

당뇨병 유발 백서에서 알파-리포산의 피하신경과 미세혈관 보존효과

전북대학교병원 내분비대사내과, 전북대학교 의과대학 대학원, 임상의학 연구소¹, 전주 예수병원²

박명한¹ · 진흥용 · 송선경² · 강선미 · 김소영 · 박지현 · 백홍선 · 박태선

The Effect of Alpha-Lipoic Acid on the Protection of Epidermal Nerve Fibers and Microcapillaries in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Ming Han Piao¹, Heung Yong Jin, Sun Kyung Song², Seun Mi Kang, So Young Kim, Ji Hyun Park, Hong Sun Baek, Tae Sun Park

Division of Endocrinology & Metabolism, Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Hospital; Department of Medicine of the Graduate School and Research Institute of Clinical Medicine, Chonbuk National University²; Jeon Ju Jesus Hospital²

Abstract

Background: Diabetic neuropathy is associated with risk factors for macrovascular diseases and other microvascular complications. Alpha-lipoic acid (ALA) administration has been reported to improve metabolic abnormalities and ameliorate peripheral polyneuropathy in diabetic patients. In addition, ALA improves endoneurial nutritive neural blood flow and nerve conduction velocity in diabetic rats. But it is not clear whether ALA has a preservation effect on microvasculature in addition to the effect on intraepidermal nerve fibers (IENFs). We investigated the effect of ALA on intraepidermal nerve fiber density (numbers/mm) and cutaneous capillary length in streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods: The rats were randomly divided into 3 groups: diabetes without diet control, diabetes with diet control, and diabetes with ALA treatment. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg) and the effect of ALA treatment was assessed by IENF immunostained with protein gene product 9.5 and by quantification of total cutaneous capillary length with mouse anti-rat reca-1 immunostaining.

Results: The value of IENF density significantly increased in ALA treatment group compared with other groups ($P < 0.05$). Quantification of microvasculature was also significantly increased in ALA treatment group compared with other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study suggest that ALA administration in diabetic rats may be beneficial in the prevention of peripheral neuropathy associated with improvement of microvasculature. And the symptomatic amelioration after ALA treatment may be attributed to this morphological improvement. (J Kor Diabetes Assoc 31:488~497, 2007)

Key Words: Alpha-Lipoic Acid, Diabetic Neuropathy, Intraepidermal Nerve Fiber, Microvasculature

서 론

당뇨병성 신경병증은 병인과 동반된 증상이 다양하며 여러 가지 형태로 분류될 수 있는 미세 혈관성 만성합병증이다^{1,2)}. 이 중 원위부 대칭성 다발성 신경병증은 가장 흔한

신경병증으로 당뇨병환자의 50% 이상에서 이로 인한 증상을 호소하고 있다. 이러한 증상은 일상생활의 저해를 야기할 만큼 고통스러우나 아직까지 만족할 만한 치료방법이 없는 실정이다^{3,4)}. 따라서, 최근 보고되는 병인론적 발생기전에 근거한 새로운 치료에 대한 결과들은 엄격한 혈당조절

및 대증적인 증상 완화와 함께 당뇨병성 신경병증의 새로운 치료 전략으로 받아들여지고 있다.

당뇨병성 신경병증의 병인론 중 산화스트레스와 항산화 방어기전에 대해서는 많은 연구들이 보고되어 있고 실제 당뇨병성 말초신경병증에서 항산화제 사용이 말초신경손상의 방지 및 회복에 도움이 된다고 알려져 있다⁵⁾. 이는 다양한 산화스트레스들이 당뇨병에서 증가되어 있으며, 고혈당 및 포도당의 자가산화와 비효소적 당화의 증가, 그 외 유리지방 산이 이러한 산화스트레스의 발생에 관여하기 때문이다^{6,7)}. 또한 생성된 혈관조직의 과산화물 음이온은 내피세포의 사멸에 영향을 미치는 중요한 산화스트레스로 알려져 있으며^{8,9)}, 증가된 과산화물 음이온은 산화질소와 반응하여 과산화질소를 형성한 후 혈관 이완반응의 장애, 내피세포의 고사를 야기한다고 밝혀져 있다^{10,11)}.

항산화제 중 알파-리포산은 강력한 항산화제의 하나로 당뇨병환자에서 친지방 유리의 제거와 조직 내 산화성 스트레스의 감소를 통해 당뇨병성 신경병증의 증상을 개선시킨다고 알려져 있다¹²⁾. 그러나, 알파-리포산의 이러한 효과는 말초신경 외에 혈관내피세포의 사멸을 예방하여 혈관기능도 동시에 향상시킬 수 있음을 추정해 볼 수 있으며, 이의 확인을 위해서 당뇨병성 신경병증에서 신경 손상의 정도를 피부 생검 후 피하신경을 PGP (protein gene product) 9.5 면역염색을 이용해 평가하듯이 미세혈관에 대한 효과도 형태학적으로 관찰되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 알파-리포산 투여에 따른 말초신경의 변화와 이와 더불어 피부 미세혈관에 대한 보존효과를 피부 면역조직화학검사를 통해 같이 확인함으로써 당뇨병성 신경병증에서 알파-리포산의 투여 효과를 형태학적으로 보여 주고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

생후 6주의 Male Sprague-Dawley (SD) rat를 구입하여 (다물사이언스, 한국) 환경에 적응시키기 위해 10일간 사육한 후 체중이 190~210 g인 쥐들을 난괴법에 의하여 당뇨병군, 식이제한 당뇨병군, 알파-리포산(ALA, VIATRIS GmbH & Co, KG, Germany) 투여 당뇨병군의 3군으로 구분하였다. 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 streptozotocin (STZ; Sigma)을 60 mg/kg의 용량으로 용해하여 복강 내에 주사하여 당뇨병을 유발하였고 STZ를 주사한 다음 48시간 후 꼬리에서 채혈한 혈액의 혈당이 300 mg/dL 이상인 쥐를 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였다. 당뇨병 유발 후 3주간 혈당상태가 높게 유지되고 있음을 확인한 후 실험을 시작하였고 식이는 0.5% ALA 투여군의 경우 쥐 가루사료에 0.5% ALA를 균일하게 섞어 16주간 먹였으며 식이제한 당뇨병군은

전날 ALA 투여군이 먹은 양을 측정하여 동일한 양을 먹였다. 식이 섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였다.

2. 혈당 및 체중 측정

혈당과 체중은 실험시작일부터 2주 간격으로 측정하였고 혈당측정은 간이혈당측정기인 Accutrend™ (Therasense inc Alameda, CA)을 이용하여 6시간 금식한 후 꼬리에서 채혈하여 측정하였다.

3. 인슐린 및 C-peptide 측정

인슐린 및 C-peptide를 측정하기 위하여 실험 시작 8주, 16주에 금식 8시간 후 에테르 마취 하에 꼬리정맥에서 혈액을 1.2 mL를 채취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 Radioimmunoassay (Neodine Laboratories, Seoul, Korea)를 통해 정량하였다.

4. 경구 당부하 검사

경구 당부하 검사는 16주에 12시간 공복 후 실시하였다. 쥐들을 에테르로 마취한 뒤 도관을 이용하여 50% 포도당 용액으로 1.5 g/kg양을 경구로 투여하였으며 당부하 전과 30분, 60분, 90분, 120분째 꼬리에서 채혈한 혈액을 이용해 혈당을 측정하였다. 당-부하 검사 동안에 모든 쥐는 물만 먹을 수 있도록 하였다.

5. 인슐린 내성검사

경구 당부하 검사 후 다음날 12시간 공복상태에서 인슐린 내성검사를 시행하였다. 쥐를 인슐린 주사 직전에 채혈하여 채혈 즉시 혈당을 측정하고 인슐린 0.75 U/kg (Humulin R, Eli Lilly Co., Indianapolis)을 복강을 통해 주사 한 후 30분, 60분, 90분, 120분, 180분에 꼬리에서 채혈하였으며, 채혈 즉시 혈당을 측정하였다.

6. 췌장 소도의 분리

췌장 소도를 SD rat에서 collagenase digestion방법으로 분리하였고¹³⁾ 분리한 췌장 소도를 RPMI-1640 (RPMI-1640 containing 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin) 배양용액에 넣어 95% O₂, 5% CO₂, 37℃의 배양기에서 하룻밤 배양하였다.

7. 인슐린분비능 측정

췌장 소도를 3 mM D-glucose를 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate buffer (25 mM Hepes, 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 5mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, and 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4) 용액으로 세 번 세척한 후 20 mM D-glucose가 포함된 용액에서 ELISA를 이용

하여 배지에 있는 인슐린 함량을 각각 측정하였다¹⁴⁾.

8. 면역조직화학 염색

ALA투여 16주째 쥐의 오른쪽 발가락 위 피부를 적출하여 PLP (2% paraformaldehyde, 0.075 M lysine, 0.05 M phosphate buffer pH 7.4, 0.01 M sodium m-periodate) 고정액에 24시간 동안 고정하였다. 고정한 조직을 phosphate buffer saline (PBS) 세척 후 20% glycerol-0.1M phosphate buffer 에 4℃에서 2일간 담궈 두었다. PBS (phosphate buffered saline) 세척 후 냉동 방어제인 Tissue-tec® OTC compound (Miles, Elkhart, IN)에 담궈 액체질소로 신속히 얼린 후, 동결절편 박절기인 Leica CM 1510®을 이용하여 40 µm 두께로 절단하였다. PBS로 충분히 세척한 후 비특이적인 단백질과의 결합을 방지하기 위하여 조직을 3% goat serum을 함유한 Protein Block Serum-Free (Dako, Carpinteria, CA) 용액에 담궈 30분간 반응시킨 후 일차항체인 rabbit anti-rat PGP 9.5 (Biogenesis, Poole, UK)를 1:150으로 1% goat serum을 함유한 항체 희석(Dako, Carpinteria, CA)용액에 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 충분히 세척한 후 5% horse serum을 함유한 Protein Block Serum-Free 용액에 담궈 30분간 반응시킨 후 다른 일차항체 mouse anti-rat reca-1 (AbD Serotec MCA970R, Kidlington, UK)를 1:100으로 1% horse를 함유한 항체 희석용액에 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 충분히 세척한 후 goat anti-rabbit IgG-FITC (1:200, Vector, Laboratories Ltd., UK), horse anti-mouse IgG-(H+L) (1:200, Vector, Laboratories Ltd., UK)를 1% goat serum, 1% horse serum을 함유한 항체 희석용액에 희석하여 30분간 반응시키고 PBS로 충분히 세척하고 Fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, CA)으로 봉입하였으며, 이차항체 이후의 조작은 빛을 차단 후 시행하였다.

9. 피하신경 및 혈관의 반정량적 측정

각 피부 조직의 염색 슬라이드는 디지털 사진기가 부착된 Axioskop 2 형광 현미경(Carl Zeiss, Goettingen, Germany)과 현미경 프로그램 Axiovision 5.1을 사용하여 사진을 찍어 컴퓨터에 저장하여 이미지 분석에 이용하였다. PGP 9.5에 면역 반응한 신경섬유의 수는 100배의 배율로 이미지 분석 프로그램(Image Processing Tool Kit 5.0 Reindeer

Games Inc, Asheville, NC)을 이용하여 염색된 말초신경의 수를 측정하였고¹⁵⁾, 진피에서 표피로 통과한 신경을 표피의 신경섬유 수로 정의하였으며 표피 내에서 분지한 신경섬유는 하나로 측정하고 표피-진피 접합부에서 추적할 수 없는 신경은 포함하지 않았다. 표피의 신경섬유 수는 숙련된 동일인이 측정 하였고, 표피 내 신경밀도는 표피의 단위 길이에 있는 신경 섬유의 수(numbers/mm)로 표시하였다. 각 피부 조직의 염색 슬라이드에서 염색된 혈관의 길이는 100배의 배율로 신경 섬유 관찰에 사용되었던 이미지 분석 프로그램을 이용하였으며 1 mm 내의 혈관 길이를 측정한 후 길이의 총합으로 표시하였다(mm/mm²).

10. 통계분석

자료분석은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하였으며 실험결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 집단 간의 표피 신경섬유밀도 및 혈관 길이의 비교는 one-way ANOVA with Duncan's post-hoc test를 이용하여 분석하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 식이 섭취량과 체중 및 공복 시 혈당의 변화

실험동물들의 식이 섭취량은(Table 1)과 같았으며 실험 기간 동안 알파-리포산을 투여한 당뇨병군과 식이제한을 했던 당뇨병군 간에 실험기간 동안 의미 있는 체중의 차이를 보이지 않았고 이들은 식이제한을 하지 않았던 당뇨병군에 비해서는 의미 있는 체중의 감소를 보였다(Fig. 1A). 공복 시 혈당은 당뇨병 유발군들 모두에서 높게 유지되었으나 4주 후부터 식이제한 당뇨병군과 알파-리포산 투여 당뇨병군의 공복 시 혈당은 식이제한을 하지 않은 당뇨병군보다 의미 있게 감소하였다(Fig. 1B).

2. 경구 당-부하에 따른 혈당농도 및 인슐린 내성검사

16주 후에 시행한 경구 당부하 검사상 알파-리포산 투여군의 경구 당부하검사에 따른 혈당은 다른 두 군보다 의미 있게 낮았다(Fig. 2A). 인슐린 투여에 따른 혈당은 알파-리포산 투여군이 식이제한 당뇨병군과 통계적으로 의미는 없었으나 더 낮은 경향을 보였고 식이 제한을 하지 않은 당뇨병군보다는 의미있게 낮았다(Fig. 2B).

Table 1. Mean food intake in the experimental animals

Group	DM without diet control	DM with diet control	DM with ALA
Food intake (g/day)	40 ± 0.3	23 ± 0.4	23 ± 0.4

All values are presented as mean ± SD. N = 5 in each group. DM, STZ-induced diabetes mellitus; ALA, Alpha- Lipoic Acid; STZ, Streptozotocin.

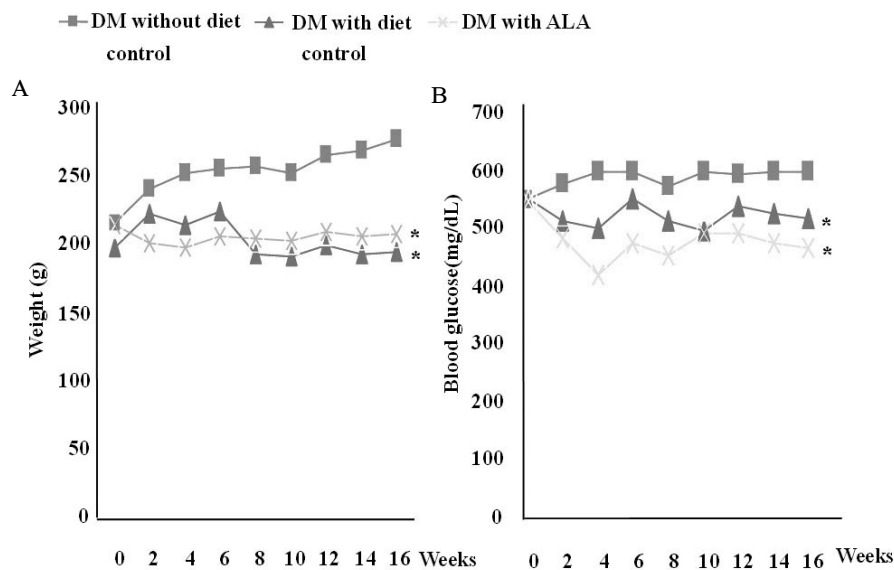


Fig. 1. A. Body weight changes of animals according to the management in the experimental period. B. Fasting blood glucose levels of animals according to the management in the experimental period. N = 5 in each group. ALA, alpha lipoic acid. * $P < 0.05$ vs DM without diet control.

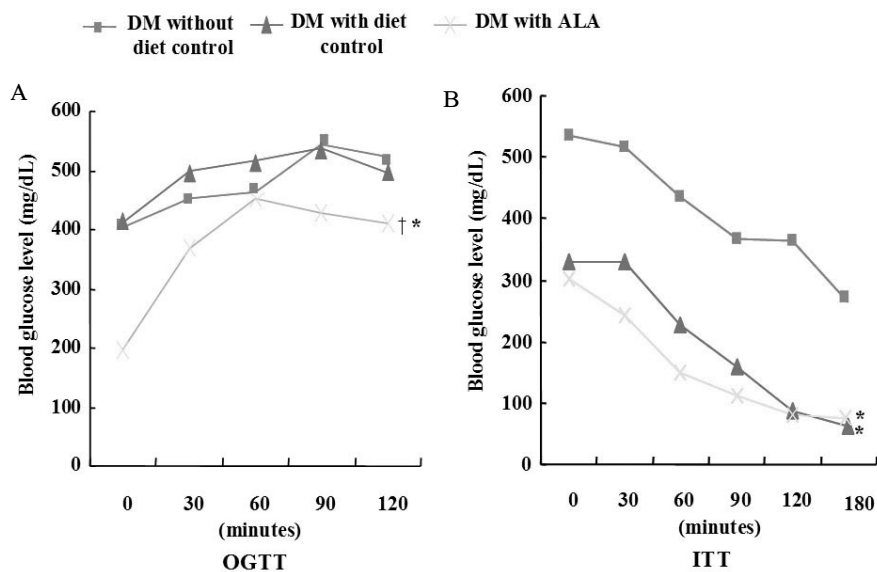


Fig. 2. A. Blood glucose level after oral glucose challenge according to the management in the experimental period. B. Blood glucose level after intraperitoneal insulin challenge according to the management in the experimental period. N = 5 in each group. ALA, alpha-lipoic Acid; ITT, insulin tolerance test. * $P < 0.05$ vs. DM without diet control. † $P < 0.05$ vs. DM with diet control.

3. 분리된 췌장 소도의 인슐린분비능

혈중 인슐린과 C-peptide의 농도는 알파-리포산을 투여했던 당뇨병군에서 다른 당뇨병군들보다 낮게 측정되어(Table 2) 혈당 농도와 측정된 인슐린 농도가 췌장 소도의 인슐린 분비능과 관련이 있는지 부가적으로 알아 보았다. 분리된

각 군의 췌장 소도를 20 mM D-glucose가 포함된 용액을 통해 인슐린이 분비된 정도를 측정하였고 알파-리포산 투여 군에서 측정된 인슐린의 분비능은 감소된 혈중 인슐린 농도와 달리 식이제한을 하지 않은 당뇨병군보다 높게 유지되어 있었고 식이 제한을 했던 당뇨병군과는 의미있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

Table 2. Insulin and C-peptide levels of experimental animals

	Insulin (uU/mL)		C-peptide (ng/mL)	
	8 week	16 week	8 week	16 week
DM without diet control	8.65 ± 6.87	11.87 ± 4.01	0.39 ± 0.08	0.67 ± 0.33
DM with diet control	6.73 ± 3.21	9.42 ± 7.00	0.32 ± 0.14	0.53 ± 0.32
DM with ALA	2.28 ± 1.38 ^{*,†}	2.9 ± 1.35 ^{*,†}	0.17 ± 0.03 [†]	0.12 ± 0.03 ^{*,†}

All values are presented as mean ± SD. N = 5 in each group. DM, STZ-induced diabetes mellitus; ALA, Alpha Lipoic Acid; STZ, streptozotocin. * $P < 0.05$ vs. DM without diet control. † $P < 0.05$ vs. DM with diet control.

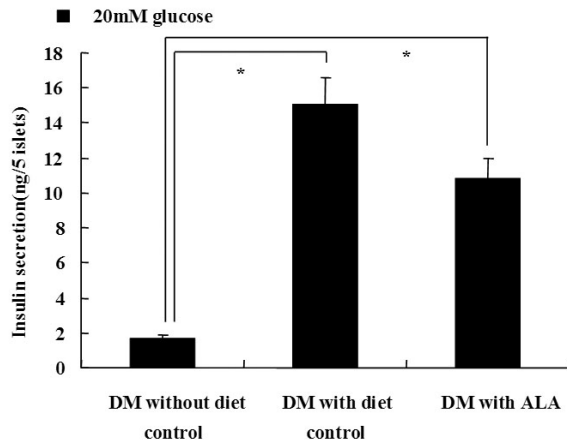


Fig. 3. The level of insulin secretion in the isolated beta cell in response to 20 mM glucose medium. All values are presented as mean ± SD. N = 5 in each group. ALA, alpha-lipoic Acid. * $P < 0.05$ vs. DM without diet control.

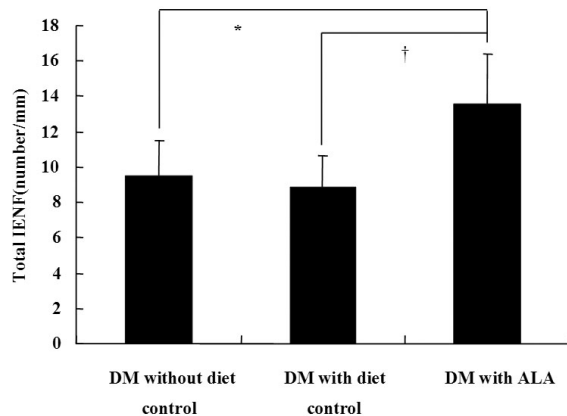


Fig. 4. Intraepidermal nerve fiber density according to the experimental group. N= 5 in each group. ALA, alpha lipoic acid. * $P < 0.05$ vs. DM without diet control. † $P < 0.05$ vs. DM with diet control.

4. 표피 신경 섬유 밀도

실험 시작 16주째 실험 쥐들의 발가락 위 피부 면역조직 화학염색에 의해 나타난 표피신경의 밀도(numbers/mm)는 식이제한을 하지 않은 당뇨병군은 9.5 ± 2.0 , 식이제한 당뇨병군은 8.8 ± 1.7 , 알파-리포산 투여 당뇨병군은 13.6 ± 2.8

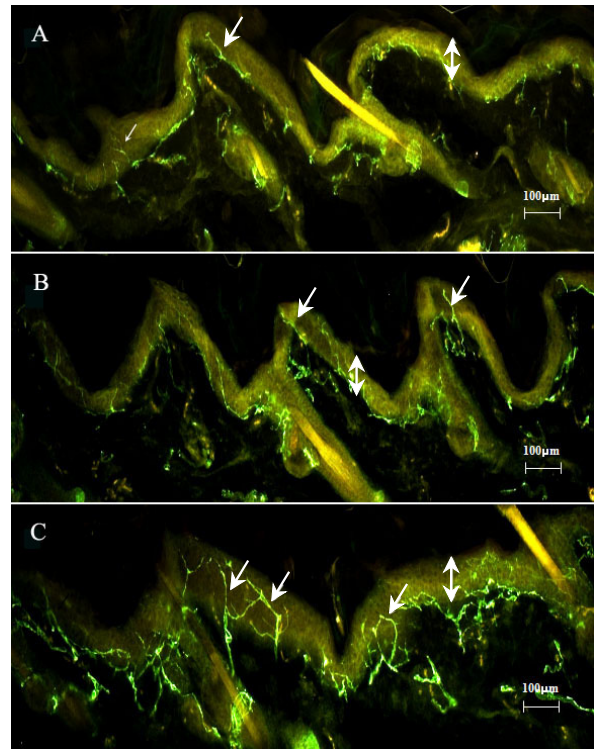


Fig. 5. Morphological changes of dermal and epidermal nerve fibers according to the management. A. DM without diet control group. B. DM with diet control group. C. DM with ALA treatment group. ↔ Arrow indicates epidermis. → Arrow indicates intraepidermal nerve fiber (×100).

로 알파-리포산 투여 당뇨병군에서 신경섬유의 밀도가 가장 높게 측정되었다($P < 0.05$) (Fig. 4, 5).

5. 미세혈관의 길이

실험 쥐들의 발가락 위 피부의 면역조직화학염색에 의해 나타난 피부 1 mm 내 피부혈관 길이의 총합(mm/mm²)은 식이제한을 하지 않은 당뇨병군은 1.75 ± 0.33 , 식이제한 당뇨병군은 2.14 ± 0.70 , 알파-리포산 투여 당뇨병군은 3.11 ± 1.42 로 알파-리포산 투여군에서 다른 두 군보다 의미 있게 증가되었다($P < 0.05$) (Fig. 6, 7).

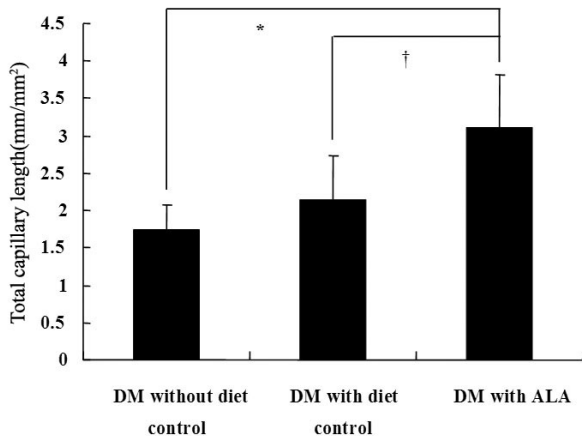


Fig. 6. Total capillary length according to the experimental group. N = 5 in each group. ALA, alpha lipoic acid. * $P < 0.05$ vs. DM without diet control; † $P < 0.05$ vs. DM with diet control.

고 찰

당뇨병성 신경병증은 아직 원인 및 진단, 치료에 있어서 많은 한계점을 가지고 있고 이중 말초신경병증은 보고에 따라 다양한 유병률을 보이지만 신경병증이 동반된 환자의 10~20%는 심한 증상을 경험할 뿐만 아니라, 삶의 질적인 면 외에 생존율에도 영향을 미친다^{3,4)}. 당뇨병의 미세혈관성 만성합병증인 당뇨병성 신경병증은 원위부 대칭성 다발성 신경병증이 가장 흔한 형태이며 아직 병인은 잘 모르지만 대사성과 혈관성 원인 인자들이 관련되어 있으리라 추정된다. 또한 이와 관련하여 많은 가설들과 치료 전략들이 시도되고 있으나 아직까지 만족스럽지 못한 현실이다.

당뇨병성 신경병증의 기본적 병인은 고혈당으로 인한 산화 스트레스를 포함한 대사성 변화가 혈관계, 특히 내피혈관의 기능부전을 야기하고 이는 혈액순환의 장애와 저산소증을 야기해 신경손상까지 초래할 수 있다는 것이다¹⁶⁻¹⁸⁾. 이러한 신경로의 혈액순환장애와 미세혈류장애는 스트레스 상황에서 탄력적인 혈관확장의 저해가 관여될 수 있고 이에 유리기와 같은 산화스트레스가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다¹⁹⁾. 여러 연구에서 당뇨병환자와 당뇨병 동물 모델에서 고혈당으로 인한 반응성 산소유리기의 증가가 밝혀졌고^{20,21)} 혈관조직의 내피세포, 평활근세포, 대동맥 외막의 섬유아세포에서도 반응성 산소유리기 등의 산화스트레스가 증가된다고 보고되고 있다²²⁻²⁴⁾. 이로 인해 신경의 퇴행적 변화가 초래될 수 있고 당뇨병성 신경병증에서는 말초에 있는 무수신경 말단에서부터 이러한 손상이 시작되는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 또한 당뇨병성 신경병증에서의 산화스트레스는 신경영양인자의 결핍에 중요한 역할을 하고 이는 혈관의 기능 이상과 신경병증을 유발하는 병리학적 변화와 연관된다는 여러 실험적, 임상적 증거들이 보고되고 있다^{26,27)}.

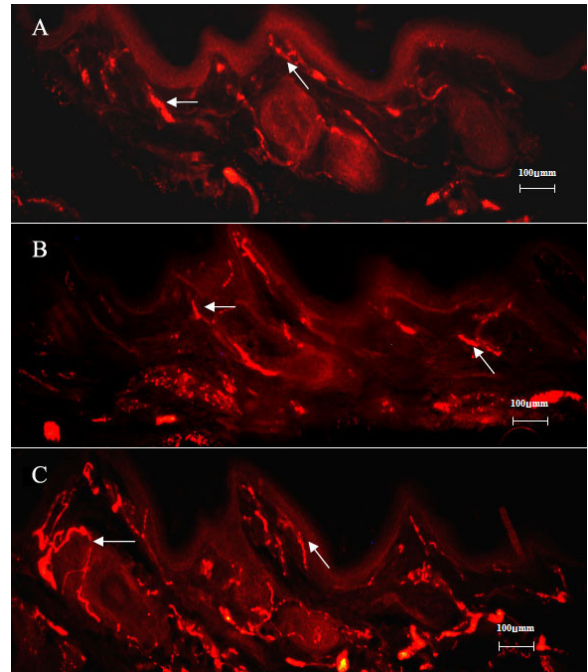


Fig. 7. Morphological changes of dermal and epidermal blood vessels according to the management in the experimental animals shown by endothelial cell antibody RECA-1 immunostaining. A. DM without diet control group. B. DM with diet control group. C. DM with ALA treatment group. ALA, alpha lipoic acid. → Arrow indicates cutaneous capillary (×100).

다만 이러한 당뇨병성 신경병증을 진단할 때는 피부 말초신경이 감각신경 말단의 손상에 대한 보상을 위해 손상 받은 부위 외의 다른 곳에서 수상돌기가 나타남을 고려해 PGP 9.5와 같은 특별한 항체를 이용한 신경 면역염색으로 정량적이며 정성적인 평가가 필요하다²⁸⁾. 따라서 본 실험에서도 아직까지 말초신경에서의 사이토카인을 포함한 다양한 관련 요소들의 측정이 한계가 있는 점을 고려해 직접 말초신경의 형태학적 소견을 관찰하였다.

당뇨병성 신경병증의 치료에 사용되는 약제는 통증을 경감시키는 대증적 약제와 병인에 따른 치료제로 나눌 수 있고 알도스 환원효소 억제제, 감마 리놀렌산, 알파-리포산 등은 병인에 따른 치료제에 속한다²⁹⁻³²⁾. 이중 알파 리포산은 항산화제로서 친지방 유리기의 제거와 조직 내 산화성 스트레스를 줄이는데 효과가 있는 것으로 알려져 있고 동시에 당뇨병성 신경병증의 증상 개선에 탁월한 효과가 있다고 보고되고 있다^{33,34)}. 다만 알파-리포산의 작용 기전에 대해서는 아직 여러 가지 가설들이 제시되고 있고 이중 유리기의 제거를 통한 산화스트레스의 감소가 당뇨병성 신경병증 치료제의 근거로서 가장 유력한 가설로 여겨지고 있다. 강력한 항산화제인 알파-리포산은 유리 산화기의 제거를 통해 신경병증의 증상을 해소시킬 수 있고 이러한 증상의 개선

은 말초신경의 병인론적인 개선과 함께 혈류의 증가, 특히 미세혈관의 손상을 호전시킴으로써 조직 내 관류를 증가 시킨다고 보고되고 있다³⁵⁾. 본 연구에서도 알파-리포산을 투여한 당뇨병군에서 피하신경과 함께 미세혈관이 의미있게 보존된 결과를 확인할 수 있었고 이는 추가적인 조사를 통해 혈류개선에 의한 이차적인 호전인지 혹은 다른 매개체와 연관된 결과인지 확인되어야 한다. 물론 신경 및 혈관의 분포는 3차원적인 구조로 진행하기 때문에 슬라이드상에서 관찰되는 단면으로 정확히 측정하기는 어려운 한계점이 있음을 고려해야 하지만 일반적으로 받아들여지고 있는 당뇨병성 신경병증의 진단 및 효과 판정에서의 표피 1 mm 내 신경섬유 숫자인 표피 내 신경밀도는 알파-리포산 효과를 형태학적으로 보여줄 수 있었고 미세혈관에 미치는 영향도 염색방법만 다를 뿐 같은 방법으로 확인할 수 있었다. 다만 이러한 효과에 대해 사이토카인이나 수용체 등을 포함한 정확한 관련 요소 및 기전에 대해서도 조사가 필요하고 혈관과 신경에 미치는 효과에 있어서 선후관계 및 이들 각각에 미치는 영향에 대해서도 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다. 또한 알파-리포산의 투여는 용량에 따라 혈당 및 체중에 영향을 미칠 수 있으므로 이에 의한 이차적인 치료 효과도 고려되어야 한다. 그외 16주의 혈당변화가 말초신경의 변화를 어느 정도 일으킬 수 있는지에 대한 영향도 고려되어야 하나 이는 전류자극 역치의 변화로써 간접적으로 판단하였고 저자들은 이전 연구에서 알파-리포산의 투여로 표피 신경의 보존과 전류자극 역치의 증가를 억제시킬 수 있음을 이미 관찰하였다. 본 연구에서는 추가적으로 미세혈관과의 관계 및 이에 미치는 영향을 관찰할 수 있었다.

저자들은 실험결과에서 알파-리포산 투여군의 혈당상태가식이 제한 당뇨병군과 유사하나 혈중 인슐린 및 C-peptide 가 낮게 측정되어서 이에 대한 설명을 위해 본 실험과의 직접적인 관련은 없으나 부가적으로 췌장의 인슐린분비를 확인해 보고자 하였다. 물론 항산화제인 알파-리포산이 포도당 흡수의 자극제로서 당뇨병 치료의 강력한 약제로 사용될 수 있을 것으로 생각되고 있고 본 연구에서도 알파-리포산 투여군이식이 제한 당뇨병군에 비하여 혈중 인슐린은 감소하였으나 분리된 췌장 소도의 인슐린분비능은 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이로 미루어 볼 때 본 연구에서 사용한 streptozotocin이 췌장 외 효과로 인슐린저항성을 유발시킬 수 있고 그 기전에 대해서는 아직 명확하지 않으나 초래된 고혈당 자체가 인슐린저항성을 유발하거나 혹은 streptozotocin이 직접 세포 내 protein-tyrosine phosphatase의 작용을 비가역적으로 억제하여 발생시키는 것으로 알려져 있고³⁶⁻⁴⁰⁾, 이러한 원인과 측정된 혈당농도 및 인슐린농도를 고려해 볼 때 알파-리포산이 인슐린감수성을 증가시킴으로써 췌장소도의 인슐린분비능을 보존하는 효과도 가능하리라 추정해 볼 수 있다. 또 Targonsky 등⁴¹⁾이

알파-리포산은 췌장 베타 세포에서 AMPK를 활성화하여 인슐린분비와 양 그리고 세포성장을 감소시킨다고 보고한 바 있어, 고혈당 상태의 동물 모델에서 알파-리포산 투여 후 인슐린감수성 증가 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 실험기간 동안 알파-리포산을 투여한 당뇨병군 체중은 식이제한을 하지 않은 당뇨병군보다 의미 있는 감소를 보였는데 이 결과는 실험이 진행함에 따라 알파-리포산 투여군에서의 식이 섭취량 감소와 이로 인한 비만증 및 인슐린저항성 개선에 따른 유익한 변화가 일어날 가능성을 시사할 수 있고 이는 Kim 등⁴²⁾의 동물모델에서 알파-리포산 처리 후 체중감소를 보인 결과나 알파-리포산이 시상하부에 작용하여 AMPK 활성을 저하시킴으로써 식욕억제 및 대사촉진 작용을 유발하여 항비만 효과를 나타낼 수 있다는 연구 결과들을 통해 간접적으로 설명될 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 알파-리포산 투여가 streptozotocin 투여로 당뇨병이 유발된 백서에서 피하신경과 함께 미세혈관을 보존 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 부가적으로 췌장 소도의 인슐린분비능 보존 및 인슐린감수성 증가를 통한 대사성 효과를 확인할 수 있었다. 정확한 기전을 규명하기 위하여 사이토카인이나 염증표지자 등을 포함한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

연구배경: 당뇨병성 신경병증은 대혈관 합병증과도 관련 있는 흔한 미세혈관 합병증으로 당뇨병환자의 생존율에도 영향을 줄 수 있는 위험 요소이다. 알파-리포산은 이러한 당뇨병성 신경병증의 치료제로 사용되고 있는 강력한 항산화제 중 하나로 신경전도와 혈류개선에 효과가 있다고 알려져 있으나 아직까지 피하신경 외에 미세혈관에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 알파-리포산이 당뇨병이 유발된 실험동물에서 말초신경과 미세혈관에 미치는 영향을 형태학적으로 보고자 하였다.

방법: Streptozotocin을 투여한 당뇨병 유발 백서에서 알파-리포산 투여 당뇨병군과 식이제한 당뇨병군 및 당뇨병 대조군에서 알파 리포산 투여 후 매 2주 마다 공복혈당을 측정하였고 8주와 16주에 혈중 인슐린과 C-peptide를 측정하였으며 16주에 췌장 소도 인슐린분비능 및 발가락 피부의 면역조직화학검사를 시행하여 표피신경섬유와 미세혈관의 형태학적 변화를 관찰하였다.

결과: 공복 시 혈당은 4주 후부터는식이 제한군과 알파-리포산 투여군에서식이제한을 하지 않은 군보다 낮게 측정되었다. 혈중 인슐린과 C-peptide의 농도는 알파-리포산을 투여했던 군에서 다른 군들보다 낮게 측정되었으나 알파-리포산 투여군 췌장 소도에서 측정된 인슐린의 분비능은식이 제한을 했던 군보다는 낮게 측정되었지만식이제한을 하지

않은 군보다 높게 유지되어 있었다. 알파-리포산 투여군에서 다른 두 군보다 진피에서 표피로 통과하는 신경섬유의 수가 유의하게 증가되었고($P < 0.05$) 또한 1 mm^2 내 총 미세혈관의 길이도 유의하게 높게 확인되었다($P < 0.05$).

결론: 이상의 결과로써 알파-리포산이 당뇨병성 신경병증 동물 모델에서 말초신경 및 미세혈관에 대해 보존효과가 있는 것으로 생각되며 더불어 인슐린감수성의 호전과 췌도 베타세포의 보호에도 효과가 있을 것으로 추정되지만 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

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 complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 329:977-86, 1993
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: *Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)*. *Lancet* 352:837-53, 1998
3. Parry GJ: *Management of diabetic neuropathy*. *Am J Med* 107:27s-33s, 1999
4. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM: *Diabetic Somatic Neuropathies*. *Diabetes Care* 27:1458-86, 2004
5. Ziegler D, Gries FA: *Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy*. *Diabetes* 46 (Suppl 2):S62-6, 1997
6. 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* 269:9889-97, 1994
7. Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Taylor WR, Griending KK: *Oxidative stress and diabetic vascular complications*. *Curr Diab Rep* 4:247-52, 2004
8. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA: *Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium*. *Hypertension* 33:1353-58, 1999
9. Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL: *Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis*. *Circ Res* 82:1298-305, 1998
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* 49:1939-45, 2000
11. Zou MH, Shi C, Cohen RA: *High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells*. *Diabetes* 51:198-203, 2002
12. Ziegler D, Nowak H, Kempner P, Vargha P, Low PA: *Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis*. *Diabet Med* 21:114-21, 2004
13. Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, Chung MY: *Role of Ca^{2+} in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage*. *Biochim Biophys Acta* 1227:87-91, 1994
14. Park BH, Rho HW, Park JW, Cho CG, Kim JS, Chung HT, Kim HR: *Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage*. *Biochem Biophys Res Commun* 5:1-6, 1995
15. Wild R, Ramakrishnan S, Sedgewick J, Griffioen AW: *Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density*. *Microvasc Res* 59:368-76, 2000
16. Low PA, Nickander KK: *Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes*. *Diabetes* 40:873-77, 1991
17. Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, Low PA: *Effect of alpha-tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve*. *J Neurol Sci* 126:6-14, 1994
18. Cameron NE, Cotter MA: *The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications*. *Diabetes Metab Rev*

- 10:189-224, 1994
19. 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
20. 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
21. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: *Hydroxy radical production and autoxidative glycosylation: glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging.* *Biochem J* 256:205-12, 1988
22. Matsubara T, Ziff M: *Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines.* *J Immunol* 137:3295-8, 1986
23. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.* *Cir Res* 74:1141-8, 1994
24. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK: *Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts.* *Hypertension* 32:331-7, 1998
25. Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV: *The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy.* *Nature Medicine* 2:703-7, 1996
26. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL: *Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy.* *Eur J Pharmacol* 375: 217-23, 1999
27. Sima AA: *New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy.* *Cell Mol Life Sci* 60:2445-64, 2003.
28. Wang L, Hilliges M, Jernberg T: *Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin.* *Cell Tissue Res* 261:25-33, 1990
29. Masson EA, Boulton AJ: *Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic neuropathy. A review of the rationale and clinical evidence.* *Drugs* 39:190-202, 1990
30. Ziegler D, Mayer P, Rathmann W, Gries FA: *One-year treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, in diabetic neuropathy.* *Diabetes Res Clin Pract* 14:63-73, 1991
31. Jamal GA: *The use of gamma linolenic acid in the prevention and treatment of diabetic neuropathy.* *Diabet Med* 11:145-9, 1994
32. Veresiu IA: *Treatment of diabetic polyneuropathy with alpha-lipoic acid is evidence based.* *Rom J Intern Med* 42:293-9, 2004
33. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA: *Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis.* *Diabet Med* 21:114-21, 2004
34. Tankova T, Cherninkova S, Koev D: *Treatment for diabetic mononeuropathy with alpha-lipoic acid.* *Int J Clin Pract* 59:645-50, 2005
35. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T: *Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux.* *Diabetologia* 38:201-10, 1995
36. Tominaga M, Kimura M, Sugiyama K, Abe T, Igarashi K, Igarashi M, Eguchi H, Sekikawa A, Ogawa A, Manaka H: *Effects of seishin-renshi-in and Gymnema sylvestre on insulin resistance in streptozotocin-induced diabetic rats.* *Diabetes Res Clin Pract* 29:11-7, 1995
37. Kim YW, Kim JY, Lee SK: *Effects of phlorizin and acipimox on insulin resistance in STZ-diabetic rats.* *J Korean Med Sci* 10:24-30, 1995
38. Sanchez-Arias JA, Sanchez-Gutierrez JC, Guadano A, Alvarez JF, Samper B, Mato JM, Feliu JE: *Impairment of glycosyl-phosphatidylinositol-dependent insulin signaling system in isolated rat hepatocytes by streptozotocin-induced diabetes.* *Endocrinology* 131: 1727-33, 1992
39. Ahmad F, Goldstein BJ: *Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes.* *Am J Physiol* 268:932-40, 1995
40. Bonini JA, Colca J, Hofmann C: *Altered expression of insulin signaling components in streptozotocin-treated rats.* *Biochem Biophys Res Commun* 212: 933-38, 1995
41. Targonsky ED, Dai F, Koshkin V, Karaman GT,

- Gyulkhandanyan AV, Zhang Y, Chan CB, Wheeler MB: *alpha-lipoic acid regulates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells. Diabetologia* 49:1587-98, 2006
42. Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU: *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nat Med* 10:727-33, 2004