는 NF-κB 및 AP-1의 활성화와 당뇨병 환자에의 죽상동맥경화증과의 관계를 알아보고자 하였다.

방법: 제2형 당뇨병 환자 66명(남자 28명, 여자 38명, 평균나이 56.1±13.4세, 평균 이환기간 115.7±83.4개월)을 경동맥 내중막두께 증가 유무에 따라 두 군으로 나누고, 정상 대조군 57명을 선정하여 임상적 및 생화학적 특징 조사를 하였고 이들로부터 세포내 산화물질의 활성도를 측정하였고, NF-κB 및 AP-1의 활성도를 측정하였다.

결과: 세 군간의 연령, 성별에 유의한 차이는 없었으며 체질량지수에서도 각 군간의 차이가 없었다. 기저치 및 H_2O_2, PKC 자극제인 PMA로 처리한 반응성 산소족의 활성도는 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비하여 높게 관찰되었다. 또한 '증가된 IMT 당뇨병 환자군'에서 '정상 IMT 당뇨병 환자군' 및 '정상 대조군'에 비해 NF-κB 및 AP-1이 증가되어 있었다.

결론: 당뇨병 환자에서 산화스트레스가 당뇨병성 죽상동맥경화증에 관계하며, NF-κB 및 AP-1과 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 당뇨병성 죽상동맥경화증에서 고혈당에 의해 증가된 반응성 산소족의 생성 및 제거하는 기전의 이상이 당뇨병성 죽상동맥경화증을 초래하는 하나의 병인일 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. 김정순: 우리나라의 사망원인의 변천과 현황. 대한의학협회지 *36:271-284, 1993*
2. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: *Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. Circ Res 83:952-959, 1998*
3. Baynes JW: *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40:405-412, 1991*
4. Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, Kostner GM: *High D-glucose-induced change in endothelial Ca2+ /EDRF signaling are due to genera-*

tion of superoxide anions. Diabetes 45:1386-1395, 1996

5. Maziere C, Auclair M, Rose-Robert F, Leflon P, Maziere JC: *Glucose-enriched medium enhances cell-mediated low density lipoprotein peroxidation. FEBS Lett 363:277-279, 1995*
6. Pieper GM, Riaz-ul-Haq: *Activation of nuclear factor-B in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. J Cardiovasc Pharmacol 30:528-532, 1997*
7. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: *Enhanced cellular oxidative stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding protein. J Biol Chem 269:9889-9897, 1994*
8. Geroulakos G, O'Gorman DJ, Kalodiki E, Sheridan DJ, Nicolaides AN: *The carotid intima-media thickness as a marker of the presence of severe symptomatic coronary artery disease. Eur Heart J 15:781-785, 1994*
9. 조유리, 김대중, 김하동, 최성희, 김수경, 김형진, 안철우, 차봉수, 임승길, 김경래, 이현철, 허갑범: 한국인의 경동맥 내중막 두께 정상치와 죽상경화증 위험인자와의 상관관계. 대한내과학회지 *64(3):275-283, 2003*
10. Grobbee DE, Bots ML: *Carotid intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. J Int Med 236:567-573, 1994*
11. Burchfiel CM, Reed DM, Marcus EB, Strong JP, Hayashi T: *Association of diabetes mellitus with coronary atherosclerosis and myocardial lesions: an autopsy study from the Honolulu Heart Program. Am J Epidemiol 137:1328-1340, 1993*
12. Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB: *H_2O_2 and tumor necrosis factor-alpha activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. J Biol Chem 270:18966-18974, 1995*
13. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: *Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 320:915-920, 1989*
14. Alexander RW: *Theodore Cooper Memorial Lecture.: Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. Hypertension 125:155-161, 1995*
15. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS: *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. Am J Physiol 266:H2568-H2572, 1994*
16. Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM: *Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. Cardiovasc Res 38:256-262, 1998*
17. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L: *Redox regulation of NF-kappa B activation. Free Radic Biol Med 22:1115-1126, 1997*
18. Thanos D, Maniatis T: *NF-kappa B: a lesson in family values. Cell 80:529-532, 1995*
19. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr: *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol 15:943-953, 1995*
20. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D: *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1 Nature 385:540-544, 1997*
21. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M: *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science 270:*

286-290, 1995

22. Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA: *Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. Biochem Pharmacol 50:735-741, 1995*
23. Sun Y, Oberley LW: *Redox regulation of transcriptional activators. Free Radic Biol Med 21:335-348, 1996*
24. Amstad P, Crawford D, Muehlematter D, Zbinden I, Larsson R, Cerutti P: *Oxidants stress induces the proto-oncogenes, C-fos and C-myc in mouse epidermal cells. Bull Cancer 77:501-502, 1990*
25. Shibanuma M, Kuroki T, Nose K: *Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. Oncogene 5:1025-1032, 1990*
26. Devary Y, Gottilieb RA, Lau LF, Karin M: *Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. Mol Cell Biol 11:2804-2811, 1991*
27. Nose K, Shibanuma M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T: *Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. Eur J Biochem 201:99-106, 1991*
28. Collart FR, Horio M, Huberman E: *Heterogeneity in c-jun gene expression in normal and malignant cells exposed to either ionizing radiation or hydrogen peroxide. Radiat Res 142:188-196, 1995*
29. Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M: *Involvement of the transcription factor NF-kappa B in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. Mol Cell Biol 16:4231-4239, 1996*
30. Lin JH, Zhu Y, Liao HL, Kobari Y, Groszek L, Stemerman MB: *Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. Atherosclerosis 127:185-194, 1996*
31. Maziere C, Kjavaheri-Mergny M, Frye-Fressart V, Kelattre J, Maziere JC: *Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. FEBS Lett 409:351-356, 1997*
32. Ares MP, Kallin B, Eriksson P, Nilsson J: *Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-B in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1584-1590, 1995*
33. Rao GN, Berk BC: *Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and protooncogene expression. Circ Res 70:593-599,1992*
34. Ruef J, Rao GN, Li F, Bode C, Patterson C, Bhatnager A, Runge MS: *Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. Circulation 97:1071-1078, 1998*
35. Wung BS, Cheng JJ, Hsieh HJ, Shyy YJ, Wang DL: *Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. Circ Res 81:1-7, 1997*