

2형 당뇨병을 동반한 대사증후군환자에서 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma(PPAR- γ) 작용제가 혈관내피세포에 미치는 영향: 염증과 NO_x의 변화

경상대학교 의과대학 내과학교실

고진신 · 박성지 · 임성일 · 최봉룡 · 곽충환 · 황진용

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma(PPAR- γ) Agonist Improves Endothelial Function in Diabetic Patients with Metabolic Syndrome: Pivotal Role of NO_x and Inflammation

Jin-Sin Kho, MD, Sung-Ji Park, MD, Sung-Il Im, MD,

Bong-Ryong Choi, MD, Choong-Hwan Kwak, MD and Jin-Yong Hwang, MD

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Nitric oxide (NO) is thought to have antiatherosclerotic properties. On the other hand, NO activity is reduced in patients with metabolic syndrome, and endothelial dysfunction is an important early sign of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. The aim of this study was to investigate the effect of pioglitazone on the endothelial function in terms of the plasma NO_x (combined nitrate/nitrite), the circulating inflammatory markers and the autonomic nervous system. **Subjects and Methods :** We randomized 40 subjects with metabolic syndrome, and they were assigned to receive 15 mg of pioglitazone per day (the PIO group, n=21) during 12 weeks or they were placed in the placebo group (the PLA group, n=19). We estimate the endothelial function by performing vascular ultrasound. The plasma NO_x levels, the levels of the inflammatory markers and the GRK2 levels were measured. **Results :** After 12 weeks of therapy, flow mediated dilation (FMD) was improved in the PIO group (from $6.7 \pm 6\%$ to $11.7 \pm 5\%$, respectively: $p < 0.05$), but not in the PLA group. The level of plasma NO_x was increased in the PIO group (from 67.7 ± 30 nmol/dL to 92.9 ± 41 nmol/dL, respectively: $p < 0.001$), but not in the PLA group. The plasma levels of hsCRP and IL-6 dropped significantly (from 2.6 ± 2.3 mg/L to 1.2 ± 1.3 mg/L and 1.7 ± 2.1 pg/mL to 0.7 ± 0.5 pg/mL, respectively: $p < 0.05$) in the PIO group, but not in the PLA group. The levels of GRK2 (the PLA group from 0.0061 ± 0.0023 ng to 0.0075 ± 0.0031 ng, and the PIO group from 0.0024 ± 0.002 ng to 0.0015 ± 0.001 ng, $p = ns$) didn't dropped significantly. **Conclusion :** Administration of PPAR- γ agonist in patients suffering with metabolic syndrome improves their endothelial function, enhances the production of NO_x and reduces the proinflammatory markers, but this is not related to sympathetic regulation. PPAR- γ agonist may be able to modulate the progression of atherosclerosis. (Korean Circulation J 2007;37:221-229)

KEY WORDS : Peroxisome proliferator-activated receptors ; Metabolic syndrome ; Nitro oxide ; Inflammation.

서 론

최근 평균 수명이 연장되고, 생활수준이 향상되면서 열량의

과잉섭취와 신체 활동의 감소에 따른 운동부족 등 생활습관의 변화에 의해서 인슐린 저항성, 고혈압, 지질이상(dyslipidemia), 비만 등이 같이 동반되어 나타나는 대사증후군(metabolic syn-

논문접수일 : 2007년 1월 27일

심사완료일 : 2007년 4월 12일

교신저자 : 박성지, 660-751 경상남도 진주시 칠암동 92번지 경상대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (055) 750-8065 · 전송 : (055) 758-9122 · E-mail : sjpark223@yahoo.co.kr

drome)이 증가하는 추세에 있다. 이런 대사증후군 환자들에게서는 당뇨병, 심혈관계 질환, 뇌졸중 등이 발생할 수 있으므로 조기 발견과 치료가 중요하다.¹⁾ 대사증후군 환자에서 혈관 내피세포 기능장애는 대사증후군으로 진단되기 훨씬 이전부터 나타난다. 손상된 혈관 내피세포에서부터 기인하여 죽상경화가 시작되고 진행되며 이는 대사증후군 환자의 사망과 육체적 무력을 일으키는 주요한 원인으로 알려진 심혈관계 질환의 주요 위험인자가 된다. 따라서 이런 무증상 혈관질환을 조기에 발견하고 추적 관찰하는 것이 대사증후군 환자들에게 심혈관계 질환의 위험도를 감소시키는 주요한 치료 전략이 될 것이다. 즉, 대사증후군 환자에서도 혈관의 죽상경화 및 표적 장기 혈류량 조절에 중요한 역할을 하는 혈관 내피세포의 기능 보존과 향상에 노력 해야 한다.

대사증후군의 구성 요소인 고혈당, 고인슐린 혈증, 증가된 산화 스트레스, 당뇨병성 지질장애 등이 각각 또는 서로 상호 작용하여 혈관 내피세포 기능장애를 유발시킨다. 혈관 내피세포 기능장애는 대사증후군의 초기에 발견되어지며 최근의 연구 결과에 의하면 심지어 대사증후군으로 진단되기 훨씬 이전부터 나타난다고 밝혀졌다.²⁾

당뇨병의 치료에 최근 사용되는 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) 작용제인 thiazolidinediones(rosiglitazone, pioglitazone 등) 계열의 약물이 혈당 강하 효과와는 별개로 혈관 기능의 호전을 가져온다고 보고되고 있다.³⁾

혈관 내피세포는 혈관 수축인자 뿐만 아니라 다양한 혈관 확장인자를 분비하여 심혈관계 기능조절에 결정적인 역할을 한다.

대사증후군의 가장 중요한 구성 요소이며 기본적인 병태생리학적 이상인 인슐린 저항성은 세포하인슐린 신호전달경로(subcellular insulin signalling pathway)를 파괴하여 nitric oxide(NO)를 통한 인슐린의 혈관 확장효과를 감소시켜 혈관 내피세포의 기능 장애와 연관이 있다는 여러 보고가 있다.⁴⁾ 전향적 연구결과에 의하면 대사증후군 환자에서 내피세포의 기능장애가 심혈관계 합병증의 주요 원인 중 하나임이 밝혀지고 있다.⁵⁾ 이러한 측면에서 대사증후군 환자에서 내피세포 기능장애가 치료 및 위험인자 조절의 중요한 목표로 대두되고 있다.

이에 저자는 대사증후군 환자를 대상으로 PPAR- γ 작용제인 pioglitazone을 투여한 후 혈관 내피세포 기능 및 다른 여러 가지 동반 인자를 연구하여, PPAR- γ 작용제가 내피세포 기능에 미치는 영향을 평가하고 내피세포 기능 호전의 기전으로 혈당 강하작용과 항염증작용의 중요성을 비교 평가하고 혈장 NOx, 교감신경계 활성화 측면에서 그 기전을 밝혀보고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

경상대학교 병원에 내원하여 Type 2 DM으로 진단 받은

환자 중 심장 판막 질환, 일차성 심근 질환, 허혈성 심질환, 심근경색증, 이차성 고혈압이 의심되는 환자, 중증 고혈압 환자와 간질환이나 신질환, 만성 심부전 등 자율신경계에 영향을 줄 수 있는 동반질환이 있는 환자는 연구 대상에서 미리 배제하였다.

대사증후군의 정의

2001년에 발표된 NCEP ATP III 진단기준⁶⁾에서 복부비만 항목은 아시아-태평양 지역의 기준 허리둘레를 대입하여 복부비만을 정의하였다. 대사증후군의 진단기준은 다음과 같다. 1) 복부비만(남자에서 허리둘레 ≥ 90 cm, 여자에서 허리둘레 ≥ 80 cm) 2) 고중성지방혈증(≥ 150 mg/dL) 3) 고밀도지단백콜레스테롤혈증(남자 < 40 mg/dL, 여자 < 50 mg/dL) 4) 혈압: 수축기 혈압 ≥ 130 mmHg or 이완기 혈압 ≥ 85 mmHg 5) 공복 고혈당($110 \sim 125$ mg/dL)

본 연구에서는 2형 당뇨병으로 진단 받은 환자 중에서 대사증후군 진단기준¹⁻⁴⁾ 중 2가지 이상을 만족하는 경우를 대사증후군으로 진단하였다. 고혈압은 항고혈압제를 투여 받고 있던 경우나, 혹은 내원 당시 환자를 최소 30분간 안정시킨 후 앉은 자세에서 우측 상완의 전주부 상부 5 cm되는 부위에 표준 성인용 낭대를 감고 1주 간격으로 3회 이상 측정하여, 평균이 수축기 혈압 140 mmHg 또는 확장기 혈압 90 mmHg 이상인 경우를 고혈압으로 진단하였다. 키, 체중은 자동 측정기를 이용하였고, 체질량지수는 측정된 키와 체중을 이용하여 계산(kg/m^2)으로 구하였다. 허리둘레는 직립자세에서 제대 부위에서 측정하였고, 엉덩이 둘레는 골반부 대천자 부위에서 측정하였다. 환자들은 4주 동안의 wash-out 기간 이후 무작위로 배정하여 12주 동안 매일 PPAR- γ 작용제인 pioglitazone 15 mg을 투여한 pioglitazone군 21예와 위약을 투여한 control군 19예로 분류하고 12주간 전향적으로 혈중 당뇨병 조절 정도, 지질, 염증 표식자, 혈관 내피세포 기능 등에 대해 분석하였다. 연구 기간 동안 환자들은 최소한 14일 간격으로 추적 관찰하였다.

방 법

검사실 분석

검사실 분석을 위한 채혈은 전날 저녁부터 금식한 후 다음날 아침 환자의 상완정맥 내에 삽관을 미리 장치하고 30분 간절대 안정 후 채혈하였으며, 12주간의 치료 시작 전과 치료 종료 후 시행하였다.

혈청 총콜레스테롤 농도와 중성지방농도는 enzymatic calorimetric test로 측정하였고, 고밀도지단백 콜레스테롤은 selective inhibition방법으로 측정하였으며 저밀도지단백 콜레스테롤은 homogeneous enzymatic colorimetric test로 측정하였다(Roche Diagnostic Systems, Switzerland). 염증 표식자로 WBC, ESR, interleukin-6(IL-6), high-sensitivity C-

reactive protein(hsCRP)를 측정하였으며 IL-6는 효소 결합 면역흡착제 검정법(EASIAM, Biosource Europe, Fleurus, Belgium)으로, hsCRP는 latex particle enhanced immunoassay방법(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)으로 측정하였다. 인슐린 저항성의 지표로서 HOMA(homeostatic model assessment)를 이용하였고, 계산공식은 다음과 같다.

$$\text{HOMA} = [\text{fasting insulin}(\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glycemia}(\text{mmol/L})] / 22.5$$

말초혈액 단핵구 및 RNA 분리

EDTA가 처리된 전혈에서 Boyum방법에 따라 단핵구를 분리하였다.⁷⁾ 단핵구에서 세포막을 제외한 세포질을 분리하기 위해 전혈로부터 분리한 단핵구를 4℃로 냉각한 용해 용액(lysis buffer: 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5, at room temperature, 100 mg/mL PMSF, 10 mg/mL benzamide, 5 mg/mL pepstatin A)에 재현탁하였다. 균질화된 세포는 4℃에서 30분간 45,000 g로 원심 분리한 후 상층액을 분리하여 액화질소에서 급냉시킨 후 -80℃에서 보관하였다.

분리된 단핵구로부터 trizol(Gibco-BRL)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 증류수에 용해시킨 후 흡광도를 측정하여 RNA농도를 결정했다.

Real-time RT-PCR

RNA를 DNA로 reverse transcription후 MJ Research DNA Engine Opticon 2 system을 이용하여 target sequences와 대조군을 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)로 하여 real-time RT-PCR을 시행하였다. GRK2의 PCR primer는 사람 cDNA 유전자 서열을 따라 선택하여 PCR을 위한 GRK2(sense primer: 5'-GCAAGATGTACGCCATGAAGTGC-3', positions 656-679, antisense primer: 5'-CTTCTGCAAGAAGACCATCTGCC-3', positions 1388-1410) 및 GAPDH의 primer를 제작하여 시행하였다.

NO assay

혈장내 NOx는 Griess 방법에 따라 측정하였다. 환자의 전혈을 3000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액만 채취한 뒤 혈장 80 μL 와 5 mM의 b-Nicotineamide Adenine Dinucleotide Phosphate(NADP, SIGMA[®]) 10 μL 와 10 μL 의 Nitrate reductase(Roche[®]) 10 μL 을 혼합하여 96well plate에 분주한 뒤 37도의 CO₂ incubator에서 1시간 배양시킨다. standard로는 100 μM Sodium Nitrate(NaNO₃)를 이용하였다.

0.1% naphthylene diaminedihydrochloride(NED)로 구성된 용액 A와 1% Sulfanilamide in 5% phosphoric acid로 구성된 용액 B를 반응 직전 1대 1 비율로 혼합하여 Griess

reagent로 사용하였다. 배양된 용액에 100 μL 의 Griess reagent를 첨가한 뒤 10분 이내에 550 nM filter model 550 microplate reader(Bio-RAD[®])를 이용해서 550 nM에서 흡광도를 측정하였다.

혈관 내피 세포 기능의 평가

본 연구에서는 8.0-MHz 선형탐촉자(linear-array transducer)와 Acuson Sequoia C256 심초음파기기(Acuson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 Sorensen 등⁸⁾의 방법으로 우측 상완동맥의 내경변화를 측정하였다. 상완동맥의 내경은 longitudinal section으로 scan하여 휴식시, 반응성 충혈 후, 재휴식시 그리고 nitroglycerin(NG) 설하정 투여 후에 각각 측정하였다. 초음파의 해상도를 높이기 위해서 agar로 만들어진 0.8 cm 두께의 gel plate를 대상자의 우측 안쪽 팔꿈치 상방의 상완동맥 위에 고정시킨 다음, 10분간 안정을 취한 후 휴식시의 상완동맥의 영상(제 1 기저내경)을 기록하고 우측 팔꿈치 하부의 전완 부위에 낭대를 감고 공기를 주입 250 mmHg의 압력으로 5분간 압박하여 우측 전완 원위부에 일시적인 허혈상태를 유발시킨 다음 낭대의 압력을 0 mmHg로 다시 낮추고 1분이 지난 후에 상완동맥의 영상을 기록하였다. 15분간 기다린 후 상완동맥의 영상(제 2 기저내경)을 다시 기록하고, nitroglycerin 0.6 mg을 설하로 투여한 다음 3분 후에 상완동맥의 영상을 재차 기록하였다. 상완동맥의 내경은 검사 기간 동안 대상자에 대한 임상정보를 모르는 관찰자가 함께 기록한 심전도의 R-파에 일치하는 시점에 맞추어 측정하였다. 혈관 의존성 상완동맥 혈관 확장능(flow mediated dilation, FMD)은 기저치 직경에 대한 늘어난 직경을 백분율로 계산하여 구하였다.

통계적 분석

통계 분석은 SPSS program(SPSS 10.0 for windows)을 이용하였다. 자료는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 군 간의 비교는 student t test나 Wilcoxon Rank-Sum test를 사용하였고 선형회귀분석을 통해 연속 변수들 간의 연관성을 분석하였다. 이전 손 등⁹⁾의 연구결과에서 보고된 바와 같이 pioglitazone 투여 전과 투여 후에 FMD가 절대치 2.1% 이상 증가하는 것을 α 에러 5%이내 80% power로 간주하였으며 FMD와 관련있는 독립인자를 도출하기 위해 이 값을 종속변수로 하는 다변성 논리 회귀분석(multivariate logistic regression analysis)을 이용하였다. 통계적 유의성은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

임상적 특징

대상 환자 40명은 연구 시작 시, 무작위로 배정되어 매일 pioglitazone 15 mg을 투여한 pioglitazone군 21명과 위약을

투여한 control군 19명으로 분류하고 12주간 전향적으로 진행하였다. 평균 연령은 pioglitazone 투여군 52 ± 11 세, 위약 투여군 58 ± 11 세였고, 남녀 구성비는 pioglitazone 투여군 21명에서 남자 11명, 여자 10명, 위약 투여군 19명에서 남자 9명, 여자 10명으로 연령 및 성비에서 두 군 간에 유의한 차이는 없었다. 또한 두 군간 흡연력, 체질량지수도 유의한 차이가 없었다(Table 1).

지질에 대한 치료 효과

Pioglitazone 투여군의 경우 위약 투여군에 비하여 총콜레스테롤 농도(양 군에서 $p < 0.001$), 저밀도지단백 콜레스테롤 농도(양 군에서 $p < 0.001$), 중성 지방 농도(양 군에서 $p < 0.001$)

Table 1. Baseline characteristics of metabolic syndrome patients

Characteristics	Placebo group (n=19)	Pioglitazone group (n=21)
Age-years	58 ± 11	52 ± 11
Sex-M/F	9/10	11/10
BMI (kg/m^2)	27.8 ± 3.5	27.7 ± 2.9
Height (cm)	172.3 ± 5.2	161.3 ± 8.2
Body weight (kg)	78.7 ± 132	72.2 ± 889
Waist circumference (cm)	89.9 ± 245	91 ± 7.9
Systolic BP (mmHg)	148 ± 12	142.6 ± 13.0
Diastolic BP (mmHg)	82 ± 11	77.05 ± 9.79
Heart rate	64 ± 12	75.09 ± 8.4

All patients are metabolic syndrome subjects. Values are expressed as the mean \pm SD. There were no differences among each baseline value. BP: blood pressure, BMI: body mass index

가 감소하였으나 고밀도지단백 콜레스테롤 농도와 지질단백 a의 농도는 투여 전과 투여 후 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

염증표식자에 대한 치료 효과

hsCRP는 pioglitazone 투여군에서 2.6 ± 2.3 mg/L에서 1.2 ± 1.3 mg/L으로 통계학적으로 유의하게 감소하였으며, IL-6 또한 pioglitazone 투여군에서 1.68 ± 2.1 pg/mL에서 0.65 ± 0.47 pg/mL으로 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

Nitric oxide에 대한 치료 효과

NOX level은 pioglitazone 투여군에서 67.7 ± 30 nmol/dL에서 92.9 ± 41 nmol/dL로 p 값 0.001 미만으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

교감신경계 안정화에 대한 치료 효과

혈장내 GRK2의 값은 pioglitazone 투여군에서 치료 전 0.0024 ± 0.002 ng에서 치료 후 0.0015 ± 0.001 ng, 위약 투여군에서 치료 전 0.0061 ± 0.0023 ng에서 치료 후 0.0075 ± 0.0031 ng으로 두 군 모두에서 치료 전과 후를 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

혈당 강하에 대한 효과

혈당 강하에 대한 효과에 있어서 pioglitazone 투여군에서 위약 투여군에 비하여 공복시 혈당을 제외한 식후 2시간 측정

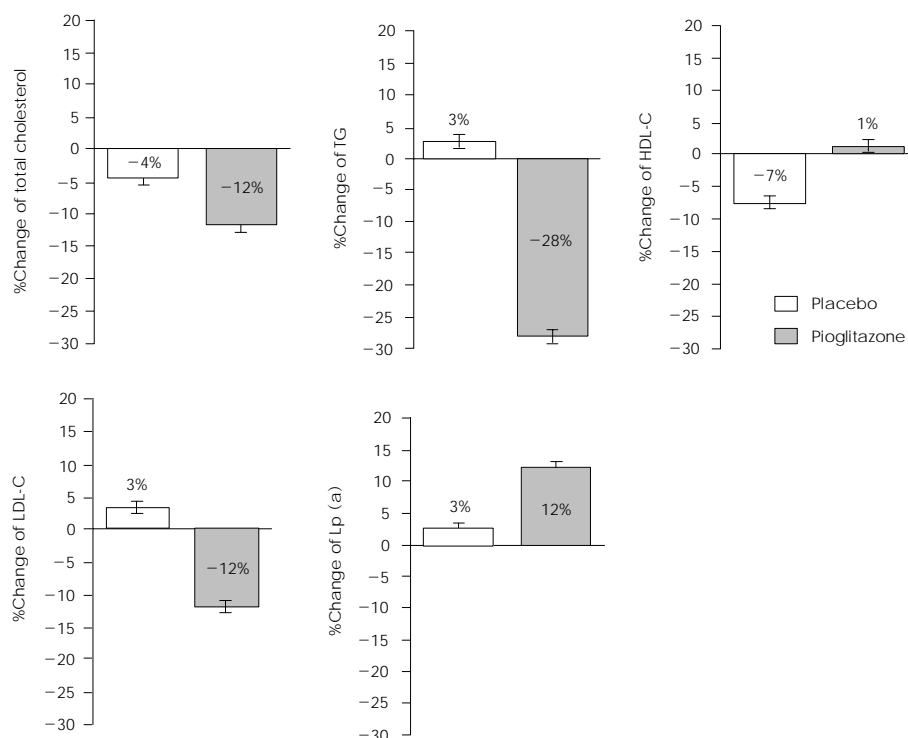


Fig. 1. Changes of lipid profiles. This bar Graphs showed the percent changes after treatment. Significant decrease in total cholesterol and triglyceride in pioglitazone group compared with placebo group. In contrast, no significant changes were observed in LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and lipoprotein a. TG: triglyceride, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, Lp (a): lipoprotein a.

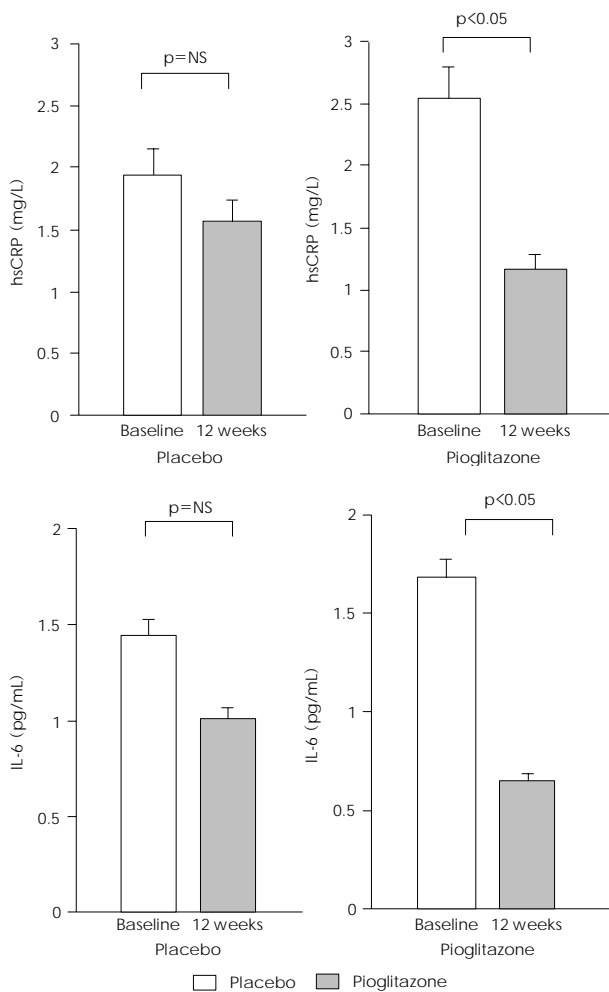


Fig. 2. Changes of inflammatory markers. By inflammatory markers, hsCRP was reduced in pioglitazone group, but not in placebo group after 12 weeks of treatment. IL-6, another inflammatory markers, a regulator of CRP released from the hepatocytes, were also reduced significantly in pioglitazone group. hsCRP: high sensitivity C-reactive protein, IL-6: interleukin-6, NS: not significant.

한 혈당과 혈중 fructosamine, 당화혈색소, homeostasis assesment index(HOMA index)에서 유의한 차이가 있었다. 특히 당화혈색소는 pioglitazone 투여군에서 위약 투여군에 비하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(양 군에서 $p < 0.001$)(Table 2). Table 2에서 pioglitazone 군은 72.2 ± 8.9 kg에서 70.2 ± 9.98 kg으로 체중이 준 것처럼 나와있으나 통계학적으로 유의하지는 않았다.

혈관운동기능에 대한 치료 효과

Pioglitazone 군에서 FMD가 각각 $5.5 \pm 4\%$ 에서 $8.9 \pm 3\%$ 로 현저히 개선되었다($p < 0.001$). 각각의 치료 동안 nitroglycerin에 의한 상완동맥 확장은 유의한 차이가 없었으며, 각각의 기본 값에 비교하여 유의하게 증가하지는 않았다(Fig. 5, 6).

FMD와 연관된 다변량 분석 결과 95% CI에서 치료 전과 후 NO의 변화(odds ratio, 0.9795(0.9293~1.0120)만이 독립적인 인자로 작용하는 것으로 나타났다(Table 3).

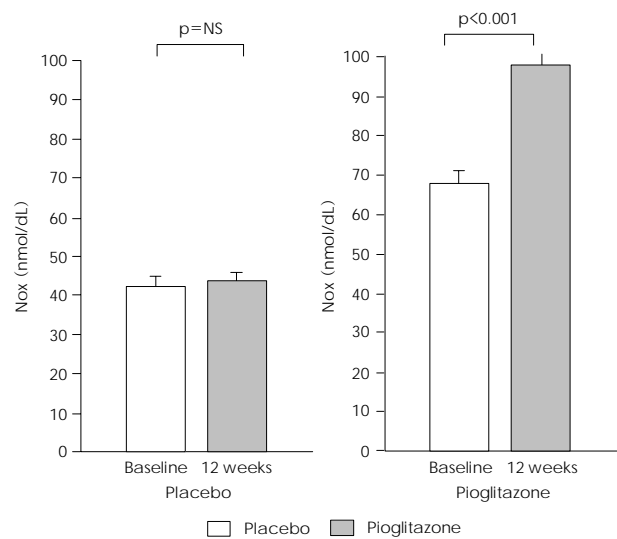


Fig. 3. Changes of nitric oxide. The plasma Nox (combined nitrate/nitrite) level were increased significantly in pioglitazone group, but not in placebo group after 12 weeks of treatment, NS: not significant.

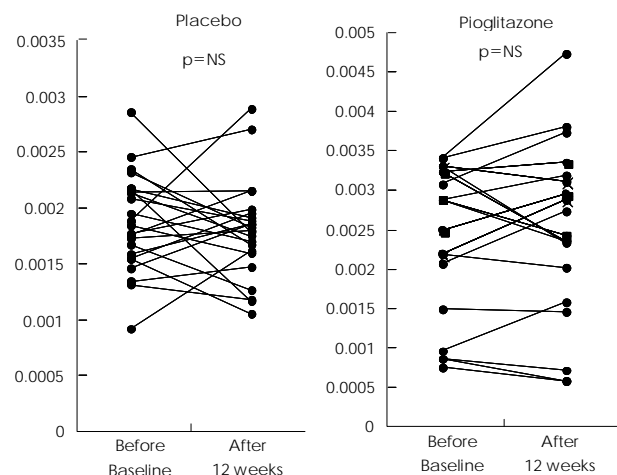


Fig. 4. Changes of GRK2 levels. No differences in the GRK2 levels of lymphocytes between the two groups of individuals. GRK2: G protein-coupled receptor kinases 2, NS: not significant.

고 찰

본 연구에서 pioglitazone 투여군에서 위약 투여군에 비하여 총 콜레스테롤, 저밀도지단백 콜레스테롤, 중성 지방 농도가 유의하게 감소하였으며, 염증 표식자인 hsCRP, IL-6는 유의하게 감소하였고 NOx는 유의하게 증가하였다. 또한 pioglitazone 투여군에서 기본 측정값에 비해 FMD가 개선되었다.

대사증후군 환자에서 인슐린 저항성으로 인해 발생하는 대혈관 합병증은 고혈당의 발현 이전에도 나타날 수 있으므로 이러한 환자에서 조기 적극적인 심혈관계 위험성에 대한 치료가 중요하게 대두되었다. 대사증후군에서 비만과 인슐린 저항성은 죽상 동맥 경화의 진행과 밀접한 관련이 있으며 이는 지방 세포에서 사이토카인을 분비하여 인슐린 감수성에 부정

Table 2. Changes of metabolic parameters

	Placebo			Pioglitazone		
	Baseline	12 weeks	p	Baseline	12 weeks	p
BMI (kg/m ²)	27.8 ± 3.5	29.6 ± 26.4	NS	27.7 ± 2.99	26.9 ± 3.29	NS
Body weight (kg)	78.7 ± 13.2	80.2 ± 65.6	NS	72.2 ± 8.9	70.2 ± 9.98	NS
Waist circumference (cm)	89.9 ± 24.5	90.3 ± 7.4	NS	91.03 ± 7.96	92.01 ± 8.09	NS
FBS (mg/dL)	153.9 ± 44.6	148.3 ± 35.2	NS	148.9 ± 50.6	127.1 ± 38.8	NS
PP2 (mg/dL)	238.4 ± 78.6	201.3 ± 46.6	NS	256.6 ± 87.4	188.7 ± 64.7	<0.05
Fructosamine (μmol/L)	320.5 ± 96.6	298.9 ± 68.4	NS	349.1 ± 81.64	279.1 ± 31.9	<0.05
HbA1c (%)	6.94 ± 2.64	7.52 ± 3.63	NS	7.33 ± 1.55	6.28 ± 0.87	<0.001
HOMA index	4.78 ± 3.6	5.02 ± 4.6	NS	5.15 ± 4.23	3.79 ± 2.47	<0.05

Values are expressed as the mean ± SD. BMI: body mass index, FBS: fasting blood sugar, PP2: post-prandial 2 hour sugar, NS: not significant, HOMA: homeostatic model assessment

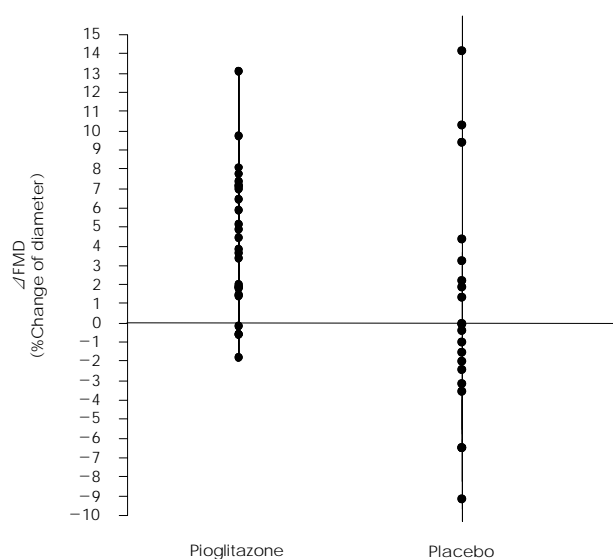


Fig. 5. Δ FMD after 12 weeks of treatment. The changes of FMD after 12 weeks treatment were enhanced in pioglitazone group not in placebo group. Δ FMD: delta changes of flow-mediated dilatation.

적 영향을 끼치며 혈관내피 세포의 손상을 야기하기 때문으로 생각된다.¹⁾

Thiazolidinediones는 활성화된 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) 작용제로서 인슐린을 매개로 근육 및 심장, 지방 세포 내로 포도당의 흡수를 촉진한다.¹⁰⁾

PPAR- γ 작용제는 직접, 간접적인 작용기전에 의하여 심혈관 질환의 위험인자를 가진 대사증후군 환자에서 죽상동맥 경화의 위험을 낮추는 것으로 다양한 후향적 임상 연구결과 밝혀졌다.¹¹⁾¹²⁾ PPAR- γ 작용제의 간접적인 작용기전은 인슐린 저항성을 호전시키는 것과 관련이 있으나 직접적인 효과는 인슐린 감수성과 무관하게 이상지혈증, 전응집상태, 내피세포 기능이상과 같은 전죽종형성 구성요소(proatherogenic components) 자체를 조절하는 것과 연관이 있다. PPAR- γ 작용제의 직접적인 항죽상경화작용은 다양한 연구에서 증명되었다. Marx 등¹³⁾은 PPAR- γ 작용제가 혈관벽 죽상경화반내의 전염증성 유전자의 변이를 초래한다는 사실을 증명하였으며 Pasceri 등¹⁴⁾은 PPAR- γ 작용제가 죽상경화를 동반한

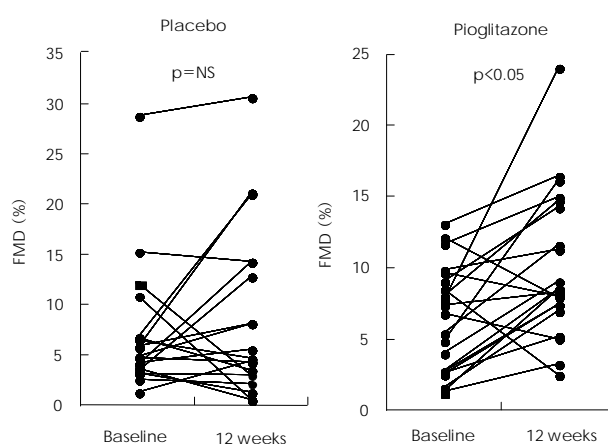


Fig. 6. Changes of FMD. Looking at some results from vascular function in the two groups of patients on the two graphs here, the graph on the left side looks at endothelium-dependent vascular function and the graph on the right side shows the results from the endothelium-independent vascular function. Individuals in the pioglitazone group have significantly greater endothelium-dependent vascular dysfunction than individuals in the placebo group. There were no differences in endothelium-independent vascular function between the two groups of individuals. FMD: flow-mediated dilatation.

위의 죽상경화반내 단핵구와 대식세포의 귀소(homing)를 방해한다는 사실을 밝혔다.

PPAR- γ 작용제는 인슐린 감수성과 고혈당의 호전을 가져오며 제 2형 당뇨병환자와 내당능 장애를 가진 환자의 경우에 있어서도 혈당을 낮추며 당화 혈색소를 감소시키는 효과가 있음이 증명되었다.¹⁵⁾ 일부의 연구에서는 고위험군 환자에 있어 PPAR- γ 작용제 투여 후 당뇨병의 진행을 늦출 수 있다는 보고도 있다.¹⁶⁾

대규모 임상연구결과 총 콜레스테롤과 저밀도지단백 콜레스테롤을 저하시키는 것만으로도 심혈관 질환의 유병률과 사망률을 감소시킬 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. PPAR- γ 작용제는 죽상동맥경화 발생과 강력하게 연관되어 있는 혈중 콜레스테롤 수치에도 영향을 미쳐 고밀도지단백 콜레스테롤의 증가, 저밀도지단백 콜레스테롤 입자크기의 증가, 중성지방의 감소 등의 효과를 나타내므로 이런 PPAR- γ 작용제 복용으로 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 것 자체가 심혈관 질환

Table 3. Multivariate logistic regression analysis with changes of FMD (Δ FMD ≥ 2.1) dependent variables

Variables	Odds ratio (95% CI)	p
Δ HOMA	1.198 (0.842-1.965)	0.1925
Δ hsCRP	0.933 (0.554-1.65)	0.5926
Δ NO	0.980 (0.929-1.012)	0.0349
Δ IL-6	0.547 (0.079-1.103)	0.1321
Δ TC	1.002 (0.994-1.010)	0.1524
Δ TG	1.002 (0.994-1.009)	0.1526
Δ LDL-C	1.004 (0.981-1.029)	0.7677
Δ HDL-C	1.202 (0.989-1.588)	0.1058

CI: confidence interval, Δ HOMA: changes of homeostatic model assessment index, Δ hsCRP: changes of high-sensitivity C-reactive protein, Δ NO: changes of nitric oxide, Δ IL-6: changes of interleukin-6, Δ TC: changes of total cholesterol, Δ TG: changes of triglyceride, Δ LDL-C: changes of low density lipoprotein cholesterol, Δ HDL-C: changes of high density lipoprotein cholesterol

환에서 질병의 진행 및 심혈관 사고를 예방하는 주요 기전으로 작용하여 심혈관질환 개선 효과를 가져오는 것으로 생각할 수 있다.¹⁷⁾ 본 연구 결과에 따르면 PPAR- γ 작용제 투여 후 고밀도지단백 콜레스테롤 농도와 지질단백 a 농도는 투여 전과 유의한 차이가 없었으나 총 지질 농도, 저밀도지단백 콜레스테롤 농도, 중성 지방 농도는 투여 후 유의하게 감소하였다. 이는 Boyle 등¹⁸⁾의 연구에서 pioglitazone 투여 후 중성 지방과 저밀도지단백 콜레스테롤 농도가 유의하게 감소한 것과 동일한 결과이다.

High-sensitivity CRP(hsCRP)는 염증의 임상적인 지표이며 IL-6와 같은 전염증성 사이토카인의 자극에 의해 간에서 분비되는 급성 반응지표로서 경증도의 전신 염증을 반영하며 관상동맥질환의 예측인자이며 동맥경화진행의 지표로 알려져 있다.¹⁹⁾ Samaha 등²⁰⁾은 대사증후군환자에서 PPAR- γ 작용제인 rosiglitazone이 혈중 CRP, IL-6를 감소시킨다는 사실을 발표하였다. 본 연구에서는 염증 표식자로 hsCRP, IL-6를 측정하여 pioglitazone 투여 후 염증의 변화를 알아보고자 하였으며 그 결과 pioglitazone 투여군에서 대조군에 비하여 투여 후 hsCRP, IL-6가 통계적으로 유의하게 감소하였다.

PPAR- γ 작용제가 혈관내피세포기능에 미치는 영향에 관한 다양한 연구 결과가 있다. Caballero 등²¹⁾은 초기 또는 말기 제 2 형 당뇨병 환자에서 PPAR- γ 작용제 투여 후 상완 동맥의 혈관내피세포기능이 향상되었음을 보고하였으며 Wang 등²²⁾은 당뇨병을 동반하지 않은 대사증후군환자에서 PPAR- γ 작용제 투여 후 혈관내피세포기능이 향상되고 염증인자는 저하됨을 밝혔다. 본 연구에서도 pioglitazone 투여군에서 FMD가 대조군에 비해 유의하게 차이가 나는 것을 확인하였다. 그러나 각각의 치료 동안 nitroglycerin에 의한 상완동맥 확장은 유의한 차이가 없었으며, 각각의 기본 값에 비교하여 유의하게 증가하지는 않았다. 이는 pioglitazone이 산화질소에 대한 거대 혈관의 혈관평활근세포의 반응성을 변화시키지는 않기 때문으로 생각된다.

혈관내피세포는 다양한 혈관확장인자와 혈관수축인자의 생성과 분비를 통해 혈관 긴장도를 유지하는 작용을 한다. 혈관내피세포에서 분비되는 혈관확장인자 중 가장 중요한 것이 nitric oxide(NO)이며 NO는 혈관확장을 유지하고 혈소판과 백혈구의 응집을 방해하며 혈관평활근의 증식을 억제하여 죽상동맥경화를 예방하는 작용을 가지고 있다.²³⁾ 혈장 nitrates는 NO의 혈관 내강 내 분비 정도를 반영한다.²⁴⁾ 본 연구에서 NO의 혈관 내강 내 분비 정도를 반영한다고 밝혀진 혈장 nitrates는 pioglitazone 투여군에서 유의하게 증가하였다. 이런 결과는 PPAR- γ 작용제가 endothelial NO synthase의 발현을 변화시키지 않고서 직접 내피세포로부터 NO 분비를 증가시킨다는 Calnek 등²⁵⁾의 연구 결과와 일치하는 것으로 NO 생체활성도에 미치는 이런 pioglitazone의 직접적인 효과가 pioglitazone 투여군에서 FMD가 대조군에 비해 유의하게 호전된 것에 영향을 미쳤다고 생각된다.

G protein-coupled receptor kinases(GRK)는 베타-아드레너직 수용체의 동형 탈감작(homologous desensitization)을 일으키는 물질로서 작용제와 결합하여 활성화된 수용체만을 빠르게 인산화시켜 수용체의 기능을 조절한다. 지금까지 알려진 GRK family는 7가지로 이들 중 G Protein-coupled Receptor Kinase2(GRK2: 일반적으로 β ARK1로 알려져 있음)와 GRK5가 주로 심장에서 발현된다.²⁶⁾ Rockman 등²⁷⁾의 이전 연구에서 압력-과부하 좌심실비대가 베타-아드레너직 수용체의 탈감작과 연관이 있으며, 심근의 GRK2 활성도가 항진되어 그 결과 베타-아드레너직 시스템의 반응성이 저하됨을 밝힌바 있다. 고혈압 환자의 말초혈액 단핵구에서 GRK2 발현 및 활성도는 모두 상승되어 있으며 말초 혈액 단핵구의 GRK2 증가는 혈관의 GRK2 증가 정도와 비슷하게 변하므로, 단핵구 GRK2는 베타-아드레너직 수용체가 매개하는 혈관확장의 장애를 반영할 수 있다.²⁸⁾ 말초혈액 단핵구의 GRK2 발현의 조절은 교감 신경계의 활성화와 연관된다.²⁹⁾ 말초혈액 단핵구의 GRK2 발현이 심장의 GRK2 발현과 직접 관련되어 있음이 밝혀져 있지는 않지만 고혈압과 심부전에서는 교감 신경계 활성화와 함께 심장, 혈관 및 말초혈액 단핵구 등에서 GRK2 발현은 서로 연관되어 변한다.³⁰⁾ 교감신경계 항진을 평가하는 한 방법인 혈장 카테콜아민농도는 국소 혈액흐름과 각각의 조직의 신경 말단에서 흘러나오는(spillover) 카테콜아민 양에 영향을 받기 때문에 교감 신경계 활성화 정도를 정확히 반영하지 못하는 단점이 있다. 이런 측면에서 GRK2 농도는 외부의 다양한 자극에 대한 반응에 대해 안정적으로 변화하므로 혈장 카테콜아민 농도보다 교감신경계 활성화 정도를 더 정확하게 반영한다고 할 수 있다. 그리고, 말초혈액 단핵구는 혈액이 전신을 순환하는 동안 각각의 장기에서 자극받으므로, 전체적 교감신경계 활성화 정도를 정확히 평가하기 위해서는 말초혈액 단핵구 GRK2 발현 측정이 국소적 분비의 차이가 심한 혈장 카테콜라민 측정보다 우수하다. 본 연구에서는 교감 신경계의 활성화와 연관되어 있다고 밝혀진 말초

혈액 단핵구의 GRK2 발현을 측정하였으며 그 결과 pioglitazone 투여군과 대조군에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. PPAR- γ 작용제의 여러 가지 다양한 효과에 대해서는 잘 알려져 있으나 자율신경기능에 미치는 효과에 대해서는 연구된 바가 적은 실정이며 현재까지 사람을 대상으로 PPAR- γ 작용제의 장기 작용을 평가한 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구의 대상 군에서 치료 전과 후 말초혈액 단핵구의 GRK2 발현을 측정하였으나 차이를 발견할 수 없었다. 이는 PPAR- γ 작용제에 의한 혈관의 조절 작용은 염증반응이나 NOx를 매개로 하는 반응에 비하여 미약하거나, 환경과 장기에 따라 변화가 심한 교감신경계 활성도의 측정이 부정확한 것이 원인일 것으로 사료된다.

본 연구의 결과는 pioglitazone의 사용으로 고혈압, 고인슐린 혈증, 증가된 산화 스트레스, 당뇨병성 지질 장애 등으로 나타나는 대사증후군 환자에서 인슐린 저항성의 호전을 보이며 혈관 내피 기능을 호전시키는 효과를 가져옴을 보여주고 있다. Pioglitazone은 혈당 강화 효과뿐만 아니라 항염증 작용을 통하여 혈관 내피 기능의 호전을 가져오며 이에 따른 죽상 경화의 진행을 늦추게 되며 나아가 대사증후군의 주요 사망 원인인 심혈관계 질환의 위험을 낮추게 된다. 따라서 본 연구에서는 대사증후군 환자에 있어 심혈관계 질환의 위험을 줄이기 위하여 PPAR- γ 작용제 사용이 유용함을 보여 주고 있으며 임상에서의 적극적인 사용이 고려되어야 함에 역점을 두고 있다.

요 약

배경 및 목적 :

Nitric Oxide(NO)는 강력한 혈관확장인자로서 항동맥경화 효과가 있다. 대사증후군환자는 이런 NO 활성도가 저하되어 있으며 동반된 내피세포기능장애는 동맥경화의 중요한 초기 징후이다. 본 연구의 목적은 pioglitazone이 혈관내피세포기능에 미치는 영향을 혈장 NOx, 염증인자와 교감신경계활성화 측면에서 밝혀보고자 하는데 있다.

방 법 :

40명의 대사증후군환자를 대상으로 12주 동안 하루 1회 15 mg의 pioglitazone(PIO군, 21명) 또는 위약(PLA군, 19명)을 투여하였다. 내피세포기능을 평가하기 위해 혈관 초음파로 상완동맥에서 FMD를 측정하였다. 염증표식자로 ESR, interleukin-6, high-sensitivity C-reactive protein(hsCRP)를 측정하였으며 real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)로 임파구내 GRK2를 측정하였다.

결 과 :

12주 동안 치료 후 내피세포기능을 반영하는 충혈에 의한 유량-매개성 확장 백분율은 PIO군에서만 통계학적으로 유의하게 개선되었다($6.7 \pm 6\%$ 에서 $11.7 \pm 5\%$; $p < 0.01$). 혈장 NOx는 PIO군에서만 유의하게 증가하였고(67.7 ± 30 nmol/dL에서 92.9 ± 41 nmol/dL; $p < 0.001$). 혈장내 hsCRP와 IL-6는

PIO군에서만 유의하게 감소하였다(2.6 ± 2.3 mg/L에서 1.2 ± 1.3 mg/L, 1.7 ± 2.1 pg/mL에서 0.7 ± 0.5 pg/mL; 각각 $p < 0.05$). 그러나 임파구내 GRK2는 두 군 모두에서 유의한 차이가 없었다.

결 론 :

대사증후군환자에서 PPAR- γ 작용제투여는 혈관내피세포에서 NO 생성을 촉진하고 전염증성인자를 감소시키는 기전을 통해 혈관내피세포기능을 개선시킨다. PPAR- γ 작용제는 죽상동맥경화의 진행을 억제하는 효과가 생각된다.

중심 단어 : PPAR- γ 작용제; 대사증후군; 산화질소; 염증.

본 연구는 2003년도 대한순환기학회 산학협동연구비의 연구지원에 의해 이루어졌으며 2006년 제 55 차 미국 심장학회 학술대회(American College of Cardiology 55th Annual Scientific Session in Atlanta in March 11-14, 2006)에서 구연 발표되었습니다.

REFERENCES

- 1) Yoo TW, Sung KC, Kim YC, et al. *The relationship of the hypertension, insulin resistance, and metabolic syndrome in the serum uric acid level.* Korean Circ J 2004;34:874-82.
- 2) Matsuoka H. *Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human.* Diabetes Res Clin Pract 2001;54 (Suppl):S65-72.
- 3) Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. *The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on marker of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients.* J Am Coll Cardiol 2003;42:1757-63.
- 4) Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, et al. *Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells.* Circulation 2000;101:1539-45.
- 5) Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. *The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men.* JAMA 2002;288:2709-16.
- 6) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III).* JAMA 2001;285:2486-97.
- 7) Boyum A. *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.* Scand J Clin Lab Invest Suppl 1968;97:77-89.
- 8) Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. *Non-invasive measurement of human endothelium-dependent arterial responses: accuracy and reproducibility.* Br Heart J 1995;74:247-53.
- 9) Son JW, Koh KK, You SM, et al. *Effects of simvastatin alone or combined with ramipril on nitric oxide bioactivity and inflammation markers in hypercholesterolemic patients.* Korean Circ J 2003;33:1053-9.
- 10) Bishop-Bailey D. *Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system.* Br J Pharmacol 2000;129:823-34.
- 11) Avena R, Mitchell HE, Nylen ES, Curry DM, Sidawy AN. *Insulin action enhancement normalises brachial artery vasoactivity in patients with peripheral vascular disease and occult diabetes.* J Vasc Surg 1998;28:1024-32.
- 12) Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. *Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome.* Circulation 2000;102:42-7.
- 13) Marx N, Libby P, Plutzky J. *Peroxisome proliferator-activated*

- receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk* 2001;8:203-10.
- 14) Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000;101:235-8.
 - 15) Freed MI, Ratner R, Marcovina SM, et al. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;90:947-52.
 - 16) Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, et al. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes* 2002;51:2796-803.
 - 17) Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator activated receptor agonists. *Diabetes* 2005;54:2460-70.
 - 18) Boyle PJ, King AB, Olansky L, et al. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records. *Clin Ther* 2002;24:378-96.
 - 19) Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* 2001;104:63-7.
 - 20) Samaha FF, Szapary PO, Iqbal N, et al. Effects of rosiglitazone on lipids, adipokines, and inflammatory markers in nondiabetic patients with low HDL-C and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:624-30.
 - 21) Caballero AE, Saouaf R, Lim SC, et al. The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism* 2003;52:173-80.
 - 22) Wang TD, Chen WJ, Lin JW, Chen MF, Lee YT. Effects of rosiglitazone on endothelial function, C-reactive protein and components of the metabolic syndrome in nondiabetic patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2004;93:362-5.
 - 23) John S, Schlaich M, Langenfeld M, et al. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind Study. *Circulation* 1998;98:211-6.
 - 24) Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, et al. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans: an experimental and clinical study. *Circ Res* 1993;73:1121-7.
 - 25) Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:52-7.
 - 26) Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 1993;74:409-12.
 - 27) Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, et al. Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J Biol Chem* 1998;273:18180-4.
 - 28) Gros R, Chorazyczewski J, Meek MD, Benovic JL, Ferguson SS, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* 2000;35:38-42.
 - 29) Park SJ, Choic DJ, Kim CW. Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to β -adrenergic receptor kinase-1 (β -ARK1) in peripheral lymphocytes. *J Hypertens* 2004;22:1025-32.
 - 30) Jin BC, Park TJ, Kim EJ, et al. Novel protein interactions of G-protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) searched with yeast two-hybrid system. *Korean Circ J* 2002;32:613-22.