

산화스트레스에 의한 당뇨병성 혈관합병증의 발생기전

부산대학교 의과대학 내과학교실

김보현 · 손석만

Mechanism of Developing Diabetic Vascular Complication by Oxidative Stress

Bo Hyun Kim, Seok Man Son

Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine

ABSTRACT

Macrovascular and microvascular diseases are currently the principal causes of morbidity and mortality in the patients with diabetes mellitus. Oxidative stress has been postulated to be a major contributor to the pathogenesis of these events. There is considerable evidence that many biochemical pathways that are adversely affected by hyperglycemia are associated with the generation of reactive oxygen species, and this ultimately leads to increased oxidative stress in a variety of tissues. In the absence of appropriate compensation by the endogenous antioxidant defense network, increased oxidative stress leads to the activation of stress-sensitive intracellular signaling pathways and the formation of gene products that cause cellular damage and contribute to the late complications of diabetes. Hyperglycemia increases oxidant production by multiple pathways rather than by a single dominant pathway. Glucose can undergo nonenzymatic reactions to form gluco-oxidants and glycated products, which can be oxidants. Metabolism of excessive intracellular glucose can occur by several processes such as aldose reductase, mitochondrial oxidative phosphorylation, activation of NAD(P)H oxidases, and the alteration of the NADPH/NADP ratios. Reactive oxygen species participate in vascular smooth muscle cell growth and migration, modulation of endothelial function, including abnormal endothelium-dependent relaxation and the expression of a proinflammatory phenotype, and modification of the extracellular matrix. All of these events contribute to the development of diabetic microvascular and macrovascular complications, suggesting that the sources of reactive oxygen species and the signaling pathways that they modify may represent important therapeutic targets. (J Kor Endocrinol Soc 21:448~459, 2006)

Key Words: Diabetic complication, Diabetes, NADPH/NADP, Oxidative stress

서론

당뇨병 환자에서 대혈관합병증과 미세혈관합병증으로 인한 이환율 및 사망률이 높은 것으로 알려져 있다. 당뇨병 환자의 죽상동맥경화증은 초기에 발생하고 더 심한 병변의 형태로 나타난다. 대규모 무작위 전향적 임상연구에서 장기간의 혈당조절이 당뇨병성 혈관합병증 발생의 중요한 예측인자라고 밝혀졌다[1,2]. 이러한 혈관합병증의 발생에 산화스트레스가 중요한 역할을 하는 것으로 최근 보고되고 있다[3,4]. 고혈당은 여러 생화학적 신호전달 경로를 통해 ROS

(reactive oxygen species)의 생성을 야기시키고, 이로 인해 여러 조직에서 산화스트레스가 증가된다는 보고들이 많다[4]. 생체 내에서 적절한 항산화 방어기전이 없게 되면 증가된 산화스트레스에 의해 산화스트레스 민감성 세포 내 신호전달계가 활성화되고, 세포손상을 일으키는 유전자 산물들을 생성하게 되어 당뇨병성 혈관합병증이 발생된다[3,5].

여기서는 당뇨병이 어떻게 산화스트레스를 유발하고 산화스트레스가 진행된 죽상동맥경화증과 같은 혈관합병증을 야기하는가에 대해 살펴보고, 혈관합병증의 발생과 진행을 예방할 수 있는 가능성 있는 치료에 대해 살펴보고자 한다.

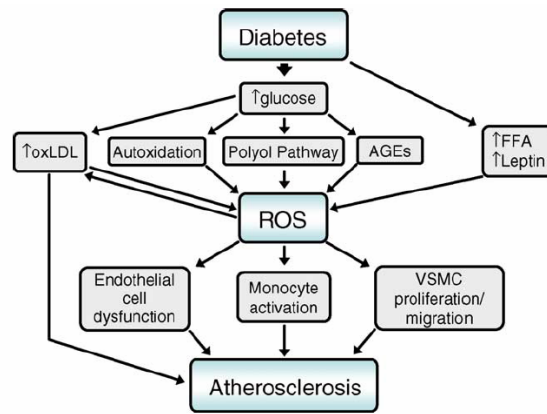


Fig. 1. Overview of the sources of ROS in diabetes and their links to atherosclerosis. oxLDL, oxidized LDL; FFA, free fatty acid; AGEs, advanced glycation end-products; VSMC, vascular smooth muscle cells; ROS, reactive oxygen species.

당뇨병에서 ROS 생성 기전

제2형 당뇨병은 간에서 포도당 신생의 증가, 인슐린저항성과 인슐린 분비 감소를 특징으로 하는 질환이다. 인슐린저항성이 증가하거나 인슐린 분비가 감소하면 고혈당이 나타나고 이 중 한쪽 혹은 양쪽 모두 악화되면 고혈당이 더욱 악화된다. 고혈당과 혈관합병증 발생의 직접적인 관계에 대해서는 아직 논란의 여지가 있지만, 여러 연구에서 고혈당과 이에 의한 대사산물들에 의해 당뇨병성 혈관합병증이 발생하는 것으로 알려져 있다[4]. 고혈당이 혈관세포에 미치는 영향에 대해서는 여러 가지 병태생리학적 혹은 생화학적 기전들이 제시되고 있다. 산화스트레스는 안정상태에서 ROS의 생성이 증가되어 있는 상태로 정의하며, 이는 유리 라디칼 생성이 증가하거나 항산화 방어기전이 저하된 경우에 발생한다[6]. 많은 연구에서 당뇨병 환자에서는 유리 라디칼에 의한 손상의 순환 표지자가 증가되고 항산화 방어기전이 감소한다는 것을 보여 주었다[7,8]. 고혈당은 포도당 자가산화, 최종당화산물(advanced glycation end products)의 생성과 폴리올 경로(polyol pathway)의 활성화 등 여러 가지 기전을 통해 산화스트레스를 유발한다. 그 외에 당뇨병 환자에서 증가되는 유리지방산과 렙틴과 같은 순환 인자들도 ROS 생성에 기여한다.

1. 포도당 자가산화(Glucose autoxidation)

세포 내 고혈당에 의해 증가된 포도당 대사는 adenosine triphosphate를 생성하기 위한 전자 전달사슬(electron transport chain)에 이용되는 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)와 flavin adenosine dinucleotide의 과다생성을 야기한다[9]. NADH가 과다할 때 미토콘드리아

양성자 차이(proton gradient)가 증가되고 전자가 산소로 전달되어 superoxide 음이온을 생성한다. 전자 전달사슬에 의한 superoxide 음이온의 생성은 complex I의 NADH dehydrogenase와 ubiquinone과 complex III사이의 경계면에서 일어난다. 미토콘드리아에 의해 유도된 superoxide 음이온은 diacylglycerol (DAG) 합성의 증가와 protein kinase C (PKC) 활성화를 야기시킨다[9]. 그러나 다른 연구자들은 고혈당이 미토콘드리아의 대사와 무관하게 DAG 합성을 유도한다고 보고했다[10].

2. 최종당화산물(Advanced glycation end products, AGE)

최근의 연구에서 최종당화산물의 형성이 당뇨병성 혈관합병증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[11]. 제2형 당뇨병 환자의 혈액 내 최종당화산물의 농도와 심혈관계질환의 유무 및 중증도와 연관이 뚜렷하고 여러 동물 모델 연구에서도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다[11]. 당뇨병성 동맥경화증의 마우스 모델에서 최종당화산물을 제거하는 약물을 투여하면 혈액 내와 조직에서의 최종당화산물 농도가 감소하고 동맥경화증의 진행도 비당뇨병 모델과 유사하게 억제되는 것을 관찰하였다[12]. 최종당화산물의 형성은 단백질의 유리 아미노기와 다른 분자에 환원당의 케톤 혹은 알데히드기가 비효소적 공유결합을 함으로써 시작된다. 최종당화산물은 세포의 기질과 순환 지단백을 변형함으로써 죽상경화증 발생에 관여할 뿐 아니라 많은 혈관 세포에 존재하는 AGE 수용체(receptor for AGE, RAGE)와 결합하고 활성화시켜 죽상동맥경화증 발생에 기여한다고 제안되고 있다. 이는 최종당화산물이 ROS 생성을 유도하는 수용체 매개성 효과에 의해 일어난다[12]. RAGE의 자극은 NAD(P)H oxidase를 통하여 ROS 생성을

야기하고 산화-환원 민감성(redox-sensitive) 전사인자의 활성화와 염증 매개체의 발현을 야기한다[12,13]. 당뇨병성 혈관합병증의 진행을 예방하거나 지연시키기 위해서는 고혈당이 혈관에 미치는 세포학적 혹은 분자생물학적 기전을 이해하는 것이 필요하다.

3. 폴리올 경로(Polyol pathway)

폴리올 경로의 알도스 환원효소와 술비톨 탈수소 효소가 ROS 생성에 관여한다. 알도스 환원 효소는 포도당을 술비톨로 환원시키기 위해 NADPH를 이용한다. 정상적인 환경에서 알도스 환원효소에 의한 술비톨 생성은 부차 반응(minor reaction)이다. 그러나 고혈당 조건에서는 포도당의 약 30~50%까지 이 경로에 의해 대사된다[14]. 이러한 과정이 발생할 때 NADPH의 가용성이 감소하고 차례로 글루타치온(glutathione) 재생과 산화질소 생성효소(NO synthase)를 감소시켜 산화스트레스를 발생시킨다. 술비톨 탈수소 효소는 술비톨을 과당으로 산화 시키고 동시에 NADH를 생성한다. 증가된 NADH는 superoxide 음이온 생성을 위해 NAD(P)H에 의해 사용되고 미토콘드리아 superoxide 음이온 생성을 유도할 수 있다[14].

4. 당뇨병에서 산화스트레스의 다른 원인

당뇨병 환자에서 유리지방산 혹은 비에스테르화 지방산은 증가한다[15]. 과다한 유리지방산은 구연산회로(citric acid cycle)로 들어가서 과다한 NADH를 만들기 위해 acetyl-CoA를 증가시킨다. 인간에서 유리지방산의 급격한 주입은 지질 과산화의 표지자인 isoprostanes의 증가를 야기시킨다[15].

렙틴은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 중추신경계에 작용하여 음식 섭취를 감소시킨다. 또한 내피세포, 혈관 평활근세포, 단핵세포와 대식세포에도 영향을 미친다[16]. 렙틴의 혈장 농도는 제 2형 당뇨병에서 증가되어 있고, 심

혈관질환과 연관이 있다[16]. 렙틴으로 배양한 내피세포는 ROS 생성을 증가시키지만, 그 기전은 아직 밝혀져 있지 않다[16,17].

당뇨병에서 산화스트레스의 증가

비록 당뇨병에서 항산화 상태에 대해서 논쟁이 있지만, 몇몇 연구에서 혈액 내 superoxide dismutase, catalase, 글루타치온과 ascorbic acid의 농도가 당뇨병 동물모델과 당뇨병 환자에서 떨어져 있다고 보고하였다[4~6]. 당뇨병에서는 산화된 DNA, 단백질과 지질이 증가되어 있는 것으로 보아 여러 조직에서 산화스트레스가 증가되어 있다. 산화스트레스는 이런 분자들의 기능을 손상시킬 뿐만 아니라, PKC, nuclear factor kappa B (NF-κB)와 JNK stress-associated kinases를 활성화시키는 일련의 세포반응을 일으킨다[18,19]. 이들 조절분자들의 부적절한 활성화는 세포 기능에 이상을 야기시켜 당뇨병성 혈관합병증을 발생시킨다. 하지만, 고혈당이 어떻게 산화스트레스를 증가시키지는 명백하지 않지만, 당뇨병에서 ROS의 생성이 증가되고 세포 내 항산화 방어기전의 저하로 인해 산화스트레스가 증가되는 것으로 생각된다. 고혈당은 하나의 주된 경로를 통하기보다는 다양한 경로를 통해 산화스트레스를 증가시킨다. 포도당은 비효소반응을 통해 산화 물질인 gluco-oxidants와 당화산물(glycated product)을 형성한다[5,6,8]. 과다한 세포 내 포도당의 대사는 알도스 환원효소, 미토콘드리아 산화성 인산화 반응(mitochondrial oxidative phosphorylation), NAD(P)H oxidase의 활성화, 그리고 NADPH/NADP 비율의 변화를 야기시킨다[5]. 이런 가능성들 중에 최근 연구들은 미토콘드리아의 대사와 NAD(P)H oxidase의 활성화에 대하여 초점을 맞추고 있다[3,5,10]. 포도당에 의해 생성되는 대부분의 oxidant들은 미토콘드리아의 전자전달계에 의해 superoxide 음이온의 과잉생성으로 인해 만들어지는 것으로 제안되었다

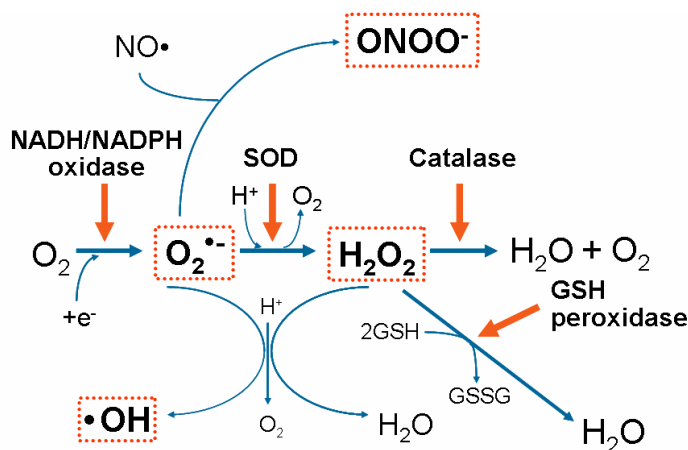


Fig. 2. The generation and removal pathways of ROS in human body.

[5]. 포도당에 의해 DAG 생성이 증가하고, 이는 PKC를 통해 NAD(P)H oxidase를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

산화 반응에 의해 형성된 ROS는 superoxide 음이온, hydroxyl radical, hydrogen peroxide이다. 이들 물질들은 cross-linking과 fragmentation을 통해 지질과 단백질을 파괴시킨다. 조절이 불량한 당뇨병 환자에서 항산화효소인 superoxide dismutase의 농도와 비타민 E, 알파-리포산(alpha-lipoic acid)의 농도가 감소되어 있다[6]. 비록 최근에 고혈당에 의한 산화스트레스가 조직손상을 일으킨다고 알려졌지만, 아직까지는 이런 조직의 손상을 예방하거나 진행을 지연시키는 치료적 방법에는 한계가 있다[18,20]. 당뇨병 동물모델과 당뇨병 환자에서 isoprostane, 8-hydroxydeoxyguanosine과 lipid peroxides 농도가 상승되어 있다[20,21]. 포도당 이외에 당뇨병과 인슐린저항성 상태에서 유리지방산이 증가되어 있는데, 이는 미토콘드리아의 산화성 인산화 반응을 통해 산화스트레스를 증가시킬 수 있다[5,6]. 따라서 당뇨병과 인슐린저항성 상태에서 포도당, 유리지방산, 및 최종 당화산물과 같은 여러 물질에 의해 산화스트레스가 증가될 수 있다.

산화스트레스와 대혈관합병증의 발생기전

당뇨병 환자에서 혈관합병증의 발생에 성별, 신체활동, 흡연, 영양상태, 혈당조절 및 인슐린 상태 등과 같은 다양한 인자들이 관여한다. 당뇨병 환자에서 혈당 조절이 불량한 경우 혈관합병증이 발생하는데 대해 여러 가지 가능한 기전들이 거론되고 있다. 산화스트레스는 LDL 산화, 내피세포 기능이상, 혈관 평활근세포의 증식과 이주, 혈액응고 기전의 이상을 야기하며 당뇨병 환자에서 혈관합병증을 야기시키는 중요한 인자들이다.

1. 산화저밀도지단백(Oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)

고혈당은 지단백의 구성을 변화시켜 동맥경화증을 유발할 수 있으며[22], LDL의 비효소적인 당화반응을 증가시켜 수용체를 매개로 하는 LDL의 대사를 억제시킨다. 또한, 당뇨병 환자들에서 LDL은 비당뇨병 환자에 비해 비효소적인 당화반응이 증가되어 있으며, 산화가 잘 되어 oxLDL이 증가되는 것으로 알려져 있다[22]. 다른 지단백들과 달리, oxLDL은 대식세포와 혈관 평활근세포를 거품세포(foam

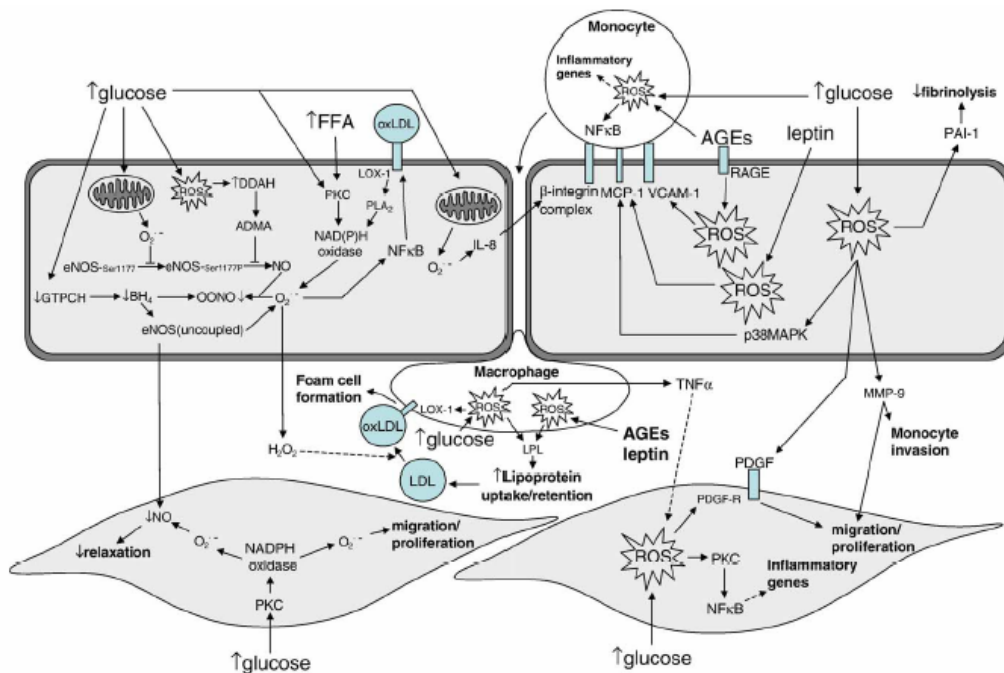


Fig. 3. Consequences of oxidative stress-induced signaling mechanisms in diabetes. ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; NF-κB, nuclear factor-κB; FFA, free fatty acids; AGEs, advanced glycation end-products; RAGE, receptor for AGE; PDGF, platelet-derived growth factor; PDGF-R, PDGF receptor; ADMA, asymmetric dimethyl arginine; DDAH, dimethylarginine dimethylaminohydrolase; PKC, protein kinase C; PLA₂, phospholipase A₂ BH₄, tetrahydrobiopterin; GTPCH, GTP-cyclohydrolase I; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; p38MAPK, p38 mitogen-activated kinase; IL-8, interleukin-8; oxLDL, oxidized LDL; LOX-1, lectin-like oxLDL receptor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; VCAM-1, vascular cellular adhesion molecule-1; TNFα, tumor necrosis factor-α.

cell)로 변형시킨다. 죽상경화증에서 oxLDL의 역할은 혈관 세포 손상과 연관된 세포실험 연구에서 대부분 제안되었다. 생체 내에서는 oxLDL에 대한 연구는 이질성(heterogeneity) 때문에 복잡하며, LDL이 산화적 변이를 하는 장소도 알려져 있지 않다[23]. 그러나 oxLDL은 생체 내에서 만들어져 죽상경화형성(atherogenesis)에 기여한다는 것에 대해서는 대체로 동의한다. 당뇨병에서 인슐린 치료는 LDL 산화를 억제한다[24]. 혈관벽에서 지단백의 진입과 잔류는 죽상경화형성에서 잘 알려진 단계이다[22,24]. 당뇨병에서 혈관구조는 ROS를 생성하고 당뇨병 환자에서 LDL은 산화적 환경에 존재한다는 것 때문에 쉽게 산화된다. 또한 당뇨병에서는 LDL의 혈관을 통한 이동이 증가되어 있다. OxLDL 자체로 인지질분해효소 A2 신호 기전(phospholipase A2 signaling mechanism)을 통한 NADPH oxidase의 활성화에 의해 내피 세포에서 산화스트레스를 생성한다[25]. 인간의 대동맥 내피 세포에서 oxLDL 신호경로의 효과는 수용체의 상향 조절, lectin-like oxLDL receptor (LOX-1)을 통해 증가될 수 있다. 이는 PKC, ROS와 NF- κ B에 의존된 기전에 의해 일어나는 것으로 여겨진다[26]. 또한 산화스트레스에 의해 유도되는 LOX-1 활성화는 고혈당으로 처리한 대식세포에서 일어나고 거품세포 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[26,27].

2. 혈관 내피세포 기능이상

혈관 내피세포는 혈관의 기능과 구조를 일정하게 조절한다. 정상 내피세포에서는 산화질소(nitric oxide, NO)를 생성하고 유리지방산의 혈관 투과성을 유지한다. 고혈당은 또한 트롬빈 형성, 피브리노 분해, 혈소판과 혈관 내피세포의 기능 이상을 야기시켜 혈액응고는 증가하고 혈전 용해는 억제된다[28]. 혈전증은 심근경색의 병인에 가장 중요한 요소 중의 하나로 생각되고 또한 동맥경화증의 발생을 촉진한다. 내피 세포기능의 변화는 죽상경화형성에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. 여기에는 내피세포 의존성 혈관 이완의 소실, vascular cell adhesion molecule-1과 intercellular cell adhesion molecule-1과 같은 세포 부착 분자(cellular adhesion molecule) 발현의 증가, 순환 지단백(특히 LDL)의 투과성 증가와 저류 증가를 포함한다[22,24]. 여러 보고들에서 고혈당에 의한 내피세포 의존성 혈관 이완 반응의 이상은 NO의 생성저하나 아니면 superoxide 음이온에 의한 NO의 활성이 저하되기 때문에 발생한다[29]. 그러나 고혈당은 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 증가시켜 NO의 생성을 증가시킬 수 있다[30]. Superoxide 음이온의 생성이 증가된 상태에서는 NO는 강한 산화력을 가진 peroxynitrite로 변화된다[30]. 이 물질은 단백질의 손상에 영향을 미칠 뿐만 아니라, DNA 단일가닥을 파괴시키며, 이는 핵효소인 poly (ADP-ribose) polymerase의 활성을 자극한다[29,30]. 내피세포에서 산화스트레스 증가의 주요 원인

은 NAD(P)H oxidase와 uncoupled eNOS에 의해 증가된 superoxide 음이온 생성이다. 고혈당, 최종당화산물, 유리지방산, oxLDL 등은 내피세포 NAD(P)H oxidase 활성을 증가시킨다[10,25,31]. 고혈당과 유리지방산에 의한 NAD(P)H oxidase의 활성화는 PKC에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다[10,31]. 당뇨병 환자에서 분리된 혈관조직에서 superoxide 음이온 생성이 증가되어 있고, 이는 NAD(P)H oxidase 억제제인 diphenyleneiodinium에 의해 억제되며 p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}와 같은 많은 NAD(P)H oxidase 소단위의 발현이 증가되어 당뇨병에서 NAD(P)H oxidase가 더 활성화되어 있다는 것을 암시한다[25]. 과다한 superoxide 음이온 자체로 산화스트레스를 증가시킬 뿐만 아니라 NO와 반응해서 peroxynitrite를 형성하고[31], 이것은 차례로 tetrahydrobiopterin (BH4)을 산화시킬 수 있고, eNOS에 대한 이용률을 감소시킨다. BH4가 감소되면 eNOS는 uncoupled되고 NOS보다 superoxide 음이온을 생성하기 위해 L-arginine 대신 분자 산소에 전자를 전달한다[32]. 당뇨병 환자의 혈관에서 NOS 억제제인 NG-nitro-L-arginine methyl ester와 같이 배양할 때 superoxide 음이온 생성이 감소된다는 연구는 혈관에서 uncoupled eNOS의 존재를 뒷받침하는 것이다[25]. BH4 신생합성의 속도제한 효소인 GTP-cyclohydrolase I (GTPCH)의 발현은 당뇨병 쥐에서 감소되어 있다[33]. Streptozotocin (STZ)으로 처리한 유전자 삽입 쥐모델에서 GTPCH를 과발현시키면 내피세포 기능을 유지시킬 수 있다[33]. 임상 연구들에서 당뇨병 환자에게 BH4를 보충하면 내피세포 의존성 혈관이완을 개선시키고 이는 uncoupled eNOS가 당뇨병성 내피세포 기능이상에서 중요한 역할을 한다는 것을 증명하는 것이다[34].

당뇨병에 의해 야기된 산화스트레스는 NOS의 생체 이용률을 감소시키고 내피세포 의존성 혈관이완의 장애를 야기한다. 고혈당은 Akt/PKB 활성화 위치인 eNOS에서 serine 1177의 O-linked N-acetyl glucosamine 변화를 야기한다. 이 변화는 그것의 인산화를 예방하고 고혈당에 의해 유발된 미토콘드리아 superoxide 음이온 생성과 hexosamine 경로의 활성화에 의해 야기된 것이다[35]. 고혈당에 의해 생성된 산화스트레스는 또한 Akt/PKB 활성도를 억제할 수도 있다. 산화스트레스가 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 serine 인산화를 유도하는 것이 증명되었다[36]. IRS-1의 감소는 phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway의 활성화의 장애를 야기시킨다. 또한 고혈당은 eNOS의 억제제인 비대칭성 dimethylarginine (ADMA)의 축적을 야기시킨다. STZ 유발 당뇨 쥐에서 ADMA를 대사시키는 효소인 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)의 활성도가 감소되고 결과적으로 ADMA의 증가를 가져온다. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase (PEG-SOD)가 고혈당 유발성 DDAH 불활성의 효과를 역전

시킬 수 있는 것처럼 감소된 DDAH 활성도는 산화스트레스에 의해 야기되는 것으로 보인다[37]. 이러한 결과들은 당뇨병 환자에서 산화스트레스가 다양한 기전을 통해 eNOS 활성을 억제시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

포도당, 유리지방산, 렙틴 농도의 증가와 최종당화산물은 내피세포에서 ROS에 의해 매개되는 많은 proatherogenic consequences를 일으킨다. 고혈당은 p38 mitogen-activated kinase (MAPK)을 통한 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 발현의 증가와 미토콘드리아로부터 유래된 interleukin-8과 ROS에 의한 h1-integrin의 활성화를 통해 단핵구 부착을 증가시킬 수 있다[38]. 단핵구 침윤과 혈관 평활근세포의 이주는 ROS에 의해 matrix metalloproteinase (MMP)-9의 발현이 증가되어서 발생된다[39]. 또한 고농도 포도당에 의한 ROS 생성은 평활근세포 분열 촉진인자 (mitogen)로 알려진 platelet-derived growth factor (PDGF)와 plasminogen activator-1의 분비를 증가시킨다[40]. 렙틴에 의해 생성된 ROS는 전사인자인 NF- κ B와 activated protein-1 (AP-1)[17]을 활성화시킬 뿐만 아니라 MCP-1 발현도 증가시킨다[18,41]. 유리지방산에 의한 ROS 생성도 역시 NF- κ B 결함을 증가시킨다[41]. 최종당화산물은 vascular cellular adhesion molecule (VCAM)-1 발현과 ROS를 통한 혈관 투과성의 증가를 가져온다[42]. 당뇨병 환자에서 보이는 수용성 부착분자(soluble adhesion molecules)의 증가는 항산화제를 투여하면 감소시킬 수 있다는 것이 생체 연구에서 증명되었다[43]. 건강한 지원자에서 유리지방산에 의한 내피세포 기능이상은 비타민 C를 투여하면 개선되는 것으로 밝혀졌으며[44], 이러한 결과들은 죽상경화증 발생에 내피세포의 다양한 면에서 산화스트레스가 중요한 역할을 한다는 것을 증명해주는 것이다. 고혈당과 이로 인해 증가된 산화스트레스가 DNA의 손상을 야기시킨다는 증거는 최근 연구에서 STZ 유발 당뇨병 쥐모델의 혈액과 조직에서 모두 8-hydroxyguanine과 8-hydroxydeoxy guanosine이 증가되어 있다는 것이다[45]. 이들의 농도는 고혈당을 조절하거나 probucol과 비타민 E에 의해서 감소될 수 있다. 고농도의 포도당 농도는 대혈관의 내피세포 재생을 지연시킨다. Superoxide dismutase, catalase와 환원된 글루타치온은 사람에서 고혈당에 의한 내피세포의 재생이 저하되는 것을 예방할 수 있고, 이는 당뇨병성 혈관합병증의 발생에 산화스트레스가 중요하다는 증거가 된다[30,31].

3. 단핵구와 대식세포(Monocytes and macrophages)

죽상경화성 플라크(plaques) 내로 단핵구의 이주와 축적은 잘 알려져 있다. 단핵구의 활성화는 플라크의 진행에 기여하는 다양한 사이토카인을 만들어 낸다. 혈관 내에서 단핵구는 대식세포로 변하고 염증 매개 인자들을 분비하며 ROS를 생성하는 거품세포가 되기 위해 변형된 지단백을 탐식한

다[23]. 고혈당이 단핵구와 대식세포에서 산화스트레스를 야기하고 결과적으로 proatherogenic agents의 생성을 증가시킨다는 증거들이 있다. 건강한 지원자의 단핵구에서 한번의 포도당 경구 투여에도 ROS 생성이 증가된다[46]. 또한, 당뇨병 환자에서 분리된 단핵구에서는 p47^{phox}-containing NAD(P)H oxidase의 PKC 의존적 활성화를 통해 superoxide 음이온의 생성이 증가되어 있다[46]. 잘 조절되지 않는 제 1형 당뇨병 환자의 단핵구에서는 항산화제인 알파-리포산으로 억제시킬 수 있는 NF- κ B 활성화가 증가되어 있다[47]. 장기간 고혈당에 노출되었을 때 단핵구는 NF- κ B의 ROS 의존적 활성화에 의해 tumor necrosis factor (TNF)- α 를 분비한다[48]. 또한 TNF- α 분비는 p38 MAPK와 JNK-1의 활성을 포함한다[48]. 최종당화산물은 단핵구와 대식세포 모두에서 산화스트레스를 야기시킨다. RAW 대식세포에서 당화알부민(glycated albumin)은 세포 외 신호조절 활성화소 인산화(extracellular signal-regulated kinase phosphorylation)를 야기하여 ROS 생성과 NF- κ B 활성화를 야기시킨다[47]. 한편 고혈당, 렙틴과 RAGE를 매개한 최종당화산물은 대식세포에 의해 분비되는 proatherogenic ligand인 lipoprotein lipase (LPL)을 합성하기 위해 인간 대식세포를 활성화한다. LPL 유도는 PKC, ROS, transcription factor AP-1을 필요로 한다[49].

4. 혈관평활근세포

혈관평활근세포의 증식과 이주는 죽상경화증과 재협착에 중요한 역할을 하는 것으로 제안되고 있다. 제2형 당뇨병 환자에서 혈관의 내재성 NO 제공인자에 대한 이완반응이 저하되어 있는데 이는 혈관평활근세포의 기본적인 기능이상을 암시한다[30]. 고혈당은 혈관평활근세포의 증식을 야기시키고, 동맥경화 병변으로의 이동을 증가시켜 세포 외 기질의 생성을 촉진시킨다[50]. 고혈당은 NAD(P)H oxidase 활성화를 통해 혈관평활근세포에서 superoxide 음이온의 생성을 증가시킨다[30,31]. 이렇게 증가된 superoxide 음이온은 내피세포에서 NOS와 잠재적으로 반응할 수 있고 혈관평활근세포의 이완에 대한 효과를 억제시킨다. 혈관평활근세포에서 NOS의 형성은 고혈당이 PKC와 칼슘 의존적 기전을 통해 iNOS 활성을 억제할 수 있기 때문에 그 자체만으로도 영향을 받을 수 있다[31]. 당뇨병에서 혈관평활근세포에서 생성되는 산화스트레스는 수축성 표현형(phenotype)에서 증식성 표현형으로 변화시킬 수 있고, 나아가 혈관 이완을 억제하고 병변 형성을 촉진시킨다. 혈관평활근세포를 고혈당에 노출하면 산화스트레스가 증가되고 세포증식을 야기시킨다. 배양된 대동맥 평활근세포에서 고혈당은 PKC의 활성화와 NAD(P)H oxidase를 통해 ROS 생성을 야기한다[31]. STZ 유발 당뇨병 쥐모델에서 p22^{phox}-containing NAD(P)H oxidase는 혈관평활근세포 증식의 매개체임이 밝혀졌다

[50,51]. 배양된 쥐의 대동맥 평활근세포에서 알도스 전환효소의 억제제가 PKC와 NF- κ B 활성화를 억제할 수 있는 것처럼 폴리를 경로 또한 고혈당 유발성 PKC 의존성 NF- κ B 활성화에 관여한다[51]. 알도스 전환효소 역시 고혈당에 의한 PDGF 수용체 단백질의 β -소단위의 발현을 증가시키는 것 같다. 혈관평활근세포 증식의 다른 자극은 NOS 농도의 감소이다. NOS는 대동맥 평활근세포에서 항분열 촉진인자임이 밝혀졌고 고혈당은 iNOS의 활성을 억제한다[31,51]. 산화스트레스에 의해 전사인자인 CREB (cAMP response element-binding)의 활성 저하는 혈관평활근세포의 증식을 야기시키고, 이는 산화스트레스에 의해 혈관평활근세포의 증식을 일으키는 하나의 기전이다[52]. OxLDL은 ROS에 의해 혈관평활근세포의 자멸사(apoptosis)를 유도한다[53]. 죽상동맥경화 병변에서 혈관평활근세포의 세포자멸사가 증가되어 있고, 당뇨병 환자에서 동맥경화 병변의 플라크의 파열이 증가되는 가능성을 제공한다[53]. 당뇨병 환자들에서 사이토카인이 혈관평활근세포의 콜라겐 합성을 감소시키고 MMP의 생성을 증가시키는데 이는 동맥경화 병변의 플라크를 불안정하게 만들어 파열이 잘 생기게 만든다.

산화스트레스와 미세혈관합병증 발생기전

당뇨병성 신장병증, 신경병증과 망막병증과 같은 미세혈

관합병증은 당뇨병 유병기간이 길수록 발생빈도가 증가한다. 미세혈관합병증의 발생기전에 대해서는 논란이 있지만, 산화스트레스도 하나의 원인인 것으로 알려져 있다. 적출한 신장을 ROS에 노출시키면 용량에 비례하여 heparan sulfate의 합성이 감소되고, 이런 효과는 catalase에 의해 회복되는 것을 관찰할 수 있다. 또한 STZ 유발 당뇨병 쥐에서 적출한 사구체는 H_2O_2 를 제거하는 능력이 감소되어 있고, 이는 catalase의 활성도가 감소되어 있거나 glutathione redox cycling의 변화로 인해 야기된다[54]. 최근의 연구결과에서 STZ 유발 당뇨병 쥐의 신장조직에서 NAD(P)H oxidase의 소단위 중 Nox4와 p22^{phox}의 발현이 증가되어 있고, 이로 인해 ROS 생성이 증가되어 신장조직의 DNA를 파괴시켜 당뇨병성 신장병증이 발생하는 것으로 밝혀졌다[54,55]. 당뇨병성 망막병증에 산화스트레스가 관여하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 몇 가지의 연구결과들이 있다. 한 연구에서는 당뇨병 동물의 망막조직에서 NAD(P)H oxidase의 활성도가 증가되어 있고 이는 당뇨병성 망막병증을 야기시키는 원인인자라고 하였다[56]. 초기 실험적인 당뇨병성 신경병증의 발생에 ROS가 관여한다는 증거들은 많이 있다. 한 연구결과에서 STZ 유발 당뇨병 쥐와 primaquine으로 처치한 정상 쥐에서 항산화제인 probucol을 처치하면 신경전도 속도가 저하되는 것을 예방할 수 있다고 발표하였다. 신경의 기능이상도 산화스트레스에 의해 발생되며, 이는 신경에 분

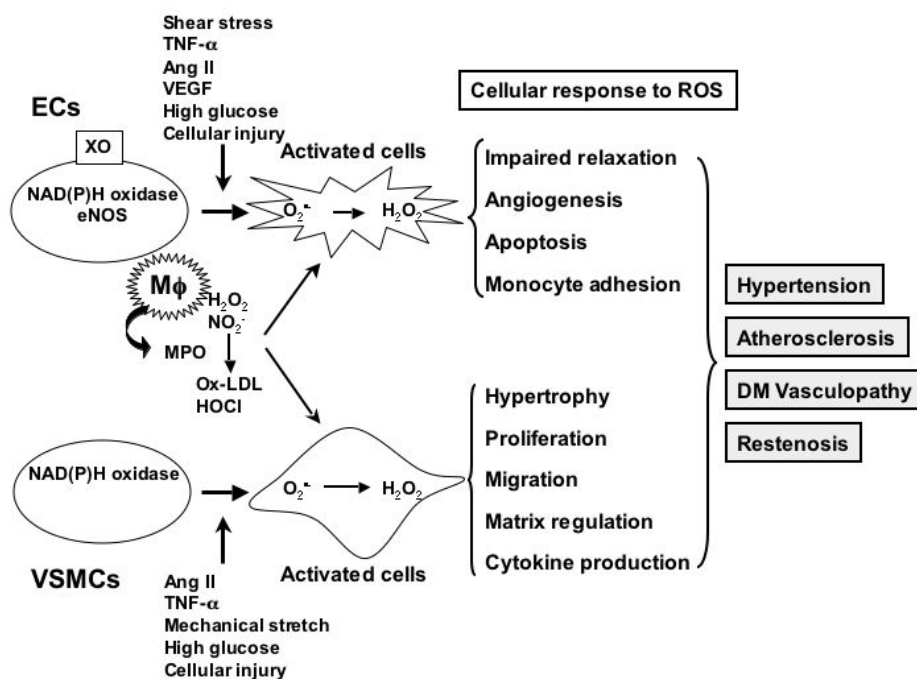


Fig. 4. The suggested mechanisms of development of oxidative stress-induced vascular complications in diabetes and hypertension. XO, xanthine oxidase; O_2^- , superoxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ox-LDL, oxidized LDL; MPO, myeloperoxidase; HOCl, hydroxyl chloride; VEGF, vascular endothelial growth factor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; Ang II, angiotensin II.

포하는 혈관의 기능 이상을 야기시켜 신경조직의 저산소 상태를 야기시키기 때문에 발생한다고 제안하였다[57]. 항산화 작용을 가진 전이 금속 킬레이트인 deferoxamine과 trientine으로 당뇨병 동물에서 투여하면 신경전도 속도와 신경으로의 혈류량이 개선되는 것을 관찰할 수 있다[57].

당뇨병성 혈관합병증에 항산화 약물의 효과

항산화 약물 치료가 당뇨병성 혈관합병증의 발생을 예방하거나 발생시기를 지연시킬 수 있는지에 대한 연구가 당뇨병 동물모델과 당뇨병 환자에서 많이 시도되고 있다. 당뇨병 동물모델에서 산화스트레스를 억제하는 항산화제를 투여하면 당뇨병성 혈관합병증의 발생을 어느 정도 예방될 수 있는 것으로 알려져 있다. 알파-리포산은 글루타치온을 재생시키는데 필요하고 비타민 C와 E를 산화시킨다. 동물 연구에서 비타민 C와 E 그리고 알파-리포산은 신경 전도속도를 개선시키고, 말초신경으로의 혈류를 개선시키며, 망막에서 백혈구의 부착을 억제시키고, 백내장 발생을 억제시킨다. 이러한 결과들로부터 항산화제는 당뇨병성 혈관합병증의 발생을 억제시키는데 효과적으로 투여할 수 있을 것으로 생각된다[56,57]. 알파-리포산을 사용한 임상연구에서 다발성 당뇨병성 신경병증의 증상이 개선되었다고 발표하였다. 알파-리포산은 근육세포들에서 포도당의 이동을 증가시키는데 이는 이 약제의 항산화 작용과 관련이 있다[57]. 또한 당뇨병 동물모델에서 비타민 C와 E는 단독 혹은 병합 투여하였을 때 lipid peroxidation, isoprostane 생성, 혈액 내 malondialdehyde와 NF- κ B의 활성화 등의 산화스트레스의 많은 지표들을 정상화시킨다. 이러한 생화학적 지표들의 변화뿐만 아니라, 당뇨병성 망막병증, 신장병증, 신경병증 그리고 심혈관계질환의 발생이나 진행을 항산화제를 사용하면 개선된다고 밝혀졌다[58]. 몇몇 보고에서는 비타민 C와 E를 투여하면 당뇨병 동물모델에서 망막과 말초신경의 후기 병적 변화들을 예방할 수 있다고 하였다[56,58]. 그러나 당뇨병 환자에서 항산화제의 이러한 효과는 부정적이다. 한 연구에서 일반적인 항산화 효과를 나타내는 용량에서 비타민 C는 내피세포의 기능을 개선시키고 미세알부민뇨를 억제시킨다고 하였지만[55,57,58], Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE)과 같은 대규모 임상연구에서는 당뇨병 환자에서 미세혈관합병증과 심혈관계질환의 예방에 효과가 없는 것으로 밝혀졌다[59]. 고용량의 비타민 E를 투여하면 산화스트레스의 여러 지표들을 정상화시키고, 고혈당에 의한 PKC 활성을 억제시켜 망막과 신사구체의 혈관 기능의 이상을 예방할 수 있다고 보고하였다[58,59]. 그러나 하루 400 IU이상의 비타민 E 치료에 대한 임상 연구의 메타분석은 고용량의 비타민 E는 실제로 사망률을 증가시킬 수 있는 것을 제시하였다[60]. 항산화제 치료에 대한 대부분의 임

상연구들은 간접적인 산화스트레스의 지표를 사용하였으며, 임상연구 기간의 제한과 대상군의 수에 제한이 있었다. 결론적으로 비타민 C와 비타민 E는 산화스트레스의 생화학적 표지자를 낮추는데 효과가 없을 뿐만 아니라, pro-oxidants로서 작용할 수 있다[59,60]. 따라서 죽상경화증에 대한 새로운 항산화제의 연구가 활발하게 되었다. 이러한 것들 중 하나가 AGI-1067 (probucol의 monosuccinic acid ester)이며 기대되는 결과를 보였고 현재 3상 연구 중이다[61].

STZ 유발 당뇨병 쥐에게 안지오텐신전환효소와 안지오텐신수용체 차단제를 투여하면 알부민뇨의 발생을 억제하고 NAD(P)H oxidase의 소단위인 p47^{phox}의 발현이 증가되는 것을 억제하여 ROS 생성을 억제한다고 하였다[62]. 최근 역학조사에서 안지오텐신전환효소 억제제와 안지오텐신수용체 차단제가 당뇨병성 신장병증의 발생에 예방적인 효과가 있다고 밝혀졌다[61,62]. HOPE 연구에서는 안지오텐신전환효소 억제제가 제2형 당뇨병의 발생 빈도를 감소시키는 결과를 보여주었다[59]. 안지오텐신전환효소의 억제는 당뇨병 환자에서 내피세포 의존성 혈관 이완반응을 개선시킨다[59] 이는 안지오텐신 II에 의한 NAD(P)H oxidase 활성을 줄임으로써 야기되는 것으로 보인다[59~62]. 또한 안지오텐신전환효소 억제제는 브라디키닌(bradykinin)의 파괴를 억제시키거나 인슐린에 대한 혈관의 반응도를 증가시켜 기저 NO의 생성을 증가시킨다[62]. 또한 peroxisome proliferator-activated receptor- γ 를 통해 산화스트레스를 감소시킴으로써 내피세포의 기능 이상을 개선시키는 thiazolidinediones의 능력은 당뇨병 환자에서 심혈관질환에 대한 효과에 대한 임상연구가 시작되었다[63].

다른 치료로는 AGE-RAGE 상호 작용을 차단하거나 AGE생성을 방해하는 약제를 사용하는 방법이다. 수용성 RAGE 혹은 RAGE-specific IgG는 가능성 있는 치료 방법이다. 수용성 RAGE는 ApoE knockout mice에서 죽상경화증을 억제하는 것을 보였다[64]. ROS-sensitive signaling cascades의 특이 성분의 차단은 당뇨병성 심혈관 합병증의 진행을 억제시킬 수 있다. 또한 PKC 억제제도 고혈당에 의해 활성화된 NAD(P)H oxidase를 억제하여 항산화작용을 나타낸다. 당뇨병 쥐에게 선택적으로 PKC- β 를 억제하는 ruboxistaurin (LY333531)를 경구 투여하면 알부민의 배설을 억제하고, 신사구체 여과율의 증가를 감소시키고, 망막의 혈류 이상을 개선시키는 등의 미세혈관질환에 대한 기대되는 효과를 보였고, 현재 3상 임상 연구가 진행 중이다. 다른 PKC 억제제인 CGP53353은 인간 대동맥 내피세포에서 고혈당 유발성 NF- κ B 활성화와 VCAM-1의 발현을 억제시킬 수 있다[65]. 이들의 잠재적 경쟁자가 없는 특이성 때문에 병적 신호전달 경로의 요소에 대한 siRNAs는 매력적인 새로운 개념이다. 현재 시험 중인 치료방법은 nanoparticle 혹은 liposome-enclosed 약제의 사용이다[66]. 이러한 리간드

접합 운반체(ligand-conjugated vehicles)는 특이 수용체를 발현하는 세포에 대한 치료 약제를 전달할 수 있다.

새로운 superoxide dismutase 또는 catalase 유사 물질들은 STZ 유발 당뇨병 쥐에서 혈관 내피세포의 기능 장애를 정상화시켰고, 신경조직으로의 혈류를 개선시키고 운동신경의 전도속도를 개선시켰다[67]. 세포 내의 superoxide scavenger인 L-propionyl-carnitine는 미토콘드리아의 기능을 개선시키고, DNA 손상을 억제하였다. 이런 합성물질들은 또한 당뇨병 실험동물에서 심장기능, 말초신경 기능과 혈류의 개선을 시켰으며, 이러한 결과들은 당뇨병성 혈관질환의 발생에 ROS가 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다. 당뇨병 환자에서 이런 약제들의 항산화 효과와 당뇨병성 혈관합병증을 예방 혹은 진행을 억제할 수 있는지에 대해서는 더 많은 임상 연구가 필요할 것이다.

결 론

여기서 산화스트레스가 당뇨병성 혈관합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것을 살펴보았다. 다수의 연구에서 고혈당에 의해 여러 단계의 경로를 통해 당뇨병 동물모델과 당뇨병 환자에서 ROS의 생성이 증가하였다. 최근에는 혈관합병증을 가진 당뇨병 환자에서 고혈당에 의해 증가된 산화스트레스에 반응하는 세포 내 항산화 기전들이 감소되어 있다고 제시되었다. 이것은 이들 환자들에서 항산화제가 합병증을 억제하는데 효과가 있을 것이라는 것을 암시하고 있다. 그러나 대규모 임상연구에서 항산화제들이 당뇨병성 혈관합병증의 예방과 진행을 억제한다는 결과는 부족한 실정이다. 산화스트레스의 감소와 ROS 민감성 신호전달 경로(ROS-sensitive signaling pathways)의 조절을 목표로 한 조기 치료는 당뇨병에서 혈관질환을 감소시키는데 효과적일 수 있다. 당뇨병의 대사적 기초의 분자적 기전에 대한 이해는 당뇨병에 의한 심혈관 합병증의 치료와 예방에 아주 중요하다. 따라서 당뇨병성 혈관합병증을 예방 또는 진행을 억제하는 치료적인 접근방법들이 더 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Diabetes Control and Complications Trials (DCCT) Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993
2. UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin

compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352:837-853, 1998

3. Griendling KK, FitzGerald GA: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108:2034-2040, 2003
4. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88:E14-E22, 2001
5. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002
6. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820, 2001
7. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C: Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 34:1563-1574, 2003
8. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A: Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 321:89-96, 2002
9. Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Griendling KK: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep* 4:247-252, 2004.
10. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49:1939-1945, 2000
11. Kiuchi K, Nejima J, Takano T, Ohta M, Hashimoto M: Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. *Heart* 85:87-91, 2001
12. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr,

- Chow WS, Stern D, Schmidt AM: Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4:1025-1031, 1998
13. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897, 1994
14. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK: Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 17:417-425, 2003
15. Steinberg H, Baron A: Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 45:623-634, 2002
16. Wauters M, Considine RV, Yudkin JS, Peiffer F, De Leeuw I, Van Gaal LF: Leptin levels in type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion. *Horm Metab Res* 35:92-96, 2003
17. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R: Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13:1231-1238, 1999
18. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP: The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10:157-167, 1999
19. Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY: High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 101:2618-2624, 2000
20. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272:728-731, 1996
21. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H: New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417:150-152, 1997
22. Bierman EL: George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 12:647-656, 1992
23. Chisolm GM, Steinberg D: The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28:1815-1826, 2000
24. Williams K, Tabas I: The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:551-561, 1995
25. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM: Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105:1656-1662, 2002
26. Li L, Sawamura T, Renier G: Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium. *Diabetes* 52:1843-1850, 2003
27. Li L, Sawamura T, Renier G: Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation. *Circ Res* 4:892-901, 2004
28. Ceriello A: Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia* 36:1119-1125, 1993
29. Kim YK, Lee MS, Son SM, Kim JJ, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD: Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:522-527, 2002
30. Spitaler MM, Graier WF: Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45:476-494, 2002
31. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H: Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14(Suppl 3):S227-S232, 2003
32. Xia Y, Tsai A, Berka V, Zweier J: Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase: a Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 273:25804-25808, 1998
33. Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G:

- Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 349:353-356, 2000
34. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T: Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43:1435-1438, 2000
 35. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q., Sui C, Brownlee M: Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108:1341-1348, 2001
 36. Potashnik R, Bloch-Damti A, Bashan N, Rudich A: IRS1 degradation and increased serine phosphorylation cannot predict the degree of metabolic insulin resistance induced by oxidative stress. *Diabetologia* 46:639-648, 2003
 37. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP: Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 106:987-992, 2002
 38. Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M: High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305:122-128, 2003
 39. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao P S: Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 88:1291-1298, 2001
 40. Curcio F, Pegoraro I, Dello Russo P, Falletti E, Perrella G, Ceriello A: SOD and GSH inhibit the high glucose-induced oxidative damage and the PDGF increased secretion in cultured human endothelial cells. *Thromb Haemostasis* 74:969-973, 1995
 41. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P: Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 52:2882-2887, 2003
 42. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM: Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97:238-243, 1996
 43. De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Proietti A, De Luca O, Armiento A, Ferri C: Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with noninsulin dependent diabetes. *Diabetologia* 41:1392-1396, 1998
 44. Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, Bayerle-Eder M, Roden M, Wolzt M: FFA-induced endothelial dysfunction can be corrected by vitamin C. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2913-2917, 2002
 45. Park KS, Kim JH, Kim MS, Kim JM, Kim SK, Choi JY, Chung MH, Han B, Kim SY, Lee HK: Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 50:2837-2841, 2001
 46. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A, Dandona P: Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. *Metab Clin Exp* 53:330-334, 2004
 47. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A, Nawroth PP: Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 21:1310-1316, 1998
 48. Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R: Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 275:17728-17739, 2000
 49. Beauchamp MC, Michaud SE, Li L, Sartippour MR, Renier G: Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression. *J Lipid Res* 45:1749-1757, 2004
 50. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE: Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct

- growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* 50:851-860, 2001
51. Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK: Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* 53:2910-2920, 2004
52. Watson PA, Nesterova A, Burant CF, Klemm DJ, Reusch JE: Diabetes-related changes in cAMP response element-binding protein content enhance smooth muscle cell proliferation and migration. *J Biol Chem* 276:46142-46150, 2001
53. Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 49:135-145, 2001
54. Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Kanwar YS: Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6309-6313, 1992
55. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H: Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 46:1428-1437, 2003
56. Ellis EA, Guberski DL, Somogyi-Mann M, Grant MB: Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 28:92-101, 2000
57. Cameron NE and Cotter MA: Neurovascular dysfunction in diabetic rats. Potential contribution of autoxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest* 96:1159-1163, 1995
58. Cameron NE and Cotter MA: Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 45:137-146, 1999
59. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P: Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:154-160, 2000
60. Miller ER III, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E: Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142:37-46, 2005
61. Tardif JC, Gregoire J, Lavoie MA, L'Allier PL: Pharmacologic prevention of both restenosis and atherosclerosis progression: AGI-1067, probucol, statins, folic acid and other therapies. *Curr Opin Lipidol* 14:615-620, 2003
62. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS: Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 61:186-194, 2002
63. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM: RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106:2827-2835, 2002
64. Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F: Selective inhibition of protein kinase Ch2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 110:91-96, 2004
65. Carlsson J, Kullberg EB, Capala J, Sjoberg S, Edwards K, Gedda L: Ligand liposomes and boron neutron capture therapy. *J Neuro-Oncol* 62:47-59, 2003
66. Hattori Y, Maitani Y: Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. *J Controlled Release* 97:173-183, 2004
67. Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y, Haj-Yehia A: Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 436:111-118, 2002