

## 고혈당과 유리 지방산에 의한 호중구의 NAD(P)H Oxidase 활성화로부터 의 혈관내피세포 손상

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

김상수<sup>1</sup> · 김선영<sup>1,2</sup> · 이수형<sup>1</sup> · 강양호<sup>1,2</sup> · 김인주<sup>1</sup> · 김용기<sup>1</sup> · 손석만<sup>1,2</sup>

High Glucose and/or Free Fatty Acid Damage Vascular Endothelial Cells via Stimulating of NAD(P)H Oxidase-induced Superoxide Production from Neutrophils

Sang Soo Kim<sup>1</sup>, Sun Young Kim<sup>1,2</sup>, Soo Hyung Lee<sup>1</sup>, Yang Ho Kang<sup>1,2</sup>, In Ju Kim<sup>1</sup>, Yong Ki Kim<sup>1</sup>, Seok Man Son<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine, Busan,

<sup>2</sup>Diabetes Center, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, Korea

### Abstract

**Background:** Oxidative stress and inflammation are important factors in the pathogenesis of diabetes and contribute to the development of diabetic complications. To understand the mechanisms that cause vascular complications in diabetes, we examined the effects of high glucose and/or free fatty acids on the production of superoxide from neutrophils and their role in endothelial cell damage.

**Methods:** Human neutrophils were incubated in the media containing 5.5 mM D-glucose, 30 mM D-glucose, 3 nM oleic acid, or 30  $\mu$ M oleic acid for 1 hour to evaluate superoxide production through NAD(P)H oxidase activation. Human aortic endothelial cells were co-cultured with neutrophils exposed to high glucose and oleic acid. We then measured neutrophil adhesion to endothelial cells, neutrophil activation and superoxide production, neutrophil-mediated endothelial cell cytotoxicity and subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase.

**Results:** After 1 hour of incubation with various concentrations of glucose and oleic acid, neutrophil adherence to high glucose and oleic acid-treated endothelial cells was significantly increased compared with adhesion to low glucose and oleic acid-treated endothelial cells. Incubation of neutrophils with glucose and free fatty acids increased superoxide production in a dose-dependent manner. High glucose and oleic acid treatment significantly increased expression of the membrane components of NAD(P)H oxidase of neutrophil (gp91<sup>phox</sup>). Endothelial cells co-cultured with neutrophils exposed to high glucose and oleic acid showed increased cytotoxicity, which could be prevented by an antioxidant, N-acetylcysteine.

**Conclusion:** These results suggest that high glucose and/or free fatty acids increase injury of endothelial cells via stimulating NAD(P)H oxidase-induced superoxide production from neutrophils. (Korean Diabetes J 33:94-104, 2009)

**Key words:** Endothelial cells, NAD(P)H oxidase, Neutrophil, Oxidative stress

접수일자: 2009년 1월 8일, 통과일자: 2009년 2월 24일

교신저자: 손석만, 부산대학교 의학전문대학원 내과학교실, E-mail: sonsm@pusan.ac.kr

\* 본 연구는 2007년도 부산대학교 산학협력단 연구비(과제번호 20070423000, 과제번호 20070654000)에 의해 이루어짐.

## 서 론

당뇨병환자에서 죽상동맥경화증과 같은 대혈관합병증은 사망률 증가의 중요한 원인이며<sup>1)</sup>, 이런 대혈관합병증은 고혈당과 직접적인 관계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 최근 여러 연구에서 당뇨병 동물모델과 당뇨병환자에서 고혈당이 반응성 산소유리기의 생성을 증가시키는 것이 밝혀졌고<sup>3,4)</sup>, 이는 당뇨병환자에서 혈관합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다<sup>5)</sup>. 또한 죽상동맥경화증은 혈관세포들의 산화·환원 신호의 이상으로 인한 혈관의 만성 염증성 현상으로 설명되고 있어<sup>6)</sup>, 산화스트레스와 염증성 반응이 당뇨병 합병증의 병태생리에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다<sup>3-6)</sup>.

당뇨병에 있어 여러 다양한 공급체로부터 반응성 산소유리기가 생성되는데 염증성 병변에서는 호중구에 의해 생성된 NAD(P)H oxidase가 가장 중요한 역할을 한다<sup>7)</sup>. 미토콘드리아에서 생성된 반응성 산소유리기는 미토콘드리아의 Uncoupling proteins (UCPs) 활성화도 조절과 세포의 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 반면, NAD(P)H oxidase에 의해 생성된 반응성 산소유리기는 세포 내 신호전달, 인슐린 분비 및 작용, 세포의 증식과 사멸 등에 관여할 것으로 생각된다. 이 때 생성된 반응성 산소유리기는 DNA, 단백질, 지질 등을 산화시킴으로써 직접적으로 세포를 손상시킬 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<sup>8)</sup>.

한편 당뇨병에서 고혈당과 이의 대사산물들에 의해 혈관내피세포의 기능장애가 야기될 때 내피세포에 대한 백혈구의 부착이 증가된다고 보고되었다<sup>9)</sup>. 특히 호중구가 내피세포에 부착되는 과정이 염증 부위로 염증세포들을 유인하고 동원하는데 매우 중요한 역할을 담당한다<sup>10)</sup>. 이러한 과정에서 호중구에서 생성 유리되는 반응성 산소유리기와 단백질 분해 효소와 같은 세포 독성 물질들이 혈관내피세포의 기능장애를 야기함으로써<sup>11)</sup> 혈관내피세포에 대한 호중구의 부착이 더욱 증가하고 내피세포의 산화 손상을 더욱 조장하는 것으로 여겨진다.

또한 특히 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 입자와 같은 지질의 산화 손상이 죽상동맥경화증을 일으키는 주요인이 되기 때문에 고혈당 및 지질 등과 같은 영양공급과 혈관내피세포의 산화 손상과의 연관관계를 규명하는 것은 죽상동맥경화증과 같은 대혈관합병증의 발생 기전을

이해하는데 중요한 요소가 된다.

이에 본 연구에서 저자들은 당뇨병에서 혈관합병증을 일으키는 기전에 대해 보다 명확히 규명하고자 호중구로부터의 superoxide 음이온 생성에 대한 고혈당과 유리 지방산의 효과와 이로 인한 혈관내피세포의 손상에 대해 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 약물

본 연구에 사용된 약물은 다음과 같다.

D-glucose, diphenyleneiodonium, superoxide dismutase, lucigenin, xanthine, xanthine oxidase, oleic acid, N-acetylcystein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA); Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (GE Healthcare, Tampa, FL); antibodies against p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> and actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### 2. 세포 배양

인간대동맥 내피세포(human aortic endothelial cells; HAECs, CC-2535, Clonetics, Walkersville, MD)를 구입하여 계대배양 하였으며 계대수 4~6회 세포를 실험에 이용하였다<sup>12)</sup>. 60-mm 배양접시에서 EGM-2 배지(BulletKit<sup>TM</sup>, CC-3162, Clonetics)와 EGM 배지(BulletKit<sup>TM</sup>, CC-3124, Clonetics)로 5% 이산화탄소와 95% 공기가 공급되는 37℃ 세포 배양기에서 배양하였다. 배지에 10% FCS, 20 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 첨가하였다. 80% 세포가 합류(confluence)가 되면 24시간 동안 0.5% 혈청을 가지는 배지로 바꾸어 세포를 휴면상태로 만들었고 이후 thrombin으로 자극하였다.

### 3. 인간 호중구의 분리

약물을 복용하지 않은 건강한 성인의 정맥혈로부터 EDTA (0.5%)가 함유된 주사기를 사용하여 채혈하였다. 채혈된 혈액을 3% polyvinylpyrrolidone과 혼합시켜 실온에 50분간 방치하여 적혈구를 침전시킨 후 백혈구를 함유하고 있는 상층액을 조심스럽게 분리하였다. 분리된 상층액을 저장용 용혈을 일으키고 원심분리에 의해 오염된 적혈구를 제거한 다음 Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich)을 이용하여 백혈구로부터 호중구를 분리하였다<sup>13)</sup>.

#### 4. 배양 조건

인간 호중구를 NAD(P)H oxidase 활성화를 통한 superoxide 음이온 생성을 알아보기 위해, 5.5 mmol/L D-glucose, 30 mmol/L D-glucose, 3 nmol/L oleic acid, 30  $\mu$ mol/L oleic acid가 포함된 배지에 최대 1시간까지 다양한 시간에 따라 배양하였다. 일부 실험에서는 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu$ mol/L oleic acid가 포함된 배지에 N-acetylcystein (NAC, 1 mmol/L)을 넣고 1시간 동안 배양하였다.

#### 5. 호중구 부착 측정

분리된 호중구를 PBS를 이용하여  $2 \times 10^7$ /mL로 희석하고 난 후 30  $\mu$ Ci Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>/mL를 첨가하여 37°C에서 60분간 배양하였다. 냉 DPBS를 이용하여 호중구를 두 번 세척하여 호중구에 결합하지 않은 방사성 물질을 제거하였다. D-glucose 5.5 mmol/L, 30 mmol/L와 oleic acid 3 nmol/L, 30  $\mu$ mol/L를 함유하고 있는 배양액으로 37°C에서 24시간 동안 내피세포를 미리 배양하였다. 배양된 내피세포에 방사성 물질이 결합된 호중구를 PBS에 희석시킨 후 혈관 내피 세포층에 첨가하였다(호중구와 내피세포 비율을 10:1로 하였다). 세포 혼합액을 37°C에서 60분간 배양한 후 세포 배양액을 제거하고 혈관 내피세포를 두 번 세척하여 부착되지 않은 호중구를 제거하였다. 이 후 2N NaOH를 이용하여 혈관 내피세포와 내피세포에 부착된 호중구를 용해시켰다. 세포 배양액, 세포 세척액 및 세포 용해액으로부터 방사성 활성을 측정하고 다음 공식을 이용하여 호중구 부착을 계산하였다<sup>14)</sup>.

호중구 부착률(%) =

$$\frac{\text{세포용해액(cpm)} \times 100}{\text{세포배양액(cpm)} + \text{세포세척액(cpm)} + \text{세포용해액(cpm)}}$$

#### 6. 호중구에서 유리되는 단백분해효소의 측정

D-glucose 5.5 mmol/L, 30 mmol/L와 oleic acid 3 nmol/L, 30  $\mu$ mol/L의 농도에서 각각 분리된 호중구를 1시간 동안 배양한 후 호중구에서 분비되는 단백분해효소를 측정하여 호중구의 활성화 정도를 측정하였다. Myeloperoxidase와 lactoferrin은 각각 호중구의 일차와 이차 과립분비의 지표로써 측정하였다. 면역분석 키트를 이용하여 lactoferrin과 myeloperoxidase의 생성을 측정하였다. 이는 microtiter plate에 전처리된 lactoferrin과 myeloperoxidase에 대한 단일클론항체에 표준용액, 세포 배양액을 첨가하여 일차결합

한 뒤 효소가 부착된 이차항체를 첨가하여 발색반응을 일으켜 420 nm에서 흡광도를 측정하는 방법이다<sup>15)</sup>.

#### 7. 호중구에 의한 내피세포의 세포독성 측정

내피세포를 12 well culture plate에 배양하여 합류되면 4  $\mu$ Ci Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>/well과 함께 18시간 배양한 후 3회 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 세척하였다. 배양배지에 분리한 호중구를 well 당 1 mL씩 넣고 30분간 호중구가 내피세포층에 가라앉도록 한 다음 D-glucose 5.5, 30 mmol/L와 oleic acid 3 nmol/L, 30  $\mu$ mol/L를 함유한 배양액에 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 각 well에서 0.9 mL의 상층액을 뽑아서 원심분리한 후 0.5 mL를 얻어 감마카운터를 이용하여 <sup>51</sup>Cr의 실험적 유리(cpm)를 측정하였다. <sup>51</sup>Cr의 자연적 유리(cpm)는 배양배지를 넣은 각 well에서 측정하고 이는 전체 <sup>51</sup>Cr 유리의 20%를 초과하지 않는 것으로 하고 <sup>51</sup>Cr 전체 유리는 각 well에 0.2% Triton X-100을 넣은 후 세포를 용해시킨 세포액에서 측정하였다. 호중구에서 내피세포에 대한 세포독성은 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다<sup>16)</sup>.

세포독성 (%) =

$$\frac{{}^{51}\text{Cr의 실험적 유리(cpm)} - {}^{51}\text{Cr의 자연적 유리(cpm)}}{{}^{51}\text{Cr의 전체 유리(cpm)} - {}^{51}\text{Cr의 자연적 유리(cpm)}}$$

#### 8. 호중구에서 Superoxide 음이온 생성량의 측정

호중구에서 superoxide 음이온의 생성량은 lucigenin을 사용하여 chemiluminescence법으로 측정하였다. Lucigenin은 acridylum dinitrate 복합체로서 superoxide 음이온과 반응하여 환원 시 발광반응이 일어나며 이때 발광량을 luminometer (EG & G Berthold, Germany)로 측정하여 superoxide 음이온의 생성량을 계산하였다<sup>17)</sup>. 실험방법은 호중구를 Krebs/Hepes 완충액에 넣어 37°C에서 30분간 처리하여 안정시킨 후 250  $\mu$ mol/L lucigenin을 첨가하고 luminometer에 넣었다. 호중구에서 측정되는 화학발광을 37°C에서 60분간 계속 측정하였다. Xanthine과 xanthine oxidase를 사용하여 측정된 superoxide 음이온의 표준곡선과 비교하여 superoxide 음이온의 생성량을 계산하였다<sup>18)</sup>. Superoxide 음이온의 생성에 관여하는 주된 효소를 알아보기 위해 NAD(P)H oxidase 억제제인 diphenylene iodonium (DPI, 10  $\mu$ M)과 Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL)를 측정하기 10분 전에 첨가한 후 superoxide 음이온의 생성량을 측정하였다.

## 9. 단백 추출과 Western Blot 분석

각 군의 호중구 세포를 Triton lysis 완충액[pH 7.4, 50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors (10 µg/mL aprotinin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin), phosphatase inhibitors (50 mmol/L sodium fluoride, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L sodium pyrophosphate)]을 이용하여 용해시킨 후 세포 용해액을 4°C에서 14,000 g로 15분간 원심 분리하여 상층액을 -70°C에 보관하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay법으로 농도를 결정하였고 각각의 검체를 40 µg씩 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기 영동하여 분리하였다. 전기영동 후 겔 내의 단백질은 100볼트에서 1시간 동안 Hybond-ECL 니트로셀룰로오스막에 이동시켰다. 막을 하룻밤 동안 4°C에서 5% 탈지분유와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 처리하였다. p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>와 액틴에 대한 1차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 막을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 10분간 3회 세척하였고, 1% 탈지분유와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 호당무과산화효소(horseradish peroxidase) 2차 항체를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ECL kit (GE Healthcare)을 이용하여 발현 정도를 NIH Image 1.62 software를 이용하여 측정하였다.

## 10. 통계 분석

실험결과는 SPSS version 12 (SPSS Inc., Chicago, IL)

를 이용하여 통계 처리하였다. 모든 실험치는 평균 ± 평균의 표준오차로 표시하였고 실험결과와 통계는 경우에 따라 Student's t-test와 ANOVA test를 적용하여 분석하였다.  $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

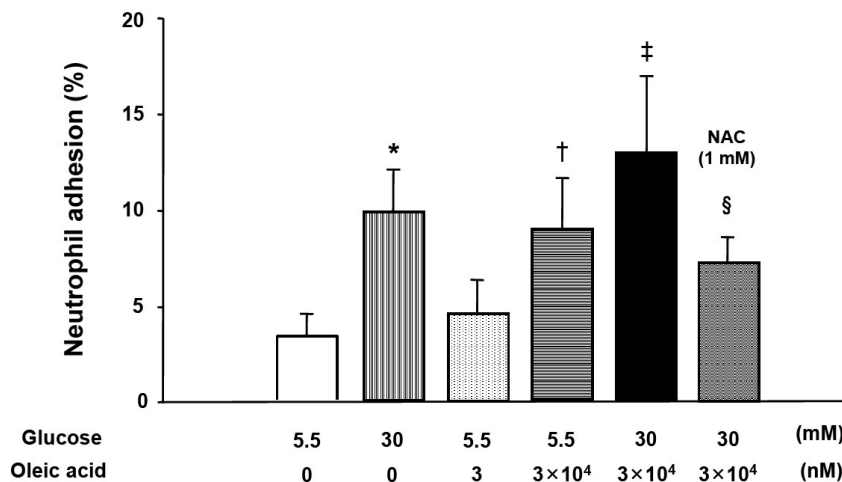
## 결 과

### 1. 혈관 내피세포에 호중구의 부착에 미치는 고농도의 포도당과 유리 지방산의 효과

30 mmol/L D-glucose를 1시간 동안 처리하였을 때 호중구의 혈관 내피세포에 대한 부착률이 5.5 mmol/L D-glucose의 배양조건에 비하여 현저히 증가하였다( $P < 0.01$ , Fig. 1). 1시간 동안 30 µmol/L oleic acid의 배양조건에서 호중구의 내피세포에 대한 부착률도 3 nmol/L oleic acid의 배양조건에 비해 현저히 높았다( $P < 0.01$ , Fig. 1). 또한 30 mmol/L D-glucose와 30 µmol/L oleic acid를 동시에 노출시킨 배양 조건에서 내피세포에 대한 호중구의 부착률도 정상 포도당 농도 및 저농도의 oleic acid에 노출시켰을 때에 비해 유의하게 증가하였으며( $P < 0.001$ ), 이는 동시에 NAC를 투여하였을 때 부착률이 유의하게 감소하였다( $P < 0.001$ , Fig. 1).

### 2. 호중구 활성화에 미치는 고농도의 포도당과 유리 지방산의 효과

각각 D-glucose 5.5, 30 mmol/L와 oleic acid 3 nmol/L,



**Fig. 1.** Effect of high glucose and/or oleic acid on neutrophil adhesion to endothelial cells. \*  $P < 0.01$ ; †  $P < 0.01$ ; ‡  $P < 0.001$  vs. cells treated with normal glucose or low oleic acid for 1 h. §  $P < 0.001$  vs. cells treated with high glucose and high oleic acid. NAC, N-acetylcystein.

30  $\mu\text{mol/L}$ 에서 분리한 호중구를 1시간 동안 처리한 후 호중구에서 유리되는 lactoferrin과 myeloperoxidase를 측정하여 호중구의 활성화 정도를 측정하였다. 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid로 호중구를 자극하였을 때 각각 5.5 mmol/L D-glucose와 3 nmol/L oleic acid로 자극한 경우보다 두 효소 모두에서 유리가 현저히 증가하였다( $P < 0.01$ , Fig. 2).

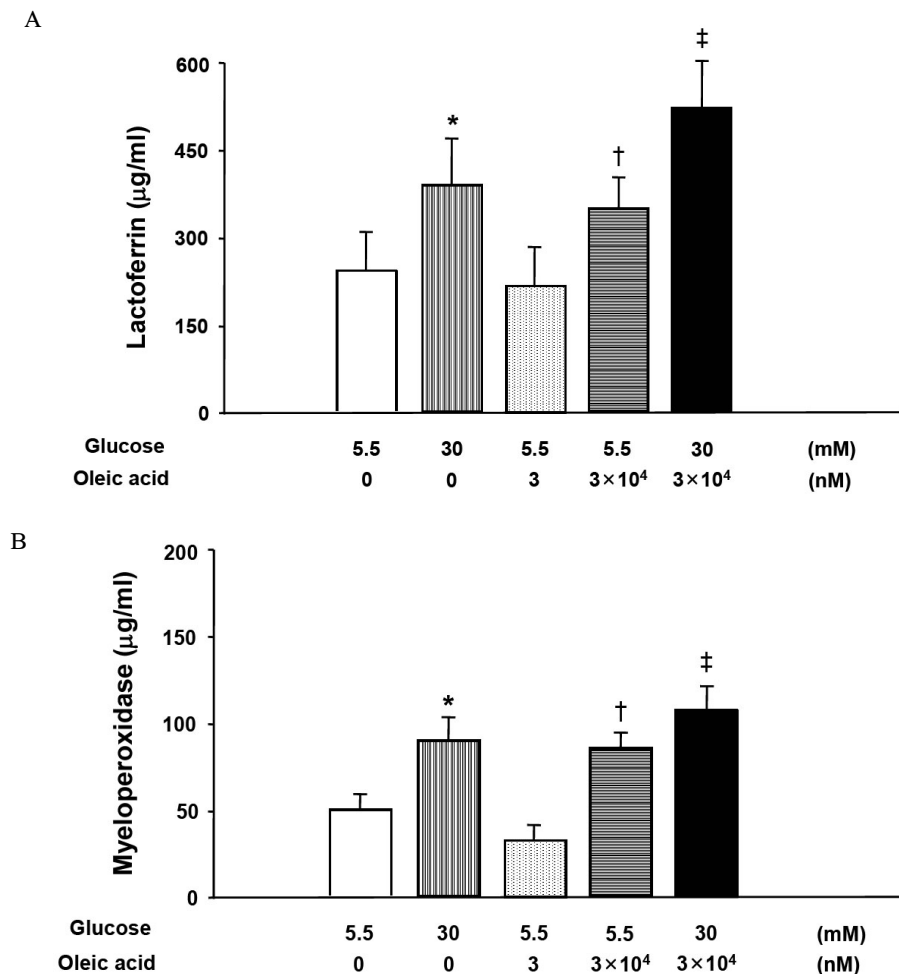
### 3. 호중구의 Superoxide 음이온 생성에 대한 고농도의 포도당과 유리 지방산의 효과

30 mmol/L D-glucose 배양조건과 30  $\mu\text{mol/L}$  oleic acid 배양조건에서 각각 5.5 mmol/L D-glucose 및 3 nmol/L oleic acid 배양조건보다 호중구에서 superoxide 음이온 생성량이 유의하게 증가하였다( $P < 0.01$ , Fig. 3). 또한 30

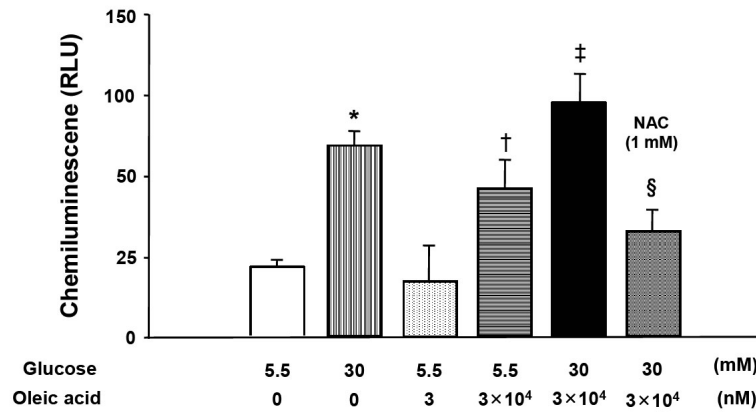
mmol/L의 D-glucose와 30  $\mu\text{mol/L}$ 의 oleic acid를 동시에 노출시킨 배양조건에서 superoxide 음이온 생성량도 정상 포도당 농도 및 저농도의 oleic acid에 노출시킨 배양조건에 비해 유의하게 증가하였으며( $P < 0.001$ ), 이는 동시에 NAC를 투여하였을 때 현저히 감소하였다( $P < 0.001$ , Fig. 3).

### 4. 혈관 내피세포 독성에 미치는 고농도의 포도당과 유리 지방산의 효과

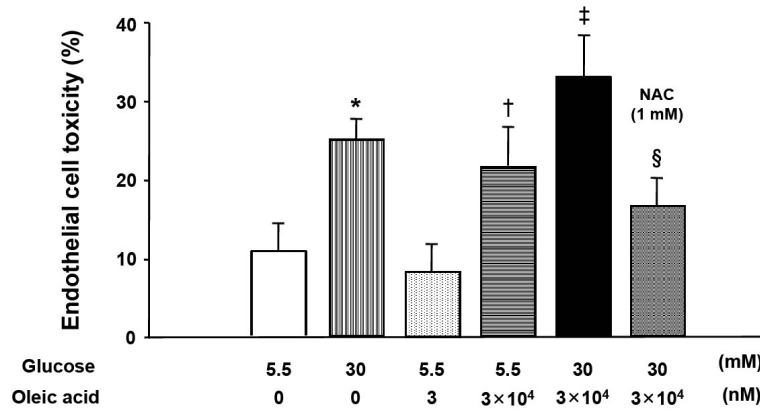
호중구의 내피세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해 1시간 동안 D-glucose 5.5, 30 mmol/L 및 oleic acid 3 nmol/L, 30  $\mu\text{mol/L}$ 에 배양하였을 때 각각 D-glucose 30 mmol/L와 oleic acid 30  $\mu\text{mol/L}$ 에 노출된 호중구를 혈관내피세포와 같이 배양하였을 때 세포독성이 현저히 높았다( $P < 0.01$ , Fig. 4). 또한 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu\text{mol/L}$



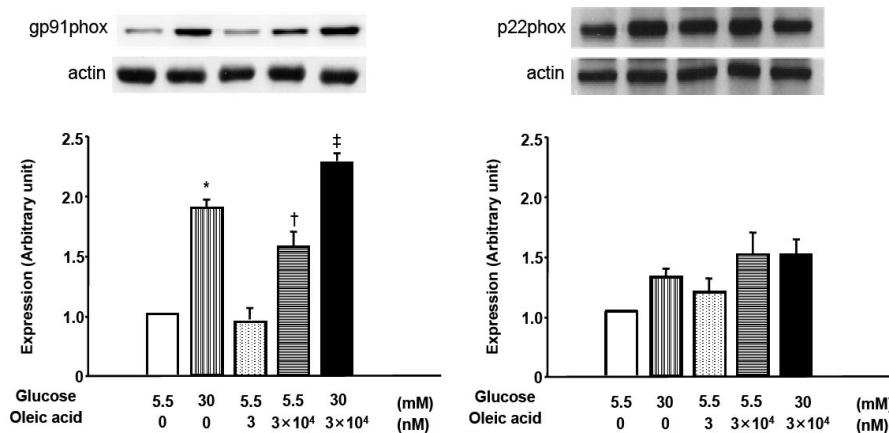
**Fig. 2.** Effect of high glucose and/or oleic acid on neutrophil activation. \*  $P < 0.01$ ; †  $P < 0.01$ ; ‡  $P < 0.001$  vs. cells treated with normal glucose or low oleic acid for 1 h.



**Fig. 3.** Effect of high glucose and/or oleic acid on neutrophil superoxide production. \*  $P < 0.01$ ; †  $P < 0.01$ ; ‡  $P < 0.001$  vs. cells treated with normal glucose or low oleic acid for 1 h. §  $P < 0.001$  vs. cells treated with high glucose and high oleic acid. NAC, N-acetylcystein.



**Fig. 4.** Effect of high glucose and/or oleic acid on endothelial cell toxicity. \*  $P < 0.01$ ; †  $P < 0.01$ ; ‡  $P < 0.001$  vs. cells treated with normal glucose or low oleic acid for 1 h. §  $P < 0.001$  vs. cells treated with high glucose and high oleic acid. NAC, N-acetylcystein.



**Fig. 5.** Expression of subunits of neutrophil NADPH oxidase. \*  $P < 0.01$ ; †  $P < 0.01$ ; ‡  $P < 0.001$  vs. cells treated with normal glucose or low oleic acid for 1 h.

oleic acid에 동시에 노출된 호중구에서 증가한 세포독성은 NAC (10 mmol/L)로 전처리하였을 때 유의하게 감소함을 보였다( $P < 0.001$ , Fig. 4).

### 5. 호중구 NAD(P)H Oxidase의 소단위의 발현

30 mmol/L D-glucose 배양조건과 30  $\mu$ mol/L oleic acid 배양조건에서 각각 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건 및 3 nmol/L oleic acid 배양조건보다 호중구의 NAD(P)H oxidase의 막구성 요소인 gp91<sup>phox</sup>의 발현이 현저히 증가하였다 (Fig. 5). 그러나 호중구의 p22<sup>phox</sup>의 발현은 30 mmol/L D-glucose 배양조건과 30  $\mu$ mol/L oleic acid 배양조건에서 각각 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5).

## 고 찰

본 연구에서는 당뇨병의 혈관합병증의 병태 생리를 규명하기 위하여 고농도의 포도당과 유리 지방산에 의한 호중구의 혈관내피세포 부착과 superoxide 음이온의 생성 및 내피세포의 세포손상에 대해 알아보고자 하였다. 본 연구에서 고농도의 포도당과 유리 지방산의 배양조건에서 정상 또는 저농도의 포도당과 유리 지방산의 배양조건에 비해 호중구의 혈관내피세포 부착률과 호중구의 활성화, 호중구에 의한 superoxide 음이온 생성 및 혈관 내피의 세포독성 등이 현저히 증가함을 보였다. 또한 고농도의 포도당과 유리 지방산으로 자극하였을 때 호중구에서 NAD(P)H oxidase의 세포막 구성요소인 gp91<sup>phox</sup>의 발현이 현저히 증가하였고, NAD(P)H oxidase 억제제로 알려진 NAC로 전처리하였을 때 고농도의 포도당과 유리 지방산에 의해 증가한 호중구의 superoxide 음이온 생성과 혈관 내피세포의 세포독성이 예방됨을 보였다.

일반적으로 정상적인 생리 환경에서 면역계의 포식 작용을 위한 반응성 산소유리기 생성에 있어 NAD(P)H oxidase의 역할은 이미 잘 알려져 있다. 호중구는 세포 방어의 일차적 역할을 수행함에 있어 많은 양의 superoxide 음이온을 생성하기 위해서 NAD(P)H oxidase로 불리는 세포막의 효소 복합체가 있어야 하고, 이로 인해 생성된 반응성 산소유리기는 세균을 제거하는 역할을 한다<sup>19)</sup>. 이 효소 복합체인 NAD(P)H oxidase는 휴지기 세포에서 구성요소들이 세포막과 세포질 사이에 분리되어 있어 불활성화 상태로 존재한다. 호중구의 NAD(P)H oxidase는 flavo-cytochrome b558을 포함한 세포막 소단위(gp91<sup>phox</sup>와 p22<sup>phox</sup>)와 세포질 소단위(p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac2)로 구성된다<sup>19)</sup>. 자극에 의해 호중구가 활성화되면 세포질 소단위인 p47<sup>phox</sup>와 p67<sup>phox</sup>

가 인산화 되면서 세포질 내에서 세포막으로의 전위가 일어나고 flavo-cytochrome b558과 결합하면 NAD(P)H oxidase가 활성화되고 superoxide 음이온이 생성된다<sup>20)</sup>.

혈관내피세포와 포식계 세포들에 대한 여러 선행한 연구에서 고혈당에 의해 증가된 superoxide 음이온 생성과 산화 스트레스와 연관성을 보인 바 있다. 건강한 지원자에서 75 g의 경구 혈당부하를 하였을 때, 다형핵 백혈구와 단핵구 세포 모두에서 반응성 산소유리기 생성이 증가하였다<sup>21)</sup>. 같은 저자들은 지질이나 단백질을 복용 후에도 반응성 산소유리기 생성이 증가함을 보였고<sup>22)</sup>, 48시간 공복을 통해 포도당, 단백질, 지질 등에 의한 증가된 반응성 산소유리기의 감소를 유도하였다<sup>23)</sup>. 오래 전부터 당뇨병환자에서 단핵구에 의한 반응성 산소유리기 생성이 증가되어 있음이 알려져 있고<sup>24)</sup>, 증가된 산화 생성물은 지질과 단백질, DNA 등에 산화 손상을 일으키는 잘 알려진 사실이다<sup>25)</sup>. 당화혈색소 10% 이상의 잘 조절되지 않는 제1형 당뇨병환자의 단핵구에서 산화 민감성 전사 인자인 NF- $\kappa$ B의 활성이 증가되어 있었고, 이는 항산화제로 유의하게 억제되었다<sup>26)</sup>.

최근 제2형 당뇨병환자를 대상으로 한 연구에서 고혈당과 증가된 최종당화산물들이 호중구를 자극하고, p47<sup>phox</sup>의 막 전위유도와 RAGE-ERK1/2 경로를 자극하여 p22<sup>phox</sup>와의 결합 유도를 통해 산화스트레스를 증가시킨다고 보고한 바 있다<sup>27)</sup>. 반응성 산소유리기 생성을 위한 호중구를 기폭시키는 것과 관련된 주된 인자는 고혈당으로 생각되고<sup>28)</sup>, 당뇨병에서 반응성 산소유리기 생성에 과민한 반응을 보이는 호중구의 표현형과 당화혈색소가 유의한 상관관계를 보였다<sup>28)</sup>. 고혈당 등에 의해 발생한 최종당화산물들이 대식세포의 활성화를 이끌어 대식세포에 의해 분비되는 lipoprotein lipase (LPL)의 합성을 자극하여 죽상동맥경화증을 조장한다는 보고도 있다. 이때 LPL 유도는 반응성 산소유리기, PKC, transcription factor AP-1을 필요로 한다<sup>29)</sup>. 반대로 포식계의 NAD(P)H oxidase에 의해 생성된 산화물이 포도당 비의존적인 경로를 통해 최종당화산물 생성을 유발하고 이것이 혈관 손상에 기여하는데 중요한 역할을 한다고 보고한 연구도 있다<sup>30)</sup>.

건강한 사람의 호중구에서 NAD(P)H oxidase의 활성화는 정상 조직과 혈관 손상을 막기 위해 적절한 수준으로 조절된다. 그러나 TNF- $\alpha$ , GM-CSF와 같은 염증 유발 사이토카인들이 호중구의 '기폭제' 역할을 하여 NAD(P)H oxidase를 통해 세균 탐식을 위해 활성화를 증강시키는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. 당뇨병환자에서 일반적으로 호중구의 세균 탐식 및 제거능이 감소되어 염증이 잘 생기며, 고혈당에 의해

오히려 superoxide 음이온의 생성을 억제한다는 보고<sup>32)</sup>도 있어 본 연구에서 고혈당에 의한 호중구의 superoxide 음이온 생성 증가에 대해 반론이 제기될 수 있다. 그러나 생체 내에서 고혈당으로 인해 호중구의 탐식능이 감소하지만, 본 연구에서 혈관내피세포와의 상호 작용으로 과량의 호중구가 혈관내피세포에 부착하고 이로 인해 호중구의 단백질 분해 효소와 superoxide 음이온의 생성 증가로 혈관내피세포의 염증과 손상이 증가함을 보였다. 따라서 고혈당에 의한 호중구의 염증성 반응을 이해할 때 두 가지 상반되는 결과를 모두 생각하여야 할 것이며, 이에 대해서는 보다 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

당뇨병환자에서 유리 지방산이 증가하고 과다한 유리 지방산은 구연산회로(citric acid cycle)로 들어가서 acetyl-CoA를 증가시키고 과다한 NADH를 만든다. 이는 미토콘드리아에서 superoxide 음이온 생성을 증가시킨다. 유리 지방산은 또한 오래 전부터 호중구에서 NAD(P)H oxidase 의존성 superoxide 음이온 생성의 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 물론 유리 지방산은 호중구 이외의 혈관내피세포에서도 NAD(P)H oxidase 활성화를 통해 반응성 산소유리기 생성 증가를 보인바 있다<sup>34)</sup>. 본 연구에서 저자들은 고농도의 유리 지방산은 정상 포도당 농도에서도 호중구의 NAD(P)H oxidase 활성화를 통해 superoxide 음이온 생성을 증가시킬 뿐만 아니라, 호중구의 활성화 및 혈관내피세포 부착률도 증가시켜 혈관내피손상에 기여함을 확인하였다. 또한 고농도의 유리 지방산을 고혈당과 동시에 노출하였을 때 호중구에 의한 혈관내피세포 손상이 보다 증가함을 보인 것에 본 연구의 의미를 둘 수 있겠다.

다형핵 백혈구의 내피세포 부착은 급성 심근경색, 뇌경색과 같은 죽상동맥경화증에 매개되는 다양한 질환에서 중요한 역할은 한다. 생리적으로나 병적 상태에서 내피세포에 호중구가 부착함으로써 혈관 내에서 밖으로 이동하고 그 결과 혈관성 질환이 발생한다고 인식되고 있다. 호중구의 내피세포 부착은 내피세포와 호중구에서 발현하는 여러 부착분자들(adhesion molecules)이 관여하는 복잡한 과정으로 이루어진다. 내피세포에서 발현되는 여러 가지 수용체가 이 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 이 중 ICAM-1 (CD54), E-selectin (CD62E)과 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)이 호중구가 내피세포에 부착하고 혈관 바깥으로 이동하는데 중요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. 당뇨병에서도 다형핵 백혈구의 혈관 내피세포 부착은 죽상동맥경화증 매개성 질환의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다<sup>35)</sup>. Omi 등은 27.8 mM 이상의 고농도 포도당에서 호중구의

혈관내피세포 부착이 증가하였고, 이것이 PKC 의존성 반응으로 ICAM-1, P-selectin, E-selectin과 같은 내피세포의 결합 분자 발현의 증가를 매개로 하여 일어남을 보인 바 있다<sup>36)</sup>. 저자들은 선행 연구에서 고농도의 포도당 배양조건에서 내피세포에 대한 호중구의 부착률과 내피세포를 통한 호중구의 이동률이 현저히 증가하고, 호중구에 의한 내피세포 손상이 증가함을 보인 바 있다<sup>12)</sup>.

NAD(P)H oxidase는 호중구를 포함한 포식계에서 뿐만 아니라 내피세포, 혈관 평활근세포 및 심장의 근육세포 및 베타세포를 포함한 여러 조직에 두루 존재한다<sup>8)</sup>. Lee 등의 연구에서 혈관내피세포에서는 주로 NAD(P)H를 기질로 사용하여 superoxide 음이온이 생성하는 것으로 알려져 있으며<sup>37)</sup>, 다른 연구에서도 혈관 조직에서 superoxide 음이온의 생성에 주로 NAD(P)H oxidase가 관여함을 보여주었다<sup>34,38)</sup>. 다량의 포도당과 palmitate를 통해 배양된 대동맥 평활근세포와 혈관내피세포에서도 포식세포처럼 PKC 의존 활성화를 통해 NAD(P)H oxidase가 자극됨이 알려져 있다<sup>34,39)</sup>.

이상의 결과를 종합해 보면 고혈당과 그 대사산물 및 고농도의 유리 지방산 등은 혈관 내피세포에 직접 작용하여 NAD(P)H oxidase에 의한 산화스트레스로부터 내피손상이 유발하는 기전뿐 아니라 호중구를 매개한 내피손상도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 즉 고농도의 포도당과 유리 지방산은 혈관 내피세포의 부착분자들을 증가시켜 호중구의 부착을 증가시키며 호중구의 NAD(P)H oxidase에 의한 superoxide 음이온과 독성 효소의 생성을 증가시키는 기전 등으로 혈관 주위의 염증 반응을 더욱 가속화하여 혈관 손상에 추가적인 역할을 할 것으로 기대된다. 하지만 당뇨병의 혈관합병증에 있어 호중구의 NAD(P)H oxidase에 의한 혈관 내피손상의 기전과 역할에 대해서는 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 산화스트레스가 당뇨병에서 혈관내피세포의 기능장애에 관여하여 혈관합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 죽상동맥경화증은 혈관세포들의 산화-환원 신호의 이상으로 인한 혈관의 만성 염증성 현상으로 설명되고 있어, 산화스트레스와 염증이 당뇨병 합병증의 병태생리에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. 당뇨병에서 혈관합병증을 일으키는 기전에 대해 보다 명확히 규명하고자 본 연구에서는 호중구로부터의 superoxide 음이온 생성에 대한 고농도의 포도당과 유리 지



방산의 효과와 이로 인한 혈관내피세포의 손상에 대해 알아보고자 하였다.

**방법:** 인간 호중구를 5.5 mmol/L, 30 mmol/L D-glucose와 3 nmol/L, 30  $\mu$ mol/L oleic acid를 함유한 배양매지를 만들어 1시간 동안 배양하였다. 인간대동맥 내피세포를 위 배지로부터 배양한 호중구와 같이 배양하여 호중구의 혈관 내피세포 부착률, 호중구의 활성화 및 superoxide 음이온 생성량, 호중구에 의한 내피세포의 세포독성 및 호중구의 NAD(P)H oxidase 소단위 발현 등을 측정하였다.

**결과:** 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu$ mol/L oleic acid 배양조건에서 5.5 mmol/L D-glucose와 3 nmol/L oleic acid 배양조건에 비해 호중구의 혈관내피세포에 대한 부착률, 호중구의 활성화, 호중구의 superoxide 음이온 생성량 및 호중구에 의한 내피세포의 세포독성이 현저히 높았다. 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu$ mol/L oleic acid로 처리하였을 때 호중구의 NADPH oxidase의 막구성 요소인 gp91<sup>phox</sup>의 발현이 유의하게 증가하였다. 30 mmol/L D-glucose와 30  $\mu$ mol/L oleic acid에 동시 노출로 인해 증가한 호중구의 내피세포에 대한 부착률, 호중구의 superoxide 음이온 생성, 혈관내피 세포독성 등은 NAD(P)H 억제제인 N-acetylcysteine로 진처리하였을 때 유의하게 감소하였다.

**결론:** 고농도의 포도당과 유리 지방산은 호중구를 활성화시키고, 호중구의 혈관내피세포에 대한 부착능을 증가시킨다. 또한 호중구에서 NAD(P)H oxidase을 통해 반응성 산소유리기 생성을 증가시켜 내피세포 주변의 염증반응을 일으켜 세포 손상을 증가시킨다.

## 참 고 문 헌

1. DeFronzo RA, Ferrannini E: *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care* 14:173-94, 1991
2. 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 Eng J Med* 329:977-86, 1993
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: *Hydroxyl 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. Arterioscler Thromb* 14:1521-8, 1994
6. Ross R: *Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med* 340:115-26, 1999
7. Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, Shasha SM, Shapiro G, Nasser L, Kristal B: *Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. Diabetes Care* 24:104-10, 2001
8. 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
9. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Liscomb MF, Collins T: *Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. Am J Pathol* 143:725-37, 1993
10. Carlos TM, Harlan JM: *Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood* 84:2068-101, 1994
11. Nathan CF: *Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. Blood* 73:301-6, 1989
12. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF: *Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. Circulation* 105:1756-9, 2002
13. Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR: *An in vitro model of ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. Am J Physiol* 259:G134-9, 1990
14. Yoshida N, Granger DN, Evans DJ Jr, Evans DG,

- Graham DY, Anderson DC, Wolf RE, Kvietys PR: *Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation. Gastroenterology* 105:1431-40, 1993
15. Son SM, Kim IJ, Kim YK: *Study on role of neutrophil in endothelial cell injury under high glucose condition. J Korean Diabetes Assoc* 24:652-65, 2000
16. Gannon DE, Varani J, Phan SH, Ward JH, Kaplan J, Till GO, Simon RH, Ryan US, Ward PA: *Source of iron in neutrophil-mediated killing of endothelial cells. Lab Invest* 57:37-44, 1987
17. Ohara Y, Peterson TX, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG: *Dietary correlation of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. Circulation* 92:898-903, 1995
18. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest* 91:2546-51, 1993
19. Babior BM: *NADPH oxidase. Curr Opin Immunol* 16:42-7, 2004
20. Hashida S, Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Takikawa T, Sumimoto H, Inagaki F, Fujii H: *Binding of FAD to cytochrome b558 is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production. J Biol Chem* 279:26378-86, 2004
21. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P: *Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. J Clin Endocrinol Metab* 85:2970-3, 2000
22. Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P: *Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. Am J Clin Nutr* 75:767-72, 2002
23. Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Ghanim H, Aljada A, Garg R, Kumar V: *Inhibitory effect of a two day fast on reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes and plasma ortho-tyrosine and meta-tyrosine concentrations. J Clin Endocrinol Metab* 86:2899-902, 2001
24. Hiramatsu K, Arimori S: *Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. Diabetes* 37:832-7, 1988
25. Dandona P, Thusu K, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T: *Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet* 347:444-5, 1996
26. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A, Nawroth PP: *Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. Diabetes Care* 21:1310-6, 1998
27. Omori K, Ohira T, Uchida Y, Ayilavarapu S, Batista EL Jr, Yagi M, Iwata T, Liu H, Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE: *Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. J Leukoc Biol* 84:292-301, 2008
28. Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam BH, Malabanan A, Trackman PC, Badwey JA, Van Dyke TE: *Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. J Leukoc Biol* 78:862-70, 2005
29. Beauchamp MC, Michaud SE, Li L, Sartippour MR, Renier G: *Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression. J Lipid Res* 45:1749-57, 2004
30. Anderson MM, Heinecke JW: *Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation. Diabetes* 52:2137-43, 2003
31. McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB, Johnson GL: *Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-and GM-CSF. J Leukoc Biol* 64:537-45, 1998
32. Perner A, Nielsen SE, Rask-Madsen J: *High glucose impairs superoxide production from isolated blood*

- neutrophils. Intensive Care Med* 29:642-5, 2003
33. Curnutte JT, Badwey JA, Robinson JM, Karnovsky MJ, Karnovsky ML: *Studies on the mechanism of superoxide release from human neutrophils stimulated with arachidonate. J Biol Chem* 259:11852-7, 1984
34. 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
35. Bannan S, Mansfield MW, Grant PJ: *Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in relation to vascular risk factors and to E-selectin genotype in the first degree relatives of NIDDM patients and in NIDDM patients. Diabetologia* 41:460-6, 1998
36. Omi H, Okayama N, Shimizu M, Okouchi M, Ito S, Fukutomi T, Itoh M: *Participation of high glucose concentrations in neutrophil adhesion and surface expression of adhesion molecules on cultured human endothelial cells: effect of antidiabetic medicines. J Diabetes Complications* 16:201-8, 2002
37. Lee HS, Son SM, Kim YK, Hong KW, Kim CD: *NAD(P)H oxidase participates in the signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Life Sci* 72:2719-30, 2003
38. Kim BH, Lee CW, Park JL, Kang YH, Kim IJ, Kim YK, Son SM: *High glucose modulates vascular smooth muscle cell proliferation through activation of PKC- $\delta$ -dependent NAD(P)H oxidase. J Korean Diabetes Assoc* 30:416-27, 2006
39. Rask-Madsen C, King GL: *Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:487-96, 2005