

# 당뇨병과 산화 스트레스: 미토콘드리아 및 NAD(P)H Oxidase에 의한 ROS의 생성과 역할

부산대학교 의학전문대학원 내과학교실<sup>1</sup>, 양산부산대학교병원 당뇨병센터<sup>2</sup>

김상수<sup>1</sup> · 손석만<sup>1,2</sup>

## Oxidative Stress and Cell Dysfunction in Diabetes: Role of ROS Produced by Mitochondria and NAD(P)H Oxidase

Sang Soo Kim<sup>1</sup>, Seok Man Son<sup>1,2</sup>

Department of Internal Medicine<sup>1</sup>, Pusan National University School of Medicine; and Diabetes Center<sup>2</sup>, Pusan National University Yangsan Hospital

### Abstract

Oxidative stress has been considered to be a major contributor to the pathogenesis of the diabetic macrovascular and microvascular complications. In the absence of an appropriate antioxidant defense mechanism, increased oxidative stress leads to the activation of stress-sensitive intracellular signaling pathways and the formation of gene products that cause damage and contribute to the late complications of diabetes. The source of reactive oxygen species (ROS) in the pancreatic beta cells and insulin sensitive cells has postulated to be the mitochondrial electron transport chain. NAD(P)H oxidase-dependent ROS production is also important as the source both in pancreatic beta cells and other cells. NAD(P)H oxidase mediated ROS can alter parameters of signal transduction, insulin secretion, insulin action, cell proliferation and cell death. Additionally, oxidative stress as the pathogenic mechanism linking insulin resistance with dysfunction of both pancreatic beta cells and endothelial cells, eventually leads to diabetes and its complications. Further investigation of the mechanisms and its therapeutic interventions based on focusing NAD(P)H oxidase associated ROS production in the islet cells and other islet cells are needed. (KOREAN DIABETES J 32:389-398, 2008)

**Key Words:** Diabetes, Mitochondria, NAD(P)H oxidase, Oxidative stress, ROS

## 서 론

관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 등과 같은 혈관 합병증이 당뇨병환자에서의 높은 사망률과 관련이 있으며, 고혈당이 이러한 혈관합병증과 직접적인 관계가 있다<sup>1,2</sup>. 최근 여러 연구에서 당뇨병 동물모델과 당뇨병환자에서 고혈당이 reactive oxygen species (ROS)를 증가시키는 것이 밝혀졌고<sup>3,4</sup>, 이런 산화 스트레스가 당뇨병에서 혈관합병증의

발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다<sup>5</sup>.

ROS로부터의 세포 또는 조직의 손상은 당뇨병뿐만 아니라 염증, 노화 관련 변성, 종양의 생성 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>. 즉 ROS의 과다한 생성과 ROS에 대한 세포 내의 적절한 방어 기전에 문제가 생길 경우, 이것이 당뇨병을 포함한 여러 질환의 병인에 직·간접적으로 관여할 것으로 생각된다<sup>7,8</sup>.

대사와 미토콘드리아의 활성도가 증가한 상태에서 생성

\* 본 연구는 부산대학교 신입교수연구비 지원으로 이루어졌음.

된 ROS로부터 많은 조직세포들은 쉽게 손상을 받게 된다. 그래서 ROS 생성과 관련된 기전을 밝혀내는 과정을 통해 산화 스트레스와 관련된 손상을 줄일 수 있는 새로운 방법들을 밝혀낼 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 산화 스트레스와 연관된 과정과 질환을 관련짓는 분자생물학적 기전이 명확히 밝혀진 것은 아니다. 본 종설에서는 미토콘드리아와 NAD(P)H oxidase를 통한 ROS의 생성 기전과 산화 스트레스에 의한 베타세포 장애 및 인슐린저항성 등에 대해 논하고자 한다.

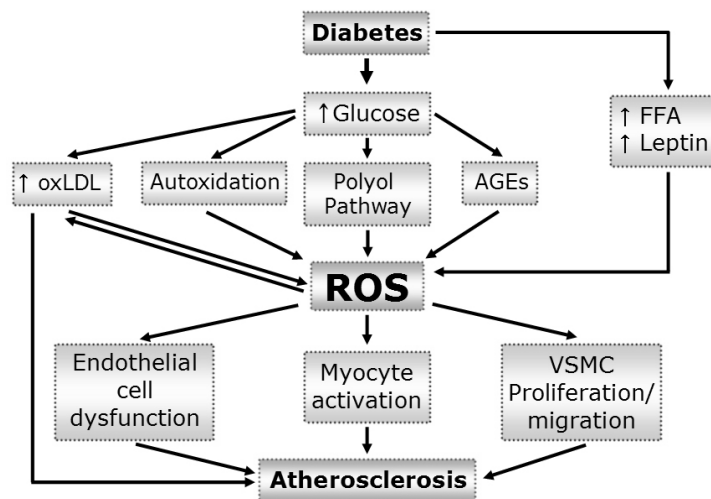
## 당뇨병에서 ROS의 생성 기전

포도당과 유리 지방산이 근육세포와 지방세포, 췌장 베타세포 및 다른 세포들에서 ROS 생성을 시작하게 한다고 알려져 있다<sup>9-11)</sup>. 당뇨병에서 ROS의 생성이 증가하고 세포 내 항산화 기전의 저하로 산화 스트레스가 증가하는 것으로 생각된다. 고혈당은 하나의 경로를 통하기보다는 다양한 경로를 통해 ROS를 생성하여 산화 스트레스를 증가시킨다 (Fig. 1). 과도한 세포 내의 포도당 대사는 알도스 환원효소, 미토콘드리아의 산화 인산화 반응, NAD(P)H oxidase의 활성화, NADPH/NADP 비율의 변화 등을 일으키게 된다<sup>6)</sup>. 최근 연구들은 이들 중 미토콘드리아의 대사와 NAD(P)H oxidase의 활성화에 의한 ROS의 생성에 초점을 두고 있다<sup>6,12,13)</sup>. 포도당에 의해 생성되는 대부분의 ROS는 미토콘드리아의 전자전달계에 의한  $\cdot\text{O}_2^-$ 의 과잉생성 때문에 만들어지는 것으로 제안되었다<sup>6)</sup>. 고혈당으로 인해 세포 내의 포도당 대사가 증가

하면 ATP 생성을 위해 미토콘드리아 전자전달계에 이용되는 NADH와  $\text{FADH}_2$ 의 생성이 증가하게 된다<sup>14)</sup>. 이로 인해 미토콘드리아에서  $\cdot\text{O}_2^-$  생성이 증가한다. 미토콘드리아에서 유도된  $\cdot\text{O}_2^-$ 은 diacylglycerol (DAG) 합성의 증가와 PKC의 활성화를 일으킨다<sup>14)</sup>. 그러나 다른 연구자들은 고혈당이 미토콘드리아의 대사와 무관하게 DAG 합성을 일으킨다고 보고하기도 했다<sup>13)</sup>.

고혈당은 추가로 다른 기전을 통해 ROS를 생성하여 산화 스트레스를 유발하게 된다. 최근 최종당화산물의 형성이 당뇨병성 혈관 합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다<sup>15)</sup>. 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGE)은 단백질의 유리 아미노기와 환원당의 케톤 혹은 알데하이드기가 비효소적 공유결합을 함으로써 형성된다. 이는 세포 외 기질과 순환 지단백을 변형시킬 뿐 아니라 혈관 세포에 있는 AGE 수용체 (receptor for AGE, RAGE)와 결합하여 죽상동맥경화증을 유발하는 것으로 알려졌다. RAGE의 자극은 NADH oxidase를 통해 ROS를 생성을 일으키고 산화-환원 민감성 전사인자의 활성화와 염증 매개체의 발현을 일으킨다<sup>16)</sup>. 제2형 당뇨병환자의 혈액 내 최종당화산물의 농도와 심혈관계질환의 유무와 중등도와 연관성이 확인되었고<sup>15)</sup>, 당뇨병성 동맥경화증의 마우스 모델에서 최종당화산물을 제거하는 약물을 투여했을 때 혈액 내와 조직에서의 최종당화산물 농도가 감소하고 동맥경화증의 진행도 억제함을 확인한 바 있다<sup>16)</sup>.

폴리올 경로의 알도스 환원효소와 소르비톨 탈수소 효소가 또한 ROS 생성에 관여한다. 알도스 환원효소는 포도당



**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.

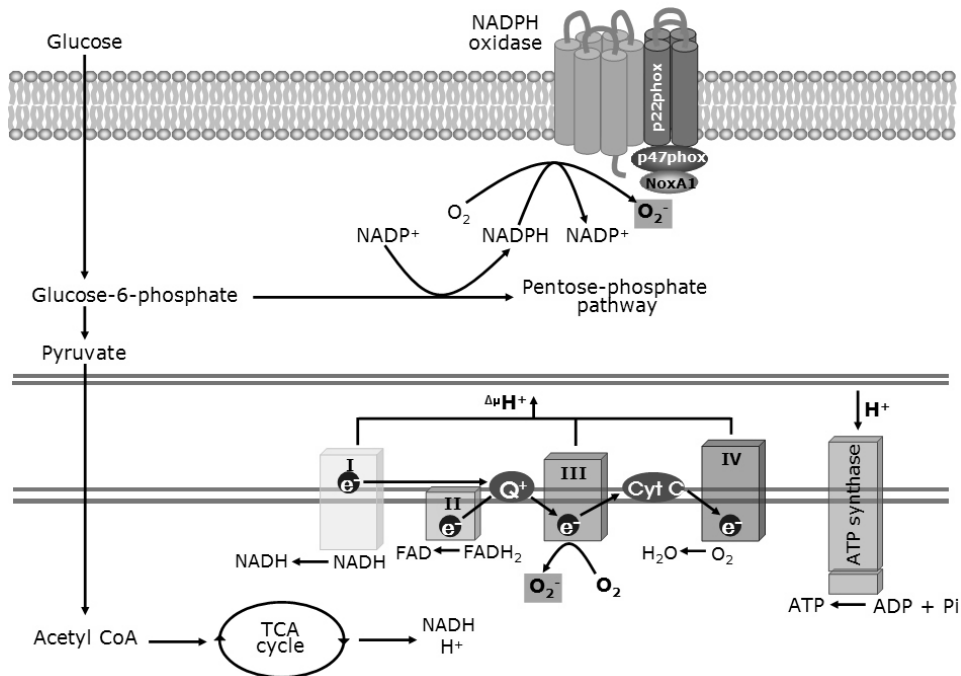
을 소르비톨로 환원시키기 위해 NADPH를 이용한다. 정상적인 환경에서는 이 알도스 환원효소에 의한 소르비톨 생성은 일부에서 발생하나, 고혈당 조건에서는 포도당의 30~50%가 이 경로에 의해 대사된다. 이 과정을 통해 NADPH의 가용성이 감소하고 글루타티온 재생과 산화질소 생성효소(NO synthase)가 감소하여 산화 스트레스가 발생한다. 소르비톨 탈수소 효소는 소르비톨을 과당으로 산화시키고 동시에 NADH를 생성한다. 증가한 NADH는 미토콘드리아의  $\cdot O_2^-$  생성을 증가시킨다<sup>17)</sup>.

렙틴은 지방세포에서 분비되어 중추신경계에 작용하여 음식 섭취를 감소시키며, 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 단핵세포 및 대식세포에도 영향을 미친다. 렙틴의 혈장 농도는 제2형 당뇨병에서 증가하여 있고 이는 심혈관질환과 연관이 있다<sup>18)</sup>. 렙틴으로 배양한 내피세포에서 ROS 생성이 증가하였으나, 그 기전은 아직 밝혀지지 않았다<sup>18,19)</sup>.

1963년 Randle은 유리 지방산이 심근과 골격근에서 먼저 산화되어 포도당 사용을 억제함을 처음으로 보였다<sup>20)</sup>. 유리 지방산의 산화가 증가하면 미토콘드리아 내의 NADH/NAD<sup>+</sup> 비가 증가하게 되고, 이는 pruvate dehydrogenase의 활성도를 감소시키고 이로 때문에 포도당 산화를 일으킨다. 따라서 유리 지방산의 대사가 증가하면 ROS의 생성이 증가하게 된다.

## 미토콘드리아에서의 ROS 생성

미토콘드리아는 세포 내에 존재하며 중요한 세포의 호기성 대사에 관여하여 생체 반응에 필수적인 ATP를 생성하는 에너지원일 뿐 아니라, 신호전달, 세포분화, 세포자멸사, 세포 주기와 성장의 조절 등 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아는 외벽과 내벽의 이중 막으로 둘러싸여 있다. 포도당, 지방 등 여러 에너지 기질이 세포질에서 피루브산과 지방산으로 대사되어 미토콘드리아로 수송되고 acetylCoA로 전환된다. AcetylCoA는 TCA 회로를 통해 NADH, FADH<sub>2</sub>의 고에너지 전자, H<sup>+</sup> 등을 내어놓는다. 내벽에 전자전달계(electron transport chain)가 있어 복합체 I에서 V까지 전자가 전달되는 과정에서 수소이온이 배출되고 이때 생성된 막 전위차를 이용하여 ATP를 형성하는 산화 인산화(oxidative phosphorylation) 과정을 이룬다. 하지만 정상적으로 수소이온이 미토콘드리아의 막 사이 공간에서 기질 내로 들어와 전압을 무너뜨리게 되는데 이는 수소이온 유출 경로(leak pathway) 또는 Uncoupling proteins (UCPs)로 알려진 통로를 통해 일어난다. 그러나 미토콘드리아는 이런 산화 인산화 과정에서 피할 수 없이 ROS 및 reactive nitrogen species를 생성하게 된다(Fig. 2). 또한 이때 형성된  $\cdot O_2^-$ 는 미토콘드리아 내의 다른 반응성 유기기(예, peroxynitrite)에 대한 주된 제공자



**Fig. 2.** Production of reactive oxygen species (ROS) in a generic cell type (Adapted from Arteriosclero Thromb Vasc Biol 24:816-23, 2004 & J Physiol 583:9-24, 2007).

역할을 하기도 한다. 이렇게 생성된 반응성 유리기들은 강력한 산화 물질로 작용한다<sup>6,7)</sup>.

UCPs은 호기성 인산화 과정을 ATP합성으로 연결하지 못하게 하는 역할을 한다. UCPs는 미토콘드리아의 내막에 있으며 기질과 막 사이의 공간을 연결해 준다. 이 과정에서 산화-환원 에너지(Redox energy)가 열로 소모되어 온도상승을 일으킨다. UCP1은 동면하는 동물, 포유류의 신생아 등에서 발견되며 세포질의 ATP에 의해 억제되고 결합저지 효과를 가지려면 기질에 지방산 음이온이 있어야 한다<sup>21)</sup>. UCP2는 인간의 11번 염색체에 발현 유전자를 가지며 고인슐린혈증, 비만 등과 연관이 있다. UCP3는 당원질을 분해하는 골격근에 발현되며 갑상선 호르몬의 체온상승 효과와 연관이 있다<sup>22)</sup>. UCPs는 미토콘드리아 내막을 통한 막 전위를 감소시켜 ATP 생성을 감소시키는 역할을 하지만 동시에 ROS 생성도 감소시킨다<sup>23)</sup>.

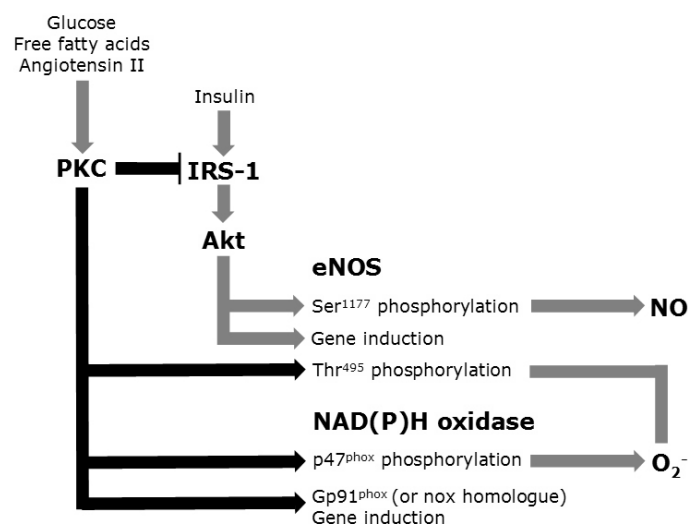
### NAD(P)H Oxidase에 의한 ROS 생성

정상적 생리 환경에서 면역체계의 포식들은 ROS를 생성하려면 NAD(P)H oxidase로 불리는 세포막의 효소 복합체가 있어야 하고, 이 ROS는 세균 등을 손상시키고 죽이는 역할을 하게 된다. 그러나 NAD(P)H oxidase가 면역계에만 국한되지 않고 산화-환원 신호 전달 기전 요소로써 베타세포를 포함한 많은 다른 세포에서도 활성화된다. 이 과정을 통해 생성된 ROS가 베타세포를 포함한 여러 세포의 장애

및 사멸 등을 유발할 것을 생각된다. 이 효소 복합체는 산소로부터 한 전자를 빼앗아 전자의 제공자로 NADPH를 사용해  $\cdot O_2^-$ 를 만든다<sup>24)</sup>. NAD(P)H oxidase는 활성화를 위한 다양한 활성체와 소단위의 종류에 따라 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 등으로 분류된다<sup>25)</sup>.

포식세포 이외의 세포에서도(베타세포 포함) NAD(P)H oxidase의 아형(예, NOX 1~3)들이 ROS의 중요한 공급자 역할을 한다. 다량의 포도당과 palmitate를 통해 배양된 대동맥 평활근세포와 혈관내피세포에서도 포식세포처럼 PKC 의존 활성화에 통해 NAD(P)H oxidase가 자극됨이 알려져 있다(Fig. 3)<sup>13,26)</sup>. 최근 연구에 따르면 제2형 당뇨병의 동물 모델로부터의 베타세포에서도 NAD(P)H oxidase 구성 요소인 gp91<sup>phox</sup>와 p22<sup>phox</sup>가 증가하여 있음을 확인했다<sup>27)</sup>. Oliveira 등은 쥐의 췌도세포에서 NAD(P)H oxidase(NOX1,2,3)의 발현이 증가하여 있음을 확인했다<sup>28)</sup>. 또한 RT-PCR을 통해 쥐의 췌도세포에서 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>의 mRNA 발현이 증가하여 있음을 확인하였다. 췌장 조직의 면역조직화학 검사에서도 p47<sup>phox</sup>가 양성으로 염색되었다. 또한 쥐의 베타세포, BRIN BD11에서도 p47<sup>phox</sup> 발현이 증명되었다<sup>29)</sup>. 포도당에 의한 ROS 생성이 GF109203X라는 PKC의 특이 억제제에 의해 부분적으로 억제되었다. 이를 통해 베타세포에서도 포도당 자극을 통한 ROS 생성이 주로 PKC 의존성 기전을 통해 일어남을 알 수 있다.

반면 NOX4는 신장, 혈관 내피세포, 파골세포, 평활근세포, 섬유모세포, 지방세포, 췌도세포, 배아 줄기세포 등 여러



**Fig. 3.** Overview of PKC-dependent activation and induction of eNOS and vascular NAD(P)H oxidase. IRS-1, insulin receptor substrate-1; eNOS, endothelial nitric oxide synthase (Adapted from Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:487-96, 2005).

세포에 존재하며 ROS를 생성한다. 그 생리적 기능과 활성 기전은 잘 알려져 있지 않다. 최근 연구에 따르면,  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide)가 이 NOX4에 의해 생성되는 주된 ROS로 생각된다<sup>30)</sup>.

ROS는 신호 전달에 있어도 여러 역할을 하는 것으로 알려졌다. 즉 세포자멸사<sup>31)</sup>, 키나아제 활성화<sup>32)</sup>, 면역반응<sup>33)</sup>, 세포의 칼슘 신호전달<sup>34)</sup>, 유전자 발현<sup>35)</sup> 등에 일부 관여한다. 예를 들어, 산화-환원 의존성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현 증가는 ROS에 의해 조절되는 유전자 발현의 한 예에 해당한다. Angiotension II, Thrombin, PDGF (Platelet-derived growth factor), TNF- $\alpha$  등은 혈관 내피세포에서 NAD(P)H oxidase의 활성화해 ROS를 생성하는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>.

미토콘드리아에서 생성된 ROS 생성은 미토콘드리아의 UCPs 활성도 조절과 세포의 에너지 대사에 중요한 역할을 하지만 NADPH oxidase에 의해 생성된 ROS는 특별히 신호 전달, 인슐린 분비 및 작용, 세포의 증식과 사멸 등에 관여할 것으로 생각된다. ROS는 DNA, 단백질, 지질 등을 산화시킴으로써 직접적으로 세포를 손상할 뿐만 아니라 NF- $\kappa$ B, p38 MAPK, JNK/SARK, hexosamine 등과 같은 다양한 스트레스에 민감한 세포 내의 신호 전달을 활성화함으로써 간접적으로 세포에 손상을 일으키기도 한다. 이런 경로의 활성화는 세포에 손상을 일으킬 수 있는 많은 수의 유전자의 생성 증가시켜 당뇨병의 만성 합병증의 원인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

## 산화 스트레스와 베타세포 손상

베타세포에서 포도당에 의한 인슐린 분비 기전은 잘 알려져 있다. 포도당은 GLUT2 수송체를 통해 베타세포 내로 운반되어 글루코키나아제에 의해 인산화되어 포도당 농도와 인슐린 분비를 연결시킨다. 베타세포에서 해당 작용이 증가하면 NADH와  $FADH_2$ 의 생성이 증가하고 이는 전자를 미토콘드리아 기질에 전달하는 역할을 하는 기전의 활성화를 증가시키고 TCA cycle 활성화를 증가시켜 미토콘드리아에서 ATP 생성을 증가시키고 세포질에서 ADP에 대한 ATP 비를 증가시킨다. 이는 ATP 감수성 칼륨 통로 ( $K^{ATP}$ )를 차단하고 이 때문에 칼륨 이온이 세포 밖으로 유출되는 것을 방지하여 세포막이 탈분극을 일으키고 이어서 세포막의 전압의존성 칼슘 통로를 개방하고 세포 내로 칼슘 이온이 유입된다. 세포 내 칼슘의 증가는 이후 과립 전위와 세포 외 방출을 통해 인슐린을 분비하게 된다<sup>37,38)</sup>.

많은 다른 세포와 달리 베타세포는 산화 손상으로 말미암은 세포사멸에 민감한 것으로 알려져 있다. 이는 베타세포의 미토콘드리아에서 ROS가 많이 생성되고 증가한 베타세포 NAD(P)H oxidase 활성화를 통해 추가적인 ROS 생성이 생기며 항산화 방어기전에 문제가 발생하는 등이 이유일 것으로 생각된다<sup>39)</sup>. 대부분의 다른 세포와는 대조적으로 베타세포에서 포도당 농도가 상승하면 해당 작용의 유입이 급속히 그리고 비례적으로 증가한다. 이는 포도당에 의한 ROS 생성을 증가시키게 한다. 베타세포에서 세포 내 칼슘 이온 농도의 상승이 일어나면 인슐린 분비가 일어나는 것이 주기적이지만, 세포 내 칼슘 이온 농도가 더 상승하게 되면 미토콘드리아에서 ROS 생성을 자극하게 된다. 또한 PKC 활성화를 통해 칼슘 이온은 NAD(P)H oxidase 의존성 ROS 생성을 자극하게 되고 이 때문에 산화 스트레스와 베타세포 사멸을 일으키게 된다<sup>29,40)</sup>. 또한 베타세포에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, thioredoxin 등과 같은 산화-환원 반응을 조절하여 ROS를 해독시켜 항산화 효과를 가지는 효소의 상대적인 농도가 적다. 이런 해독 효소의 부족 때문에 칼슘 이온은 미토콘드리아와 NAD(P)H oxidase 시스템을 자극하게 되고, 베타세포에서 ROS 농도가 급속히 상승하게 되고 쉽게 손상을 일으킬 만한 농도에 이르게 된다.

## 베타세포와 UCPs

췌장 베타세포에서 UCP2의 발현과 그 대사 조절 기능에 대해서는 이미 알려진 바 있다<sup>41)</sup>. 하지만 UCPs의 모든 생리적 기능이 밝혀진 것은 아니다. 미토콘드리아에서 생성된  $\cdot O_2^-$ 는 UCP2 활성화에 있어 활성체로 작용하고, UCP2가 활성화되면  $H^+$ 가 미토콘드리아 내막을 통해 쉽게 빠져나오고,  $\cdot O_2^-$  생성과 ATP 합성이 감소하게 된다.

인슐린 분비의 1단계는 전적으로 ATP/ADP 비에 의존하기 때문에 처음에는 인슐린 분비는 완전히 장애를 받지 않는다. 그러나 칼슘 이온과 미토콘드리아에서 생성된 인자들 (glutamate, citrate, acyl-CoA, NADPH)이 인슐린 분비의 2단계(이는 ATP/ADP 비 변화에 덜 민감하다)에 필요로 한다. 정상적인 포도당과 유리 지방산의 공급 시에는 TCA 회로를 통해 NADH,  $FADH_2$ 가 생성되고 이는 전자전달계를 통해 ATP합성을 위해 이용된다. 증가한 ATP/ADP 비는 세포 내의 칼슘 이온 농도를 증가시켜 1단계의 인슐린 분비를 유발한다. 하지만 지속적으로 고혈당이나 유리 지방산에 노출되었을 때 지속적으로 인슐린 분비를 유지하고 ATP/ADP

비를 유지하기 위해  $\cdot\text{O}_2^-$ 와 UCP 활성화가 증가하게 된다. 이렇게 되면  $\text{O}_2$  소모가 증가하게 되고 지속적인  $\cdot\text{O}_2^-$  생성과 UCP 활성화로 말미암은 과도한  $\text{H}^+$  유출의 결과로 ATP가 떨어지고 결과적으로 베타세포 사멸을 유발하게 된다<sup>41)</sup>.

몇몇 연구에 의하면 만성적인 고혈당은 인슐린 분비에 장애를 일으키는데, 이는 고혈당이 과도한  $\cdot\text{O}_2^-$ 의 생성, UCP2의 활성화, 감소한 미토콘드리아의 막 전위 등과 관련이 있다고 보고하고 있다<sup>42)</sup>. UCP2 결손 마우스 모델의 췌도세포에서 만성적인 고혈당의 노출 후 포도당에 의한 인슐린 분비가 유지되었으며, 내부의  $\cdot\text{O}_2^-$ 를 제거했을 때는 고혈당으로 인한 베타세포의 인슐린 분비의 장애 및 손실을 막을 수 있었다고 보고된 바 있다<sup>43,44)</sup>.

## ROS 생성과 인슐린저항성

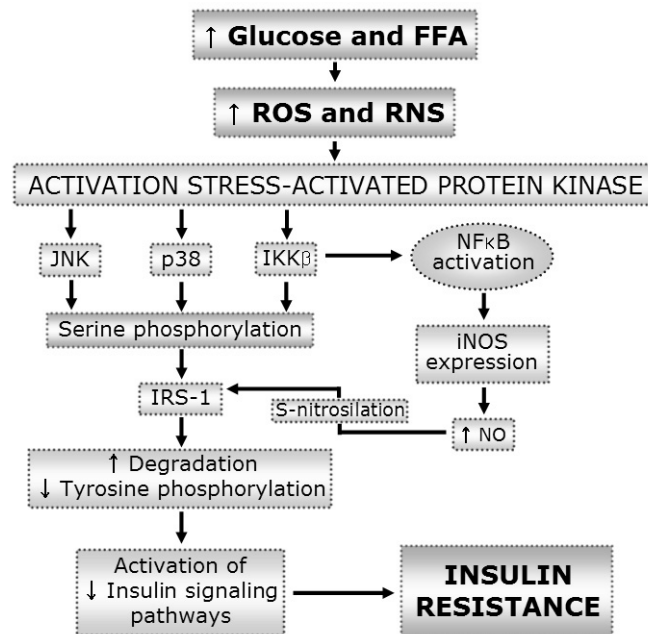
인슐린저항성은 비만, 대사 증후군, 제2형 당뇨병 등과 같은 여러 대사 질환에서 중추적인 역할을 한다. 이런 대사 질환에서 혈중에 혈당과 유리 지방산의 상승과 노출된 세포와 조직에 산화 스트레스의 상승이 동시에 존재한다<sup>45)</sup>. 이에 산화 스트레스가 인슐린저항성과 연관이 있음이 밝혀진 바 있다<sup>46)</sup>. 생체 내에서 세포 내 신호 전달에 산화 스트레스에 의한 변화가 만성적 염증과 인슐린저항성을 일으킨다는

강력한 증거들이 있다<sup>8,10)</sup>.

인슐린저항성 발생에는 표적세포 내의 여러 작용과 관련하여 다양한 신호 전달 체계와 이런 신호전달 체계들 사이의 복잡한 연관성이 관찰되고 있다.

인슐린이 인슐린수용체와 결합하면 내재성 티로신 키나아제의 활성도를 증가시키고 수용체의 인산화를 촉진해 IRS-1, 2를 인산화 시킨다<sup>47)</sup>. 인산화된 IRS는 PI3K를 활성화하고 이는 serine/threonine kinase인 Akt/PKB와 GLUT-4를 차례로 활성화해, 인슐린의 세포 내의 작용이 일어난다<sup>47,48)</sup>. 현재까지 많은 연구에도 인슐린저항성을 일으키는 세포학적 기전은 잘 알려져 있지 않은데, IRS-1의 세린 (serine) 인산화의 증가가 중요한 원인이라고 보고하고 있다<sup>49)</sup>.

인슐린 신호전달 체계에서 IRS의 티로신 인산화를 억제하여 인슐린저항성을 유발하는 기전이 알려져 있는데, 이중 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)에 의한 IR과 IRS의 탈인산화와 IRS의 세린 인산화의 증가가 중요한 기전으로 알려져 있다<sup>50,51)</sup>. 특히 IRS-1의 Ser612의 인산화는 IRS-1으로부터의 PI3K의 p85 소단위의 해리를 일으켜 더 하부로의 신호 전달이 일어나지 않도록 유도하고<sup>52)</sup>, IRS-1의 Ser307의 인산화는 IR로부터 해리를 일으켜 proteasome 의존성 분해를 촉진함으로써 신호 전달 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>53,54)</sup>.



**Fig. 4.** Induction of insulin resistance by oxidative stress. FFA, free fatty acid; ROS, Reactive oxygen species; RNS, Reactive nitrogen species; IRS-1, insulin receptor substrate-1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide (Adapted from J Physiol 583:9-24, 2007).

세포에서 산화 스트레스에 의한 인슐린저항성을 일으키는 기전은 복잡하다. ROS는 JNK, NF- $\kappa$ B, p38MAPK 등과 같은 스트레스민감성 serine/threonine kinase 신호 전달 경로를 활성화해 인슐린수용체, IRS 단백 등을 포함한 여러 표적을 차례로 인산화시킨다. 즉 산화 스트레스가 IRS-1의 serin/threonine 인산화 증가를 일으키고 Akt/PKB의 활성화를 포함한 인슐린 작용의 장애를 일으킨다고 보고되고 있다<sup>55)</sup>.

Hydrogen peroxide를 여러 세포에 노출했을 때 c-Jun N-terminal kinase, p38, I $\kappa$ B kinase, extracellular receptor kinase 1/2 등과 같은 스트레스 키나아제가 활성화되었고 이는 인슐린저항성을 동반하였다<sup>56)</sup>. 몇몇 스트레스 민감성 키나아제들이 IRS 단백 또는 NF $\kappa$ B activating kinase, p38 MAPK, JNK/SAPK, PKC와 같은 경로에 영향을 미쳐 인슐린 신호 전달을 약화시켜 인슐린저항성을 일으키는 것 같다 (Fig. 4).

JNK 경로의 활성화는 인슐린의 유전자 발현을 감소시키고 인슐린의 작용을 방해한다. 비만 당뇨 마우스 모델에서 이 경로를 차단했을 때 산화 스트레스로부터 베타세포를 보호할 수 있었다<sup>57)</sup>. C-Jun N-terminal kinase에는 몇 개의 아형이 있지만, JNK1이 제2형 당뇨병에서 발견된 인슐린저항성과 베타세포 기능 부전의 진행에 중요한 매개체로 생각된다<sup>58)</sup>. IRS-1 serine 307 인산화가 ad-DN-JNK 처치 마우스 모델에서 현저히 감소하여 있었다. 그리고 이 마우스에서 IRS-1 티로신과 Akt/PKB serine 473 인산화가 증가하여 있었다<sup>59)</sup>. 그러므로 IRS-1 serine 인산화의 증가가 JNK 과다 발현에 의해 발생한 인슐린저항성과 밀접한 연관성이 있는 것으로 생각된다.

추가적인 스트레스감수성 키나아제들이 IRS에 매개되어 인슐린저항성에 관여하는 것으로 보고되고 있다. Mammalian target of rapamycin (mTOR), PKC의 몇몇 동종효소 (PKC $\beta$ , PKC $\delta$ )<sup>60,61)</sup>, IKK $\beta$ -NF $\kappa$ B 신호전달계 등<sup>62)</sup>이 이에 해당한다. 이런 키나아제가 일단 활성화되면 인슐린수용체, IRS-1, IRS-2와 같은 IRS 단백을 포함한 여러 표적이 인산화된다.

## 결 론

최근 ROS가 제2형 당뇨병의 발병 및 합병증 발생에 중요한 요인 중 하나로 여겨지고 있다. 베타세포에서 미토콘드리아 및 NAD(P)H oxidase에 의한 ROS의 생성에 의한 베타세포의 손상 기전을 볼 때 이 부분을 목표로 한 치료적 접근이 베타세포 보존에 이점을 제공해 줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한 산화 스트레스 유발 인슐린저항성의 병인론

에 있어 JNK, IKK, PKC, 다른 스트레스 및 염증관련 키나아제의 활성화가 중요한 역할을 할 것이라는 증거들이 제기되는 바 이것들이 인슐린감수성을 증가시킬 수 있는 매력적인 약물치료의 목표가 될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 329:977-86, 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* 352:837-53, 1998
3. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P: *Myocardial cell death in human diabetes*. *Circ Res* 87:1123-32, 2000
4. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: *Hydroxy radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing*. *Biochem J* 256:205-12, 1988
5. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautler JL, Stern D: *Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions*. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 14: 1521-8, 1994
6. 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
7. Turrens JF: *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. *J Physiol* 552:335-44, 2003
8. Fridlyand LE, Philipson LH: *Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches*. *Ann N Y Acad Sci*

- 1066:136-51, 2005.
9. Talior I, Yarkoni M, Bashan N, Eldar-Finkelman H: *Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC- $\delta$  activation in adipocytes of obese, insulin resistant mice. Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E295-302, 2003
10. Brownlee M: *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes* 54:1615-25, 2005
11. Haber EP, Procopio J, Carvalho CR, Carpinelli AR, Newsholme P, Curi R: *New insights into fatty acid modulation of pancreatic  $\beta$ -cell function. Int Rev Cytol* 248:1-41, 2006
12. Griendling KK, FitzGerald GA: *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. Circulation* 108:2034-40, 2003
13. 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 fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes* 49:1939-45, 2000
14. Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Griendling KK: *Oxidative Stress and diabetic vascular complications. Curr Diab Rep* 4:247-52, 2004
15. 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
16. 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* 4:1025-30, 1998
17. 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* 17:417-25, 2003
18. 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* 35:92-6, 2003
19. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R: *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. FASEB J* 13:1231-8, 1999
20. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA: *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet* 1:785-9, 1963
21. Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek P: *On the mechanism of fatty acid-induced protein transport by mitochondrial uncoupling protein. J Biol Chem* 271:2615-20, 1996
22. Jaburek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA, Garlid KD: *Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. J Biol Chem* 274:26003-7, 1999
23. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett* 416:15-8, 1997
24. Babior BM: *NADPH oxidase. Curr Opin Immunol* 16:42-7, 2004
25. Lyle AN, Griendling KK: *Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. Physiology* 21:269-80, 2006
26. Rask-Madsen C, King GL: *Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:487-96, 2005
27. Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H: *Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. Biochem Biophys Res Commun* 332:927-33, 2005
28. Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR: *Pancreatic  $\beta$ -cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. Diabetes* 52:1457-63, 2003

29. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR: *Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal  $\beta$  cell line.* *Diabetologia* 50:359-69, 2007
30. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Forro L, Schlegel W, Krause KH: *NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation.* *Biochem J* 406:105-14, 2007
31. Irani K: *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.* *Circ Res* 87:179-83, 2000
32. Lo YY, Wong JM, Cruz TF: *Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases.* *J Biol Chem* 271:15703-7, 1996
33. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007
34. Bedard K, Krause KH: *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* *Physiol Rev* 87:245-313, 2007
35. Schoonbroodt S, Piette J: *Oxidative stress interference with the nuclear factor- $\kappa$  B activation pathways.* *Biochem Pharmacol* 60:1075-83, 2000
36. Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander RW, Griendling KK: *Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1142-7, 2005
37. Newsholme P, Brennan L, Bender K: *Amino acid metabolism,  $\beta$ -cell function, and diabetes.* *Diabetes* 55(Suppl 2):S39-47, 2006
38. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG: *Life and death decisions of the pancreatic  $\beta$ -cell: the role of fatty acids.* *Clin Sci (Lond)* 112:27-42, 2007
39. Kahn SE: *The relative contributions of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes.* *Diabetologia* 46:3-19, 2003
40. Yu JH, Kim KH, Kim H: *Role of NADPH oxidase and calcium in cerulein-induced apoptosis: involvement of apoptosis-inducing factor.* *Ann N Y Acad Sci* 1090:292-7, 2006
41. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R: *Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity.* *J Physiol* 583:9-24, 2007
42. McQuaid TS, Saleh MC, Joseph JW, Gyulkhandanyan A, Manning-Fox JE, MacLellan JD, Wheeler MB, Chan CB: *cAMP-mediated signaling normalizes glucose-stimulated insulin secretion in uncoupling protein-2 overexpressing  $\beta$ -cells.* *J Endocrinol* 190:669-80, 2006
43. Chan CB, Kashemsant N: *Regulation of insulin secretion by uncoupling protein.* *Biochem Soc Trans* 34:802-5, 2006
44. Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB: *Endogenous islet uncoupling protein-2 expression and loss of glucose homeostasis in ob/ob mice.* *J Endocrinol* 190:659-67, 2006
45. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y: *Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance.* *Int J Biochem Cell Biol* 38:782-93, 2006
46. Paolisso G, Giugliano D: *Oxidative stress and insulin action: Is there a relationship?* *Diabetologia* 39: 357-63, 1996
47. Cheatham B, Kahn CR: *Insulin action and the insulin signaling network.* *Endocr Rev* 16:117-42, 1995
48. Chen R, Kim O, Yang J: *Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation.* *J Biol Chem* 276:31858-62, 2001
49. Sykietis GP, Papavassiliou AG: *Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1; a novel target for the reversal of insulin resistance.* *Mol Endocrinol* 15: 1864-9, 2001
50. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA: *Modulation of insulin-stimulated degradation of*

- human insulin receptor substrate-1 by serine 312 phosphorylation. J Biol Chem* 278:8199-11, 2003
51. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ: *Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissue of MSG-rats. Life Sci* 73: 1369-81, 2003
52. De Fea K, Roth RA: *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. Biochemistry* 36:12939-47, 1997
53. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem* 277:1531-7, 2002
54. Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM: *Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. Diabetes* 50:24-31, 2001
55. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF: *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. Biochimie* 87:99-109, 2005
56. Bloch-Damti A, Potashnik R, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Rudich A, Bashan N: *Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress. Diabetologia* 49:2463-73, 2006
57. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC: *Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. J Biol Chem* 277:30010-8, 2002
58. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS: *A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature* 420:333-6, 2002
59. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M: *Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. J Biol Chem* 279:45803-9, 2004
60. Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S: *Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. Cell Physiol Biochem* 16:217-28, 2005
61. Greene MW, Ruhoff MS, Roth RA, Kim JA, Quon MJ, Krause JA: *PKC $\delta$ -mediated IRS-1 Ser24 phosphorylation negatively regulates IRS-1 function. Biochem Biophys Res Commun* 349:976-86, 2006
62. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ & Ye J: *Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor  $\kappa$  B kinase complex. J Biol Chem* 277:48115-21, 2002