

## 제2형 당뇨병환자에서 알도스 환원효소 유전자의 (A-C)<sub>n</sub> 반복다형성과 당뇨병성 신경병증 발현의 연관성

서울대학교 의과대학 내과학교실

정인경, 박경수, 문민경, 김재현, 신찬수, 김성연, 이흥규

The Association of Aldose Reductase Gene Polymorphisms with Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes

In-Kyong Jeong, Kyong Soo Park, Min Kyong Moon, Jae Hyeon Kim, Chan Soo Shin, Seong Yeon Kim, Hong Kyu Lee

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

### Abstract

**Background:** Previous studies have suggested that polymorphisms in and around the aldose reductase (AR) gene are associated with the development of diabetic microvascular disease. This study explored the hypothesis that the polymorphisms of the (A-C)<sub>n</sub> dinucleotide repeat sequence, located at 2.1 kilobase (kb) upstream of the transcription start site of AR gene, modulate the risk of diabetic neuropathy (DN).

**Methods:** 66 patients with DN, 30 without microvascular complications (MC) after 20 years of diabetes, and 87 normal healthy controls were studied. To test highly polymorphic microsatellite marker 2.1 kb upstream of the initiation site of the AR gene, we performed polymerase chain reaction using the primer labeled with fluorescent dye and GeneScan by ABI prism 377 automated DNA sequencer and ABI Genotyper software 2.0.

**Results:** Seven alleles (Z-6, Z-4, Z-2, Z, Z+2, Z+4 and Z+6) were identified. Z-2 allele was more frequently observed in patients with DN (77.3%) than in those without MC (43.3%,  $P = 0.007$ ). The subgroup of patients who developed DN within 5 years after the diagnosis of diabetes also had higher frequency of Z-2 allele (91.7%) compared to those without MC (43.3%,  $P = 0.028$ ). On the contrary, Z+6 allele tended to be more frequent in patients without MC (10.0%) than in those with DN (0%,  $P = 0.063$ ).

**Conclusion:** These results support the hypothesis that environmental-genetic interactions may modulate the risk of neuropathy in patients with diabetes. Particularly, the Z-2 allele, in the presence of diabetes, may be associated with the development of DN. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:274-283, 2007)

**Key Words:** Diabetic neuropathy, Microsatellite, polymorphism, (A-C)<sub>n</sub> dinucleotide

## 서 론

신경병증은 당뇨병의 매우 흔한 합병증이지만<sup>1,2)</sup> 고혈당이 어떻게 당뇨병성 신경병증을 유발하는지는 아직 명백하지 않다. 현재 당뇨병성 신경병증의 발생기전으로 대사적 요인과 혈관적 요인이 대표적으로 대두되고 있는데<sup>3-6)</sup> 대사적 요인 중에서는 특히 폴리올 대사과정과 그 산물인 소르비톨이 당뇨병성 신경병증과 관계있다는 많은 증거들이 축

적되어 왔다<sup>7-9)</sup>. 폴리올 대사과정은 속도제한효소인 알도스 환원효소를 이용하여 포도당을 과당으로 전환하는 과정이며, 당뇨병이 생기면 이 대사과정의 활성이 증가되어 세포 내 소르비톨의 축적이 생기고 결국 조직의 저산소증을 유발하는 대사적 이상을 초래하게 된다<sup>10-13)</sup>.

최근에는 당뇨병성 신경병증이 고혈당이라는 환경적 요인뿐만이 아니라 유전적인 소인에 의해 그 발생이 증가될 수 있다는 가능성이 제시되었고<sup>14)</sup> 특히 알도스 환원효소의

유전자위가 주요 관심 대상이 되었다. 알도스 환원효소의 과도발현을 유발하도록 형질전환 쥐(transgenic mice)를 만들어 관찰하였을 때 당뇨병의 미세혈관 합병증이 증가됨을 알 수 있었다<sup>15,16</sup>. 또한 인간에서 알도스 환원효소 유전자 발현의 이질성이 알려져 있고 당뇨병성 미세혈관 합병증을 가지는 경우 그렇지 않은 경우에 비해 알도스 환원효소의 활성이나 mRNA 발현이 증가한다는 보고도 있었다<sup>17-19</sup>.

알도스 환원효소의 유전자 서열은 다양한 조직에서 발견되며 7번 염색체의장완에 위치하고 18 kb 크기에 총 10개의 엑손(exon)으로 이루어져 있다<sup>20-24</sup>. 이런 알도스 환원효소 유전자의 다형성이 제1형 당뇨병의 미세혈관 합병증과 연관성이 있다는 보고가 있었고, 최근 알도스 환원효소 유전자의 전사 시작 부위에서 2.1 kb 위쪽에 위치하는 (A-C)n 다이뉴클레오타이드 반복(microsatellite)의 다형성이 제1형 당뇨병환자의 미세혈관 합병증과 연관 있음이 알려졌다<sup>25-30</sup>. 또한 중국계의 제2형 당뇨병환자에서 당뇨병성 망막병증의 조기발생과 상기 microsatellite의 다형성이 연관되어 있음이 보고되었고<sup>31</sup>, 제2형 당뇨병을 가지는 Pima 인디언에서 sib-pair linkage analysis를 통해 당뇨병성 신증과 알도스 환원효소 유전자 위치에 인접한 표지자와의 연관성을 관찰할 수 있었다<sup>32</sup>. 그러나 제2형 당뇨병환자에서 신경병증의 위험도와 알도스 환원효소의 이런 유전적 인자가 어떤 연관이 있는지에 대해서는 연구가 많지 않아<sup>33</sup>, 본 연구에서는 한국인을 대상으로 알도스 환원효소 유전자와 인접해 있는 microsatellite의 다형성과 당뇨병성 신경병증의 감수성이 어떤 연관성을 가지는지 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

#### 1) 환자군

서울대학교병원 내과에 추적 관찰 중인 제2형 당뇨병환자로서 지난 3개월 동안 HbA1c가 8.5% 미만인 경우를 대상으로 선별하였다. 제2형 당뇨병은 1) 진단 당시의 연령이 30세 이상이고, 2) 당뇨병성 케톤산증의 병력이 없고, 3) c-peptide가 0.4 이상이며, 4) 혈당조절을 위해 혈당강화제를 사용 중이며, 5) 인슐린을 사용 중인 경우 인슐린 사용시작이 당뇨병 진단으로부터 최소한 1년 이후인 경우로 정하였다.

#### (1) 당뇨병성 신경병증을 가진 제2형 당뇨병환자군

망막증이나 신증 없이 신경병증 합병증만 갖고 있는 당뇨병환자들을 선별하기 위해 안저검사가 정상이고 24시간 소변 요알부민 배설이 정상인 당뇨병환자들 중에서 신경병증 존재 여부를 조사하였다. 당뇨병성 신경병증 진단 기준이 확립되어 있지 않았기 때문에, 저자들은 보다 명확한 당

뇨병성 신경병증 환자를 선별하기 위하여 다음 세가지를 모두 만족하는 경우로 진단기준을 삼았다. 첫째, 당뇨병 이외에 말초신경병증의 다른 뚜렷한 원인이 없고, 둘째, 다음 세가지 임상 소견들 중 적어도 2가지 이상을 만족하고 즉 1) 통증, 저린감, 이상감각, 감각둔화 등의 신경병증 감각증상, 2) 신경학적 검사상 심부진 반사 저하, 3) pin-prick과 진동에 대한 감각저하, 셋째, 신경전도속도검사에서 당뇨병성 다발성 신경병증에 합당한 소견을 보이는 경우로 하였다.

#### (2) 미세혈관 합병증이 없는 제2형 당뇨병환자군

당뇨병의 이환기간이 20년 이상이면서 안저검사에서 정상소견을 보이고 24시간 소변 검사에서 요알부민 배설이 정상이며 당뇨병성 신경병증이 없는 경우를 미세혈관 합병증이 없는 환자군으로 정의하였다.

### 2) 정상 대조군의 선정

정상 대조군으로는 보라매시립병원 건강검진센터를 방문한 40세 이상의 환자 중 당뇨병을 비롯하여 특이질환의 병력이 없고 신경학적 증상이 없으며 혈액검사에서 정상으로 판명된 환자를 대상으로 하였다.

### 3) 임상지표의 측정

환자의 과거력, 흡연력, 심혈관계 증상, 혈압 등을 확인하고 안저검사, 24시간 요알부민, 공복혈당, 당화 혈색소 등을 측정하였다. 당뇨병성 망막병증은 안저검사에서 미세동맥류나 경성 삼출물 등이 있는 비증식성 망막병증과 신생혈관형성, 섬유성 띠에 의한 망막박리, 초자체 출혈 등이 있는 증식성 망막병증으로 나누었다. 24시간 요중 알부민을 측정하여 30 mg/day 이상인 경우 당뇨병성 신증이 있다고 정의하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) DNA의 분리

말초혈액 7 mL을 채혈하여 연막(buffy coat)을 얻고 rapid non-enzymatic method에 따라 분리하였다<sup>34</sup>. 연막에 저염성 완충용액인 TKM1용액(10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA) 5 mL과 125  $\mu$ L의 Nonidet P-40 (NP-40, Sigma)을 넣어 세포를 용해시킨 후 상온에서 10분간 2,200 rpm으로 원심분리하여 nuclear pellet을 얻고 TKM1 용액 10 mL를 넣어 잘 세척한 후 위와 같은 방법으로 원심분리하였다. Pellet에 고염성 완충용액인 TKM2 용액(10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl)을 0.8 mL 넣고 잘 부유시킨 후 10% SDS 50  $\mu$ L를 섞어서 55°C에서 1시간 동안 두었다. Pellet이 완전히 녹은 것을 확인하고 6M NaCl 0.3 mL을 넣어 세계 섞은 후 25분간 12,000 rpm

으로 초원심 분리를 시행하였다. 상층액을 조심스럽게 분리하여 2배 부피의 100% 알코올과 섞어서 DNA를 침전시키고 이를 건져 차가운 70% 알코올에 넣어 염분을 제거한 후 건조시키고 증류수에 녹여 -70℃에 보관하였다. 이중 일부를 취해 260 nm에서 흡광도를 측정하여 양을 구하였다.

## 2) 중합효소 연쇄반응

### (1) 시발체(primer) 제작

7번 염색체 장완에 위치하는 (A-C)n의 다이뉴클레오티드 반복서열을 포함하는 한쌍의 소뉴클레오티드 시발체를 제작하였다<sup>31)</sup>.

Forward primer: 5'-GAATCTTAACATGCTCTGAACC

Downward primer: 5'-GCCCCAGCCCTATACCTAG

GeneScan을 위해 forward primer는 5'-말단부위에 fluorescent dye FAM (blue fluorescent; Perkin-Elmer, Norwalk, CT)으로 표지하여 사용하였다.

### (2) 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

PCR 반응액은 50 ng의 DNA와 각각 5 pmol의 forward primer (fluorescent dye-labeled)와 downward primer, 0.2 mM dNTP (TaKaRa), 10X buffer solution (15 mM MgCl<sub>2</sub> 함유, Perkin Elmer), 그리고 0.5 unit AmpliTaq Gold® (Perkin Elmer)을 넣어 총 10 µL로 만들었다. 중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR system 2,400 (Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT)을 사용하였으며, 반응과정은 다음과 같다. Initial denaturation을 위해 94℃에서 12분 반응시킨 후 94℃ 1분, 60℃ 45초, 72℃ 1분으로 구성되는 반응 회로를 30회 실행 후 72℃에서 10분간 반응시켜 extension을 마무리하였다. PCR 증폭산물에서 2.5 µL를 취해 2% agarose gel에서 전기영동하여 밴드를 확인하고 나머지는 유전자형 분석을 시행하기 전까지 -20℃에 빛을 차단하여 보관하였다.

## 3) 유전자형의 분석

### (1) 6% denaturing PAGE 준비

Denaturing gel은 8 M Urea와 5% Long Ranger™ Gel Solution (AT Biochem. Inc)을 잘 섞은 후 10% APS 100 uL, TEMED 12 uL을 넣어 준비된 유리판에 부어 2시간 정도 굳혀 사용하였다.

### (2) GeneScan by ABI Prism 377 Automatic DNA sequencer

상기 gel plate를 ABI Prism 377 Automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT)에 장

착시킨 후 gel의 온도가 50℃에 이를 때까지 예열시킨 후 사용하였다. Fluorescent dye ROX-500 (red fluorescent, Perkin-Elmer, Norwalk, CT)로 표지된 internal lane size standard와 denaturing dye가 1:10으로 섞여 있는 용액 0.8 µL을 50배로 희석된 PCR 증폭산물 1 µL에 섞은 후 2분간 95℃에서 가열하여 얼음에 담아 두었다.

준비된 PCR 증폭산물과 internal standard ROX-500 혼합물을 Gel에 부하하고 2시간 동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 각 lane마다 PCR 증폭산물과 함께 넣어 준 internal lane size standard ROX-500을 이용하여 각 lane의 peak arrival time에 대한 calibration curve가 구해지고 이는 ABI Genotyper software 2.0 (Perkin-Elmer)으로 PCR 증폭산물의 길이를 자동분석하는데 사용되었다. 전기영동 시에는 자동염기서열분석을 통해 유전자형과 길이를 알고 있는 시료를 같이 걸어 대조 표준으로 사용하였다.

## 4) 통계처리

연구 대상 세 군 간의 임상적 특성은 ANOVA 또는  $\chi^2$  test로 비교하였다. 유전자형 빈도의 기대치와 관측치에 의한  $\chi^2$  test를 통하여 하이다-와인버그(Hardy-Weinberg) 유전법칙에 대한 적합성 여부를 평가하였다. 하나 이상의 특정 대립유전자를 갖는 경우와 하나도 갖지 않는 경우로 나누어, 즉 동형접합체나 이형접합체에 관계없이 둘 다 하나의 대립유전자로 간주하여 2 × 2 contingency tables을 만들어 allele frequency를 구하였고 이들의 차이는 각각의 대립유전자에 대해 Pearson's  $\chi^2$  test나 Fisher's exact test를 통해 비교하였다. 또한 당뇨병성 신경병증 환자군에서 당뇨병의 이환기간이 5년 이내로 짧은 환자만을 택하여 나머지 두 군과 allele frequency를 비교하였다. 빈도가 유의하게 차이가 있는 대립유전자에 대해서는 당뇨병성 신경병증에 대한 대응 위험도를 구하였다. 통계처리에는 SPSS 9.0 프로그램을 이용하였고 단순 P값이 아닌 다중비교 횡수에 따라 보정한 P값이 0.05 미만일 때 통계적인 유의성을 인정하였다.

## 결 과

### 1. 환자군과 정상 대조군의 임상적 특성(Table 1)

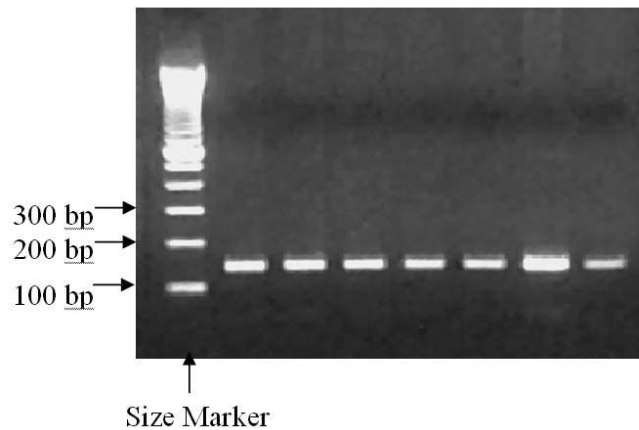
신경병증이 있는 당뇨병환자 66명, 미세혈관 합병증이 없는 당뇨병환자 30명, 정상 대조군 87명이 본 연구에 참여하였다. 세 군에서 성비, 체질량지수, 고혈압 병력, 수축기 및 이완기 혈압 등은 차이가 없었다.

미세혈관 합병증이 없는 군에서 신경병증이 있는 군에 비해 평균 연령이 높았고(65.9 ± 5.9세 vs. 57.7 ± 8.4세,  $P < 0.05$ ), 당뇨병의 이환기간(22.7 ± 3.6년 vs. 11.3 ± 6.0년,  $P < 0.05$ )이 길었다. 그러나 두 군에서 당뇨병을 진단 받은

**Table 1.** Clinical characteristics of the diabetic patients and the normal control subjects

	Normal control subjects (n = 87)	Type 2 diabetic patients	
		With neuropathy (n = 66)	Without microvascular complication (n = 30)
Sex (M/F)	45/42	43/23	14/16
Age (years)	53.0 ± 7.9	57.7 ± 8.5*	65.9 ± 6.7**
Duration of diabetes (years)		11.3 ± 6.0	22.7 ± 3.6†
Age at diagnosis (years)		45.9 ± 8.3	43.2 ± 6.5
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25.5 ± 8.8	23.6 ± 3.1	24.5 ± 3.0
History of hypertension (n)	21	22	13
Systolic blood pressure (mmHg)	133.2 ± 22.2	133.0 ± 15.6	138.2 ± 13.3
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.0 ± 14.7	84.3 ± 8.1	85.0 ± 8.0
Fasting blood sugar (mg/dL)	93.3 ± 7.7	137.6 ± 48.5*	155.3 ± 41.0*
HbA1c (%)		7.7 ± 1.0	7.6 ± 1.2
Family history of diabetes (n)		18	12

The data are expressed as means ± SD or n. \*  $P < 0.05$  vs. normal control subjects, †  $P < 0.05$  vs. diabetic patients with neuropathy.

**Fig. 1.** The results of PCR and electrophoresis with 2% agarose gel.

연령은 차이가 없었다. 또한 공복혈당과 당화 혈색소도 통계적으로 유의한 차이가 없어 두 군의 혈당조절상태는 비슷함을 알 수 있었다.

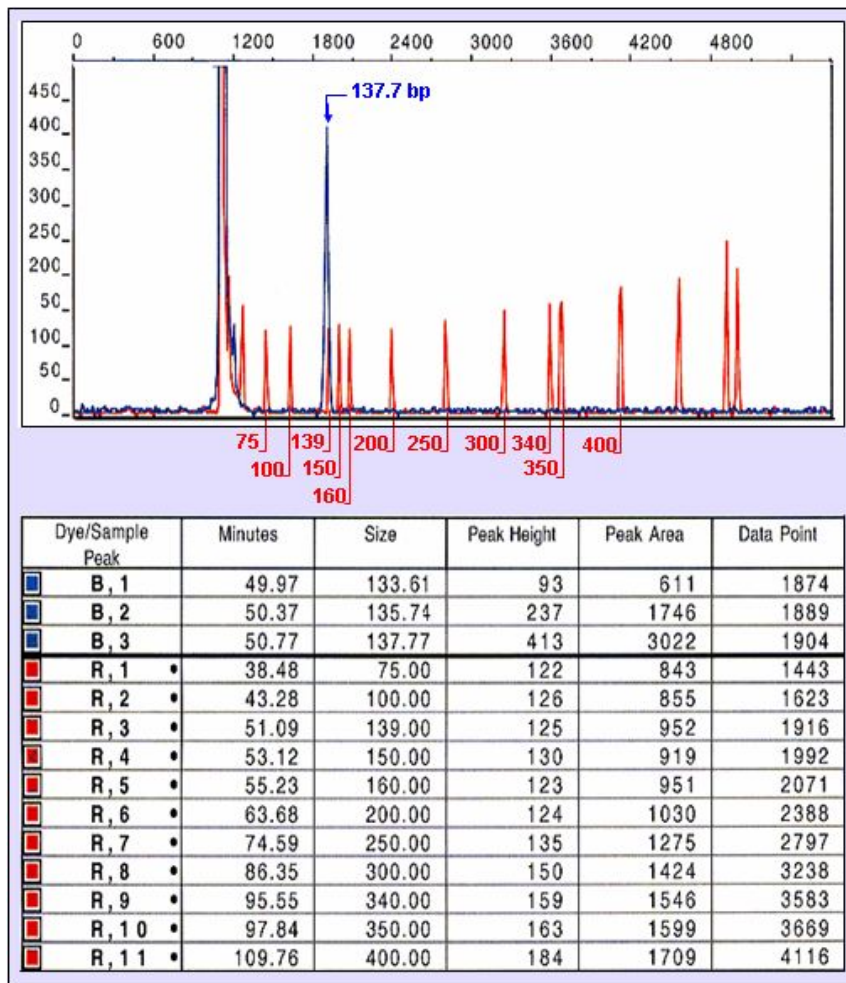
## 2. 중합효소연쇄반응과 GeneScan

PCR 증폭산물을 2% agarose gel에서 전기영동 하였을 때 size marker 100 bp와 200 bp에 사이에 뚜렷한 band를 형성함을 관찰하여 PCR이 성공적으로 이루어졌음을 확인 하였다(Fig. 1). 또한 PCR 증폭산물로 GeneScan을 실행했을 때 푸른색 peak의 모양과 peak area값, 붉은색의 internal lane size standard로부터 구해진 calibration curve (소프트웨어에서 구함), 같이 걸어준 대조표준(자동염기서열분석을 통해 크기와 유전자형을 알고 있는 표준시료) 등으로부터 PCR 증폭산물의 크기와 유전자형을 정할 수 있었다. Fig. 2는 (A-C) 다이뉴클레오티드가 24번 반복된 138 bp를 갖는 Z형의 동형접합체(Z/Z형)를 GeneScan하여 나타낸 것이다.

## 3. 알도스 환원효소 유전자 5'-말단부위에 인접한 (A-C)n 다형성

### 1) 대립유전자의 종류 및 분포(Table 2)

알도스 환원효소 유전자의 5'-말단부위에서 2.1 kb 떨어진 곳에서 (A-C)n 다이뉴클레오티드의 반복횟수에 따른 대립유전자는 총 7개가 밝혀졌다. 처음 보고된 알도스 환원효소 유전자의 염기서열을 살펴보면 (A-C)n 다이뉴클레오티드가 24번 반복된 것이다. 따라서 24번 반복된 경우를 Z형이라고 하였고 이 경우 그 증폭산물의 크기는 138 bp였다. 반복 횟수의 증감에 따라 Z-6, Z-4, Z-2, Z+2, Z+4, Z+6이라고 하였고 이들에게서 (A-C)n 다이뉴클레오티드의 반복횟수는 각각 21, 22, 23, 25, 26, 27회였다. 가장 작은 대립유전자인 21번 반복된 Z-6형은 132 bp였고 가장 큰 대립유전자인 27번 반복된 Z+6형은 144 bp였다. 반복횟수가 23번인 Z-2형이 37.4%로 가장 많았고 21번 반복된 Z+6형이 1.1%로 가장 적었다. 그 외 Z-6형이 7.9%, Z-4형은 18.9%, Z형



**Fig. 2.** The results of GeneScan by ABI prism 377 automated DNA sequencer and ABI Genotyper software 2.0. The blue-colored peak was the sample labeled FAM and red peak was internal lane size standard labeled with ROX-500. This example was the homozygote of Z, 23 repeats of (A-C).

**Table 2.** Frequency of the microsatellite alleles at 5-end of aldose reductase gene in the total subjects

Allele	N	Percent (%)
Z-6	29	7.9
Z-4	69	18.9
Z-2	137	37.4
Z	87	23.8
Z+2	30	8.2
Z+4	10	2.7
Z+6	4	1.1
Total	366	100

N, Number of chromosomes.

은 23.8%, Z+2형은 8.2%, Z+4형은 2.7%였다.

또한 (A-C)<sub>n</sub> 다이뉴클레오타이드의 반복 다형성에 의한 유전자형의 기대치와 관측치를 바탕으로 시행한  $\chi^2$  test 결과  $P > 0.05$ 로서 하아디-와인버그(Hardy-Weinberg) 유전법칙을 따름을 확인할 수 있었다.

## 2) 당뇨병환자와 정상 대조군에서 Allele Frequency 비교 (Table 3, Table 4)

당뇨병성 신경병증이 있는 군의 77.3% (51명/66명), 미세혈관 합병증이 없는 군의 43.3% (13명/30명), 정상 대조군의 64.4% (56명/87명)에서 Z-2형의 대립유전자가 보였으며, 당뇨병성 신경병증이 있는 군에서 미세혈관 합병증이

**Table 3.** Allele frequency (%) of the microsatellite repeat of aldose reductase gene in patients with type 2 diabetes and normal control subjects

	Normal control subjects (n = 87)	Type 2 diabetic patients	
		With neuropathy (n = 66)	Without microvascular complication (n = 30)
Z-6	17.2 (15/87)	10.6 (7/66)	20.0 (6/30)
Z-4	35.6 (31/87)	28.8 (19/66)	40.0 (12/30)
Z-2 <sup>*</sup>	64.4 (56/87)	77.3 (51/66)	43.3 (13/30)
Z	42.5 (37/87)	45.5 (30/66)	33.3 (10/30)
Z+2	14.9 (13/87)	15.2 (10/66)	23.3 (7/30)
Z+4	6.9 (6/87)	3.0 (2/66)	6.7 (2/30)
Z+6 <sup>†</sup>	1.1 (1/87)	0 (0/66)	10.0 (3/30)

Data were expressed by percents. The number in parentheses is the number of n per total number of the group subjects.

\*  $\chi^2 = 10.7$ ,  $P = 0.007$  between diabetic patients with neuropathy and those without microvascular complication.

†  $\chi^2 = 6.8$ ,  $P = 0.063$  between diabetic patients with neuropathy and those without microvascular complication.

**Table 4.** Allele frequency (%) of the microsatellite repeat of aldose reductase gene in patients who developed diabetic neuropathy within 5 years after the diagnosis of diabetes and in diabetic patients without microvascular complication

	Type 2 diabetic patients	
	With neuropathy within 5 years after diagnosis of diabetes (n = 12)	Without microvascular complication (n = 30)
Z-6	16.7 (2/12)	20.0 (6/30)
Z-4	16.7 (2/12)	40.0 (12/30)
Z-2 <sup>*</sup>	91.7 (11/12)	43.3 (13/30)
Z	33.3 (4/12)	33.3 (10/30)
Z+2	25.0 (3/12)	23.3 (7/30)
Z+4	8.3 (1/12)	6.7 (2/30)
Z+6	0 (0/12)	10.0 (3/30)

Data were expressed by percents. The number in parentheses is the number of n per total number of the group subjects

\*  $\chi^2 = 8.2$ ,  $P = 0.028$ .

없는 군에 비해 그 빈도가 높았다( $P = 0.007$ ). 한편 미세혈관 합병증이 없는 군과 정상 대조군 간에는  $P$ 값이 0.05 이상으로 통계적인 차이는 없었다. 당뇨병이 있는 경우 Z-2형의 대립유전자를 하나 이상 가질 때 당뇨병성 신경병증이 발생할 위험도는 4.5 (95% confidence interval, 1.8-11.2,  $P < 0.05$ )로서 하나도 가지지 않을 때에 비해 유의하게 높았다.

반면, (A-C)n가 27회 반복된 대립유전자 Z+6형은 미세혈관 합병증이 없는 군에서 10.0% (3명/30명), 당뇨병성 신경병증이 있는 군에서 0% (0명/66명), 정상 대조군에서 1.1% (1명/87명)로서, 미세혈관 합병증이 없는 군에서 당뇨병성 신경병증이 있는 군에 비해 높은 빈도를 보였으나  $P$ 값은 0.063으로 통계적 유의수준에 미치지지는 못하였다.

당뇨병성 신경병증이 있는 군에서 당뇨병의 이환기간이 5년 이하인 환자를 추출하여 미세혈관 합병증이 없는 군과 정상 대조군과 비교하였다. 당뇨병의 이환기간이 5년 이하로 짧은 당뇨병성 신경병증 환자군은 91.7% (11명/12명)에서 Z-2형을 가져 미세혈관 합병증이 없는 군의 43.3% (13명/30명)에 비해 유의하게 높은 빈도를 보였다( $P = 0.028$ ).

또한 상대위험도를 구하였을 때 14.4 (95% confidence interval, 1.8-142.4,  $P < 0.05$ )로서 당뇨병의 이환기간이 짧은 경우 Z-2형 대립유전자를 가질 때 당뇨병성 신경병증의 위험이 더욱 높음을 관찰할 수 있었다.

### 3) Z-2형의 Genotype Frequency에 대한 비교

Z-2형의 genotype frequency를 비교하였을 때 Z-2형의 동형접합체는 세 군에서 유의한 차이가 없었다. 한편 Z-2형의 이형접합체는 당뇨병성 신경병증이 있는 경우 63.6%로 미세혈관 합병증이 없는 군의 36.7%에 비해 높은 빈도를 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 5). 그러나 5년 이내의 당뇨병 이환기간을 갖는 당뇨병성 신경병증 환자군에서 Z-2형의 이형접합체는 83.3%로 미세혈관 합병증이 없는 군의 36.7%와 비교 시 유의한 차이를 보였다( $P = 0.042$ , Table 6).

## 고 찰

폴리올 대사경로의 알도스 환원효소와 당뇨병성 신경병

**Table 5.** Z-2 genotype frequency of the microsatellite repeat of aldose reductase gene in type 2 diabetic patients with neuropathy and those without microvascular complications

Z-2	Type 2 diabetic patients	
	With neuropathy (n = 66)	Without microvascular complication (n = 30)
Homozygote	13.6%	6.7%
Heterozygote	63.6%	36.7%
No	22.8%	56.6%

**Table 6.** Z-2 genotype frequency of the microsatellite repeat of aldose reductase gene in patients who developed diabetic neuropathy within 5 years after the diagnosis of diabetes (Group I) and in diabetic patients without microvascular complications (Group II)

Z-2	Type 2 diabetic patients	
	Group I (n = 12)	Group II (n = 30)
Homozygote	8.3%	6.7%
Heterozygote *	83.3%	36.7%
No	8.4%	56.6%

\*  $\chi^2 = 6.1$ , corrected  $P$  value = 0.042.

증 발생과의 연관성은 여러 실험을 통해 제시되어 왔다<sup>35-37)</sup>. 알도스 환원효소는 신경 내 미세혈관과 신경섬유에 풍부히 존재한다. 따라서 이 효소의 활성도 증가는 특히 당뇨병성 신경병증의 주요한 병인이 될 수 있다.

폴리올 대사경로는 인슐린에 의존하지 않고 포도당을 소르비톨과 과당으로 전환하는 과정이다. 여기에 중심적인 역할을 하는 알도스 환원효소는 원래 포도당과 결합력이 약해 정상혈당 상태에서는 문제가 될 정도의 소르비톨을 만들지 않지만<sup>36)</sup> 고혈당이 있으면 그 활성이 증가되어 소르비톨의 농도가 상승하게 된다. 그러나 환자에 따라 혈당조절상태와 관계없이 당뇨병성 신경병증을 비롯한 미세혈관 합병증에 특히 감수성을 보이는 경우가 있다. 이런 개인적인 감수성의 차이는 고혈당이라는 환경적 요인과 더불어 유전적인 소인에 기인한다고 생각할 수 있다.

당뇨병의 미세혈관 합병증과 알도스 환원효소와의 연관성을 microsatellite 기법을 이용하여 분석한 연구들에 의하면, 공통적으로 23회의 반복횟수를 가지는 Z-2형의 allele frequency가 합병증이 있는 경우 유의하게 높았다<sup>26-30,33)</sup>. 본 연구에서도 이와 마찬가지로 당뇨병성 신경병증이 있는 군에서 미세혈관 합병증이 없는 군에 비해 Z-2형의 빈도가 유의하게 높음을 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 경향은 당뇨병 진단 후 5년 이내에 당뇨병성 신경병증이 발생한 경우 더욱 두드러졌다. 그러나 정상 대조군과 당뇨병성 신경병증이 있는 군을 비교하였을 때는 Z-2형의 빈도에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 당뇨병이 없는 정상에서는 Z-2형이 어떤 위험을 보이지 않으나 당뇨병, 즉 고혈당이라는 환경적 요인을 동반할 때는 알도스 환원효소의 활성화와 관련되어 당뇨병성 신경병증의 발생에 감수성을 높하게 된

다고 생각해 볼 수 있다.

다른 연구들에서 당뇨병성 미세혈관 합병증에 대해 방어 효과가 있다고 알려진 25회의 (A-C)<sub>n</sub> 반복횟수를 갖는 Z+2형은 본 연구에서 당뇨병성 신경병증이 있는 군과 미세혈관 합병증이 없는 군 간에 유의한 차이가 없었다. 오히려 27회 반복된 Z+6형이 미세혈관 합병증이 없는 군에서 당뇨병성 신경병증이 있는 군에 비해 증가된 것을 관찰할 수 있었으나 보정한  $P$ 값은 0.063으로 통계적 유의성은 없었다. 다른 연구들에서도<sup>26-29)</sup> 본 연구와 마찬가지로 당뇨병성 미세혈관 합병증이 없는 군에서 있는 군에 비해 Z+6형의 빈도가 높은 경향을 보였지만 역시 통계적인 유의성은 없었다. Z+6형이 실제로 미세혈관 합병증에 대해 어떤 저항성을 가질 수 있다는 가능성은 관찰하였지만 Z+6형이 발견되는 빈도가 다른 형에 비해 낮아 임상적인 중요성은 작을 것으로 생각된다. 그러나 Z-2형과 더불어 좀더 많은 환자를 대상으로 하여 알도스 환원효소의 발현이나 활성에 있어 실제로 어떤 차이가 있는지를 알아볼 필요가 있을 것이다.

본 연구결과는 알도스 환원효소 유전자에 인접한 microsatellite의 특정한 다형성이 당뇨병성 신경병증의 발생을 조절한다는 가설을 지지하지만 어떤 기전을 통한 효과인지에 대해서는 알 수 없었다. 하나의 설명은 알도스 환원효소 유전자의 발현이 증가한다는 것이다. Shah 등은<sup>26)</sup> 당뇨병환자에서 신증이 있는 경우 Z-2형의 빈도가 높으며 Z-2형 대립유전자를 하나 이상 가지는 경우 그렇지 않은 경우에 비해 알도스 환원효소 유전자 mRNA 발현이 증가됨을 관찰하였다. 반면 당뇨병이 없는 경우에는 Z-2형의 유무에 따른 mRNA 발현에 차이가 없었다. 이는 당뇨병이 있는 경우 Z-2형의 대립유전자는 알도스 환원효소 유전자의 발현

을 증가시키고 이로써 신증을 유발한다고 볼 수 있다. 이런 유전자 발현의 증가는 (A-C)n microsatellite가 전사조절부위에 위치한다는 점을 고려할 때 Z-2형이 직접적으로 전사조절인자와 DNA의 결합을 조절하여 발현을 증가시키거나 아니면 인접한 전사조절부위에 발생한 변이로 인해 유전자 발현이 증가될 경우 Z-2형이 이와 연쇄(linkage)됨으로써 간접적으로 유전자 발현과 관계있는 것으로 해석할 수도 있다. 실제 Henry 등은<sup>39)</sup> 망막의 색소상피세포 배양에서 알도스 환원효소 유전자의 발현조절 부위에 발생한 변이에 의해 알도스 환원효소의 발현이 증가함을 보고한 바 있다. 두번째 가설은 유전자의 발현은 증가되지 않고 알도스 환원효소 유전자 자체에 어떤 변이가 생기고 알도스 환원효소가 원래의 wild-type에 비해 훨씬 강한 포도당 결합력을 가지게 된다는 것이다. 이렇게 되면 더욱 많은 포도당과 결합하여 결국 소르비톨의 증가를 초래할 수도 있을 것이다.

본 연구는 몇 가지 제한점이 있다. 첫째, 망막증이나 신증과 같이 다른 미세혈관 합병증을 가진 당뇨병환자를 연구에 포함시키지 않았다. 알도스 환원효소 유전자 반복다형성이 당뇨병성 망막증 및 신증에 관련되어 있다는 연구들이 이미 존재하고 있어, 저자들은 당뇨병성 신경병증 환자들만 연구대상으로 고려하였다. 둘째, 미세혈관 합병증이 없는 당뇨병환자군과 신경병증이 있는 환자군 간의 비교성에 문제가 있다. 미세혈관 합병증이 없는 환자군이 신경병증이 있는 환자군에 비해 평균연령이 높고 당뇨병의 이환기간이 길었다. 그 이유는 아마도 미세혈관 합병증이 없는 당뇨병환자를 선별할 때 당뇨병 이환기간이 20년 이상이라는 엄격한 기준을 적용하였기 때문으로 사료된다.

결론적으로 본 연구 결과는 당뇨병성 신경병증이 유전적 소인과 연관된다는 가설을 뒷받침하고 있다. 특히 알도스 환원효소가 당뇨병성 신경병증과 관련이 있다는 가설 또한 지지하고 있다. 향후 알도스 환원효소의 발현이나 그 활성을 microsatellite 다형성과 연관시켜 관찰하는 연구를 통해 어떤 기전으로 이런 유전적 소인이 나타나게 되는지에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Pirart J: *Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. Diabetes Care* 1:168-88, 1978
2. Dyck PJ, Thomas PK, Asbury AK, Winegard AI, Porte K (Eds): *Diabetic Neuropathy*, Philadelphia, Saunders, 1987
3. Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF: *Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in*

- the pathogenesis of diabetic complications. N Engl J Med* 316:599-606, 1987
4. Dvornik D: *Hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications In: Porte D, ed. Aldose reductase inhibition: an approach to the prevention of diabetic complications. New York: McGraw-Hill, 1987:7-151*
5. Cameron NE, Cotter MA, Low PA: *Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. Am J Physiol* 261:E1-8, 1991
6. Dyck PJ: *Hypoxic neuropathy: does hypoxia play a role in diabetic neuropathy? Neurology* 39:111-8, 1989
7. Nishimura C, Lou MF, Kinoshita JH: *Depletion of myo-inositol and amino acids in galactosemic neuropathy. J Neurochem* 49:290-5, 1987
8. van-Gerven JM, Tjon-A-Tsien AM: *The efficacy of aldose reductase inhibitors in the management of diabetic complications. Comparison with intensive insulin treatment and pancreatic transplantation. Drugs Ageing* 6:9-28, 1995
9. Boel E, Selmer J, Flodgaard JH, Jensen T: *Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation end product formation hold promise? J Diabetes complications* 9: 104-29, 1995
10. Baynes JW: *Role of oxidative stress in the development of complications of diabetes. Diabetes* 40:405-12, 1991
11. Corbett JA, Tilton RG, Change K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, Williamson JR, McDaniel ML: *Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. Diabetes* 41:552-6, 1992
12. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG: *Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetic complications. Diabetes* 42:801-13, 1993
13. 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
14. Raccach D: *Physiopathology of diabetic neuropathies. Functional exploration of peripheral involvement. Diabetes Metab* 24 Suppl 3:73-8, 1998

15. Yamaoka T, Nishimura C, Yamashita K, Itakura M, Yamada T, Fujimoto J, Kokai Y: *Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA*. *Diabetologia* 38:255-61, 1995
16. Lee A, Chung SK, Chung SS: *Demonstrate that polyol accumulations is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing aldose reductase gene in the lens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2780-4, 1995
17. Dent MT, Tebbs SE, Gonzalez AM, Ward JD, Wilson RM: *Neutrophil aldose reductase activity and its association with established diabetic microvascular complications*. *Diabetic Med* 8:439-42, 1991
18. Ratliff DM, Vander Jagt DJ, Eaton RP, Vander Jagt DL: *Increased Levels of Methylglyoxal-Metabolizing Enzymes in Mononuclear and Polymorphonuclear Cells from Insulin-Dependent Diabetic Patients with Diabetic Complications: Aldose Reductase, Glyoxalase I, and Glyoxalase II*. *J Clin Endocrinol Metab* 81:488-92, 1996
19. Shah VO, Dorin RI, Sun Y, Braun M, Zager PG: *Aldose reductase gene expression is increased in diabetic nephropathy*. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2294-8, 1997
20. Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH: *The aldo-keto reductase superfamily. The cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases*. *J Biol Chem* 264:9547-51, 1989
21. Chung S, LaMendola J: *Cloning and sequence determination of human placental aldose reductase gene*. *J Biol Chem* 264:14775-7, 1989
22. Graham A, Brown L, Hedge PJ, Gammack AJ, Markham AF: *Structure of the human aldose reductase gene*. *J Biol Chem* 266:6872-7, 1991
23. Graham A, Heath P, Morten JE, Markham AF: *The human aldose reductase gene maps to chromosome 7q35*. *Hum Genet* 86:509-14, 1991
24. Nishimura C, Matsuura Y, Kokai Y, Akera T, Carper D, Morjana N, Lyons C, Flynn TG: *Cloning and expression of human aldose reductase*. *J Biol Chem* 265:9788-92, 1990
25. Patel A, Hibberd ML, Millward A, Demaine AG: *Chromosome 7q35 and susceptibility to diabetic microvascular complications*. *J Diabet Complications* 10:62-7, 1996
26. Shah VO, Scavini M, Nikolic J, Sun Y, Vai S, Griffith JK, Dorin RI, Stidley C, Yacoub M, Vander Jagt DL, Eaton RP, Zager PG: *Z-2 microsatellite allele is linked to increased expression of the aldose reductase gene in diabetic nephropathy*. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2886-91, 1998
27. Heesom AE, Hibberd ML, Millward A, Demaine AG: *A polymorphism in the 5' end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. *Diabetes* 46:287-91, 1997
28. Heesom AE, Millward A, Demaine AG: *Susceptibility to diabetic neuropathy in patients with insulin dependent diabetes mellitus is associated with a polymorphism at the 5' end of the aldose reductase gene*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:213-6, 1998
29. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M: *A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes*. *Diabetes* 48:1338-40, 1999
30. Donaghue KC, Margan SH, Chan AK, Holloway B, Silink M, Rangel T, Bennetts B: *The association of aldose reductase gene (AKR1B1) polymorphisms with diabetic neuropathy in adolescents*. *Diabet Med* 22:1315-30, 2005
31. Ko BC-B, Lam KS-L, Wat NM-S, Chung SS-M: *An (A-C)<sub>n</sub> dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early onset diabetic retinopathy in NIDDM patients*. *Diabetes* 44:727-32, 1995
32. Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH, Knowler WC, Pima Indians Genes Group: *Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes*. *Diabetes* 47:821-30, 1998
33. Sivenius K, Pihlajamäki J, Partanen J, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M: *Aldose reductase gene polymorphisms and peripheral nerve function in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 27:2021-6, 2004
34. Lahiri DK, Nurnberger, Jr JJ: *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. *Nucleic Acids Res* 19:5444, 1991

35. Finegold D, Lattimer SA, Nolle S, Bernstein M, Greene DA: *Polyol pathway activity and myo-inositol metabolism. A suggested relationship in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Metabolism* 32:988-92, 1983
36. Willars GB, Townsend J, Tomlinson DR, Compton AM, Churchill RD: *Studies on peripheral nerve and lens in long-term experimental diabetes: effects of the aldose reductase inhibitor Statil. Metabolism* 37:442-9, 1988
37. Mizisin AP, Powell HC: *Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication. J Neuropathol Exp Neurol* 52:78-86, 1993
38. Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA: *Aldose reductase from human skeletal and heart muscle. Interconvertible forms related by thiol-disulfide exchange. J.Biol Chem* 265:20982-7, 1990
39. Henry DN, Monte MD, Greene DA, Killen PD: *Altered aldose reductase gene regulation in cultured human retinal pigment epithelial cells. J Clin Invest* 92:617-23, 1993