

프로테오믹스를 이용한  
당뇨망막병증 환자의 유리체분석

연세대학교 대학원

의 학 과

이 성 진

프로테오믹스를 이용한  
당뇨망막병증 환자의 유리체분석

지도교수 권 오 응

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 15일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 성 진

# 이성진의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

## 감사의 글

제게 많은 축복을 주신 하나님께 먼저 감사를 드립니다.

박사과정을 시작한 게 엿그제 같은데 벌써 세 번째 겨울을 맞았습니다. 배움이 깊어질수록 자신감 보다는 부족함을 깨닫게 됩니다. 그럼에도 불구하고 이렇게 논문을 마칠 수 있게 되어 기쁩니다. 홀가분한 마음보다 감사하는 마음이 앞서는 것은 아낌없이 격려와 도움을 주셨던 분들이 계셨음을 알기 때문입니다.

제게 망막이 무엇인지 가르쳐 주셨고, 어려울 때마다 격려해 주시고, 바쁘신 와중에도 세심하게 연구를 지도해 주신 권오웅 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 이 논문 준비과정 동안 자상한 충고와 가르침으로 이끌어 주신 이현철 교수님, 김현숙 교수님, 이성철 교수님, 박성희 교수님께 감사를 드립니다.

연구진행과정에서 필요할 때마다 도움을 아끼지 않으신 이성호 박사님과 유원일 사장님을 포함한 아이진 식구들에게도 감사를 드립니다. 또한 이번 기회에 전임의 시절부터 저를 아껴주신 고희준 교수님, 김성수 교수님, 서경률 교수님, 유용성 원장님, 언제나 저를 도와준 안과의국 식구들에게도 감사드립니다.

그리고 저를 위해 늘 기도해 주시고 지금 이곳까지 설 수 있도록 끊임없는 사랑을 베풀어주신 아버님, 어머님, 장인어른, 장모님, 처형, 동서, 언제나 든든한 힘이 되어준 아내 선오, 사랑하는 딸 지혜와 미소에게도 감사하는 마음과 함께 이 작은 결실의 기쁨을 드립니다.

저자 씬

# 차 례

그림 및 표 차례	
국문 요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	6
1. 실험재료.....	6
2. 실험방법.....	6
가. 유리체 검체 얻기.....	6
나. 샘플 전처리 단계.....	7
다. 샘플 처리 단계.....	7
라. IEF(isoelectronic focussing) 단계.....	7
마. Acrylamide gradient gel 전기이동 단계.....	8
바. 염색단계.....	8
사. 이미지 분석.....	8
아. MALDI-TOF 질량분석기 분석.....	8
자. Q-TOF 분석기 분석.....	9
III. 결과.....	14
1. 유리체 검체의 이차원 전기영동을 위한 해결점들.....	14
가. 유리체 검체를 얻는 방법 - You's bottle의 이용.....	14
나. 유리체 검체에서 2차원 전기영동 젤을 얻는 방법 - 미세필터의 사용.....	14
2. 이차원 전기영동 단백질 지도의 비교.....	14
3. 단백질의 분석 결과.....	15
4. 당뇨병망막병증에서 발현 변화를 보인 단백질들.....	16
IV. 고찰.....	33
V. 결론.....	46
참고문헌.....	48
영문요약.....	59

## 그림 차례

Figure 1. A) You's bottle (Eyegene inc. product) for collecting vitreous sample. B) Collection of vitreous sample during operation using You's bottle.....	11
Figure 2. Microfiltration disc with 1,000,000 cut off (TQPL, UK).....	12
Figure 3. Two-dimensional electrophoresis image of the vitreous with proliferative diabetic retinopathy before using 1,000,000 cut off membrane.....	17
Figure 4. Two-dimensional electrophoresis image of the vitreous with proliferative diabetic retinopathy after using 1,000,000 cut off membrane.....	18

Figure 5. Two-dimensional electrophoresis map of the control vitreous.....	19
Figure 6. Two-dimensional electrophoresis map of the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.....	20
Figure 7. Example of the protein alteration in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy .....	21
Figure 8. Cascade of diabetic retinopathy pathology & expected functions of the proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy .....	45

## 표 차례

Table 1. Laboratory data of the patients with proliferative diabetic retinopathy whose vitreous samples were used in this study.....	10
Table 2. The composition of acrylamide gradient gel from 8% to 18%.....	13
Table 3. Identified proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy from each spots on the 2-dimensional gel.....	22
Table 4. Identified 36 proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.....	28
Table 5. Up-regulated proteins and their expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.....	30



Table 6. Down-regulated proteins and their expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy..... 31

## 국 문 요 약

### 프로테오믹스를 이용한 당뇨망막병증 환자의 유리체 분석

프로테오믹스를 이용하여 정상인의 유리체와 당뇨망막병증 환자의 유리체를 비교분석하고 당뇨망막병증에서 유리체내 단백질의 발현 변화를 알아 보아 이를 통해 당뇨망막증에 관여할 것으로 보이는 단백질들을 알아보고자 연구하였다.

당뇨망막병증 환자의 유리체와 정상 유리체를 대상으로 2차원 전기영동을 시행한 후 젤에 있는 단백질 점들의 변화를 이미지 분석으로 비교하였고, 변화된 것들이 무슨 단백질인지 알아내기 위해 MALDI-TOF/ESI-TOF 질량분석을 시행하였다.

젤에 있는 총 94개의 단백질 점들을 분석한 결과 총 36개의 서로 다른 단백질이 있음을 확인할 수 있었고, 당뇨망막병증 유리체에서 정상과 비교하여 23개의 단백질들이 변화를 보였다. Alpha-1-antitrypsin, 면역글로불린 A와 G, 보체 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>를 포함하여 19개의 단백질들이 당뇨망막병증 유리체에서 증가하였고, pigment epithelium derived protein(PEDF)을 포함하여 4개의 단백질들이 감소하였다.

저자는 변화를 보인 단백질 중 PEDF가 신생혈관 형성에 주된 역할을 담당할 것으로 생각한다. 또한 면역글로불린이나 보체의 증가는 당뇨망막병증의 면역관련염증이 관여함을 시사하고 있다. 그 외에 alpha-1-antitrypsin을 포함한 일부 단백질들은 망막허혈로 인한 세포의 손상을

막는데 관여할 것으로 보인다.

---

핵심되는 말 : 프로테오믹스, 당뇨망막병증, 유리체, 단백질, 분석, 전기영  
동, MALDI-TOF

# 프로테오믹스를 이용한 당뇨망막병증 환자의 유리체 분석

<지도교수 권 오 웅>

연세대학교 대학원 의학과

이 성 진

## I. 서론

지난 30여년 동안의 급속한 경제성장과 생활양식의 변화는 한국인의 질병양상에도 많은 영향을 끼쳤다. 그 중 대표적인 성인병인 당뇨병은 국내에서도 그 유병율이 점점 늘어나서 1980년대 후반부터 10대 입원진료 질환의 하나가 되었으며 한국인의 10대 사망원인질환의 하나가 되어 있는 실정이다.<sup>1,2</sup> 1995년 보고서에 의하면 성인 당뇨병의 연간 발생률은 2.5%이고 유병율은 10%를 넘고 있으며 당뇨병으로 인한 의료비의 지출도 증가하여 총 입원진료비의 2.0%를 차지하고 있다.<sup>3,4</sup> 또한 당뇨병의 3대 합병증 중 하나인 당뇨망막병증은 청장년대에서 실명의 주된 원인이 되어 당뇨병 환자들이 건강한 생활을 영위하는데 큰 위협이 되고 있을 뿐 아니라 사회경제적인 면에서 큰 손실이 되고 있는 만큼 심각한 사회적인 문제로 대두되고 있다.<sup>5</sup>

당뇨망막병증은 망막혈관의 손상으로 시작되는데 특징적인 혈관의 변화로 혈관주위세포(pericyte)의 소실, 망막모세혈관 기저막의 비후, 모세혈관의 내피세포 소실, 미세혈관류의 발생 등을 들 수가 있다. 이런 손상들은 혈관-망막장벽(blood-retinal barrier)을 파괴시키고 혈관의 투과성을 증가시키게 되어 망막내출혈, 망막삼출물 및 망막부종을 일으키게 된다. 시간이 지날수록 이러한 변화가 심해져서 미세혈관들은 폐쇄되고 망막에 허혈이

생기며 결국 망막의 신생혈관이 발생하게 된다. 망막 내에 발생한 신생혈관들은 시신경유두표면이나 망막표면에서 내경계막을 뚫고 유리체강내로 자라게 된다. 이 신생혈관들은 초기에는 혈관만으로 이루어져 있지만 차차 눈 속의 유리체와 작용하여 신생혈관주위에 섬유증(fibrosis)이나 신경교증(gliosis)이 생기게 된다. 그렇게 되면 많은 장애물이 신생혈관 주위로 새거나, 쉽게 파열되어 유리체 출혈이 발생하기도 하며 유리체에서 생긴 반흔이 수축하게 되면 망막의 견인막을 형성하게 되어 망막주름, 낭포변성, 망막층간분리 뿐 아니라 결국 견인망막박리를 유발하게 된다.<sup>6</sup> 이 과정에서 유리체의 어떤 단백질과 성분들이 당뇨망막병증에 관여할 것으로 생각되는바 본 연구는 당뇨망막병증과 관련되어 발현변화가 있는 단백질을 찾아내기 위함이다.

유리체 단백질을 연구하는 방법에는 방사선면역측정법(radioimmunoassay, 이하 RIA),<sup>7</sup> 효소면역측정법(enzyme-linked immunoabsorbent assay, 이하 ELISA),<sup>8,9,10</sup> western blot,<sup>10</sup> 고작위액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, 이하 HPLC)<sup>11</sup> 등이 있다. 그러나 이러한 방법으로는 한번에 소수의 유리체 단백질을 분석할 수밖에 없었다. 그러나 최근 세계적으로 단백질 분석에 이용되고 있는 프로테오믹스 기법을 이용한다면 한번에 많은 유리체 단백질을 분석할 수 있는데 프로테오믹스 기법을 이용하여 모든 유리체의 단백질들을 한 번에 분석할 수 있다면 유리체에 대한 단백질 지도를 만들 수 있을 것이다.

현재 많은 단백질 연구에 이용되고 있는 프로테오믹스 분석은 안과적으로는 망막의 세포내 단백질 분석에 이용되고 있지만 아직도 유리체 분석에는 거의 이용되지 않고 있는 실정이다. 그 이유는 유리체의 단백질 분석이 어렵기 때문인데 유리체 검체를 다량 확보하기가 어렵고, 유리체내 단백질의 양 또한 극히 소수이며, 물을 제외한 대부분의 유리체 구성성분인

히알루론산(hyaluronic acid)과 아교질(collagen)이 단백질의 분석에 방해가 되기 때문이다. 또한 2차원 전기영동의 복잡하고 섬세한 과정들을 여러 시간 동안 관리해야 하는 것도 부담이 될 수 있겠다.

본 연구에서는 정상인의 유리체와 당뇨망막병증 환자의 유리체를 비교 분석하여 당뇨망막병증에서의 유리체내 단백질 변화를 알아보고 이를 통해 당뇨망막병증에 관여할 것으로 생각되는 단백질들을 알아보고자 하였다. 또한 이를 위해 프로테오믹스 기법을 이용하였으며 프로테오믹스 기법을 이용한 분석방법의 문제와 해결점을 알아보았다. 궁극적으로는 당뇨망막병증과 관련되어 발현변화가 있는 단백질을 발굴하여 이를 이용한 당뇨망막병증의 조기 진단제 개발 및 당뇨망막병증의 진행을 차단하거나 지연시키는 치료제 개발을 목적으로 한다. 본 연구는 프로테오믹스 기법을 유리체 단백질 분석에 적용한 초기의 연구이므로 향후 유리체 분석의 새로운 방법론을 제시할 뿐 아니라 망막질환의 병리적 기전들을 밝히는데 기여할 수 있을 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

대상군으로 10명의 인슐린비의존성 당뇨병이 있으면서 고위험 증식당뇨 망막병증이 있는 환자로 정하였다. 대상군은 출혈이 유리체에 남아있지 않은 유리체혼탁이나 유리체건인막으로 유리체절제술을 시행받은 환자들로 수술 중 유리체를 2ml 정도 얻었다. 환자는 49세에서 71세로 평균 58.5세 이었고, 남자가 7명, 여자가 3명이었다. 가족력이 있는 경우가 3명이었고, 유리체 검체를 얻을 때 측정된 혈압은 3명에서 고혈압에 해당하는 140/90mmHg 이상이었다. 공복혈당량은 250mg/dl 이상이 2명이었고, 150-200mg/dl이 6명이었고, 2명은 150mg/dl 이하이었다. HbA1c는 10명 모두 6.0mg/dl 이상이었으며, 모두 신장손상으로 인한 투석은 받지 않은 상태 이었다 (Table 1).

대조군으로 전신질환이나 눈의 질환 병력이 없는 장기기증 환자의 사후 5-7시간 이내의 안구 3안에서 유리체 검체를 얻었다. 단백질을 2차원 젤 전기영동(pH 3-10; 8-18% gradient)으로 분리하였다. 단백질은 Coomassie blue-stained gel cutting, trypsin digestion, MALDI mass spectrometry, Q-TOF 등으로 분석하였다.

### 2. 실험방법

#### 가. 유리체 검체 얻기

사람 안구 내 유리체의 단백질체 분석을 위해서 유리체절제술을 시행할 때 특수 고안된 병(YOU's bottle, 실용신안 2001 등록)을 유리체절제기와 무균적으로 연결한 후 채취하였다 (Figure 1).

#### 나. 샘플 전처리 단계

프로테오믹스 방법에 적용하기 위해서 유리체를 분석하기 용이하게 처리해야 한다. 유리체는 고분자당인 히알루론산이 과량 함유되어 있다. 그런데 이 당은 단백질을 분리를 방해하는 것으로 판명되었으며 따라서 이를 효과적으로 제거할 수 있는 방법이 필요하다. 고분자당을 제거하기 위한 방법으로 1,000,000 cut-off 막을 이용하였다 (Figure 2). 이 방법은 4 ml의 유리체를 16ml의 증류수로 희석하여 1,000,000 cut-off 막이 있는 튜브에 넣어 4°C에서 8,000rpm 속도로 2시간 원심분리하고 이 과정을 3회 반복하여 1,000,000 이상 되는 고분자당을 분자량의 차이를 이용하여 걸러내었다. 걸리지 않은 단백질은 다시 10,000 cut-off 막이 있는 튜브에 넣어 4°C에서 4,000rpm 속도로 원심분리하고 농축한 후 분석에 이용하였다. 고분자당을 제거하는 방법은 낮은 pH에서 분리가 잘되지 않았던 문제를 해결함으로써 매우 효과적인 분석을 가능케 하였다.

#### 다. 샘플 처리 단계

프로테오믹스 분석을 위한 단백질은 1mg/ml 이상이 필요하다. 단백질을 추출하기 위해 먼저 샘플 양의 3배인 TCA/cold acetone를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질에 붙어있는 TCA를 제거하기 위해 cold acetone으로 2회 반복하여 세척하고, 남아 있는 acetone을 상온에서 증발시켰다. 단백질은 10 $\mu$ L의 10% SDS와 2.5% DTE를 첨가하여 100°C에서 5분간 끓인 후 400 $\mu$ L의 sample buffer(9M Urea, CHAPS, 0.3% Ampholytes, DTE, Bromophenol blue)를 첨가하여 준비하였다.

#### 라. IEF (Isoelectric Focusing) 단계

단백질의 pH에 따라 이동할 수 있게 만들어진 겔체를 400 $\mu$ L씩 IEF 트



레이에 넣고, 12시간동안 25mA의 전극을 띠(strip)의 젤에 단백질이 스며들도록 하였다. 그런 후 17시간동안 250V의 자극을 주어 스며든 단백질이 각각의 pH에 따라 이동하도록 하였다.

#### 마. Acrylamide gradient gel 전기이동 단계

아래 표에 나타낸 구성비율을 갖는 8%-18%의 acrylamide gradient gel을 합성한 후 IEF 전기이동 시킨 띠를 넣어 2차원 전기이동을 실시하였다. 2시간 30분 동안 젤 당 3mA씩 전극을 준 후 다시 6시간 동안 젤 당 50mA씩 전극을 주어 단백질을 분자량에 따라 이동을 시켰다 (Table 2).

#### 바. 염색 단계

Coomassie Blue G250을 이용하여 젤에 펼쳐진 단백질을 확인할 수 있도록 염색하고 사진을 찍었다.

#### 사. 이미지 분석

정상인과 당뇨병망막병증환자의 유리체를 2차원 전기영동 시킨 후 Phoretix 소프트웨어(Nonlinear dynamics, USA)로 분석하여 변화된 단백질 군을 확인하였다.

#### 아. MALDI-TOF 질량분석기 분석

이미지분석으로 확보된 단백질은 질량분석기를 통해서 단백질 동정을 시행하였다. 질량분석기는 100ppm 이하의 정확도를 나타내는 Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry이며, 분석된 펩타이드 질량값은 MassLynx를 이용하여 데이터베이스 통해 조사하여 단백질을 동정하였다.

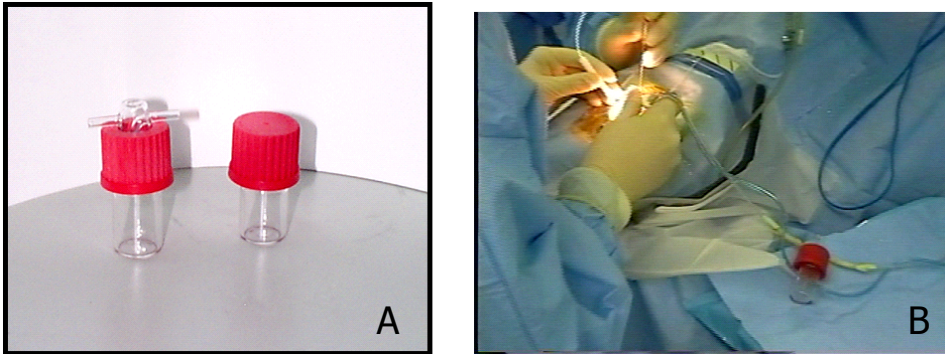
#### 자. Q-TOF 분석기 분석

MALDI spectrometry로 분석된 단백질은 보다 정확한 단백질 동정을 위해서 Q-TOF 분석기를 이용하여 단백질 서열을 결정하였다. 분석기는 ESI-TOF MS/MS와 Waters CapLC 등으로 m/z range 400-1800 이상에서 데이터를 얻었다. 이 데이터는 MASCOT search engine을 사용하여 NCBInr 데이터베이스를 검색하였다.

**Table 1.** Laboratory data of the patients with proliferative diabetic retinopathy patients whose vitreous samples were used in this study.<sup>1</sup>

No	S/A	Ht (cm)	Wt (kg)	FHx	D (yrs)	BP (mmHg)	FBS (mg/dl)	HbA1c (%)	T-chol (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	BUN/Cr (mg/dl)
1	M/54	161	59	+	17	110/70	255	10.3	163	293	38	134	26.5/1.8
2	M/54	170	71	-	30	130/93	162	9.2	218	150	31	157	14.0/1.0
3	F/61	155	55	-	15	130/80	183	8.0	175	190	32	105	20.1/2.0
4	F/68	158	54	-	20	130/80	153	8.5	159	269	25	95	9.5/1.2
5	M/71	160	60	-	15	140/90	185	7.5	152	173	34	98	14.3/1.2
6	M/54	169	69	-	20	130/80	156	8.3	114	71	35	67	10.6/0.9
7	M/52	176	73	-	20	130/80	112	9.4	178	48	46	90	13.6/1.7
8	M/49	175	74	+	28	150/100	139	7.2	189	90	63	95	18.8/1.6
9	F/65	162	56	+	15	160/120	197	8.9	262	220	37	183	15.2/1.7
10	M/57	153	51	-	20	130/80	296	8.3	175	62	48	108	18.1/1.3

<sup>1</sup>This table uses abbreviated words : S/A (Sex/Age), Ht(Height), Wt(Weight), FHx(Family history), D(Duration), BP(Blood pressure), FBS(Fasting blood sugar), T-chol(Total cholesterol), TG(Triglyceride)



**Figure 1.** A) You's bottle (Eyegene inc. product) for collecting vitreous sample. B) Collection of vitreous sample during operation using You's bottle.



Figure 2. Microfiltration disc with 1,000,000 cut off (TQPL, UK).

**Table 2.** The composition of acrylamide gradient gel from 8% to 18%.

Composition	8 %	18 %
Acrylamide Stock (30% T, 2.67% C)	69.16ml	139.36ml
Glycerol	X	52.52ml
Distilled water	122.72ml	X
1.5M Tris-Cl (pH 8.8)	65ml	65ml
10% SDS	2.6ml	2.6ml
10% APS	1260 $\mu$ l	1260 $\mu$ l
TEMED	125 $\mu$ l	125 $\mu$ l

### III. 결과

#### 1. 유리체 검체의 이차원 전기영동을 위한 해결점들

가. 유리체 검체를 얻는 방법 - You's bottle의 이용

눈 속에 채워져 있는 젤 성분의 유리체는 망막의 여러 부분과 단단히 결합되어 있기 때문에 검체를 얻는 과정 중에 생길 수 있는 망막의 손상을 피하는 것이 중요하다. 망막의 손상을 피하기 위하여 유리체 절제기 (vitrectome)를 이용하는데 이 때 You's bottle을 이용한다면 능동적인 흡입력(active suction)을 이용할 수 있으므로 검체를 쉽게 얻을 수 있다.

나. 유리체 검체에서 2차원 전기영동 젤을 얻는 방법 - 미세필터의 사용

유리체를 직접 2차원 전기영동 할 경우 젤에 자세한 단백질의 점들이 나타나지 않았다. 이것은 고분자당인 히알루론산과 아교질 때문에 특히 저 pH에서 단백질들이 잘 분리되지 않는 현상 때문이다 (Figure 3). 이것은 1,000,000과 10,000 cut off 막이 있는 미세필터를 이용하여 단계적으로 고분자당을 제거함으로써 해결할 수 있었다. 미세필터를 이용한 후에야 단백질들의 이동이 원활해져서 자세한 단백질 군들을 확인할 수 있었다 (Figure 4).

#### 2. 이차원 전기영동 단백질 지도의 비교

대조군과 증식당뇨망막병증(이하 당뇨망막병증) 유리체의 2차원 전기영동으로 얻은 단백질 지도는 그림 2와 3에 나타내었다. 같은 유리체 검체로 2차원 전기영동을 반복하여 시행하였을 때에도 같은 결과가 나옴을 확인하였다. Coomassie blue G250을 이용하여 염색하고 사진을 찍은 후 정상과 당뇨망막병증 젤의 이미지를 비교하였다. 그 결과 정상과 비교한 당뇨망막

병증 유리체 젤에서 총 94개의 서로 다른 점들을 확인하였고, 각각에 대하여 번호를 매긴 후 분석하였다 (Table 3, Figure 4).

당뇨망막병증 유리체의 단백질 군들은 대부분 정상 유리체의 점들과 비슷한 양상을 보였다 (Figure 5, 6). 일부 단백질들은 혈장 단백질에서 볼 수 있는 것이었다. 여기에는 albumin,  $\alpha$ -1 antitrypsin, transferrin, complement C<sub>4</sub>, apolipoprotein A-I, Ig G, transthyretin 등이 포함된다. 이것은 당뇨망막병증 유리체에서 발견되는 혈장 단백질은 망막혈관에서 유리체 출혈이 발생할 때 나온 것으로 생각할 수 있을 것이다.

젤에 있는 점들 중 정상 유리체와 당뇨망막병증 유리체와 비교하여 변화가 있었던 것들이 있었다 (Figure 7). 그 중 육안으로 보아도 차이를 알 수 있을 만큼 많은 변화를 보인 부분들이 있는데 그 변화의 양상이 조금씩 달랐다. 거의 없던 점들이 새로 진하게 나타난 경우로는 complement C<sub>3</sub>를 들 수 있으며 거의 없던 점들이 새로 희미하지만 분명하게 나타난 경우도 있으며 면역글로불린 G를 들 수 있다. 또한 전에 있던 점들이 더욱 커지고 진해진 것으로는 alpha-1-antitrypsin, antithrombin 등을 들 수 있다. 기존에 진하게 있던 점들이 작아지거나 희미해진 경우도 있었으며 pigment epithelium derived factor를 들 수 있다. 그러나 대부분은 육안으로 식별하기 어려웠으므로 이미지 분석을 통하여 차이를 가릴 수밖에 없었다.

### 3. 단백질의 분석결과

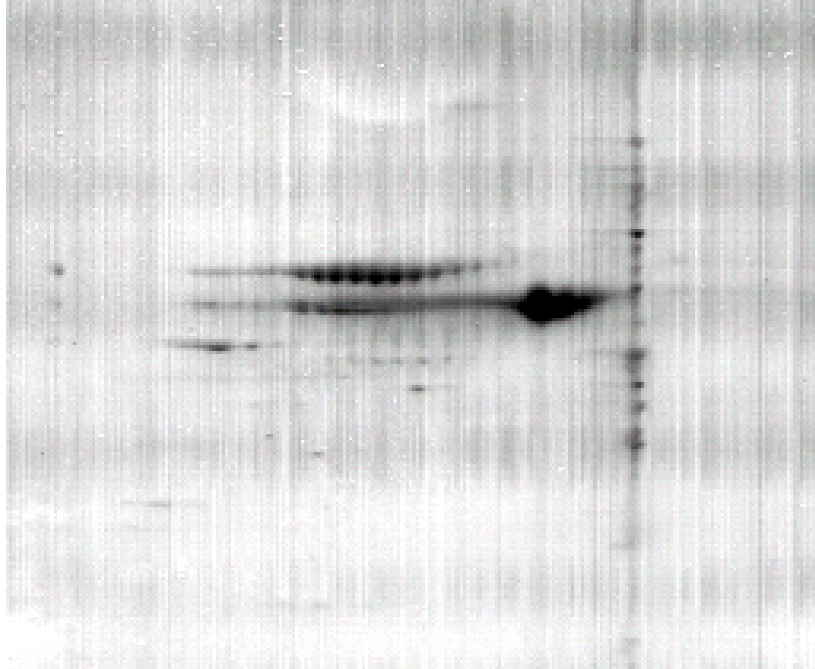
총 110개의 점을 따로 떼어 분석하였는데 16개의 미세한 점들은 단백질 동정이 되지 않았으며 그 중에는 단백질이나 펩타이드가 있는 것은 확인되었으나 정확히 무슨 단백질인지 구분되지 않는 경우도 포함되었다. 단백질에 대한 MALDI/TOF 질량분석과 Q-TOF 분석을 시행한 결과 많은 점들이 서로 동종(isoform) 단백질이었으며, 서로 다른 단백질은 36종 이었다



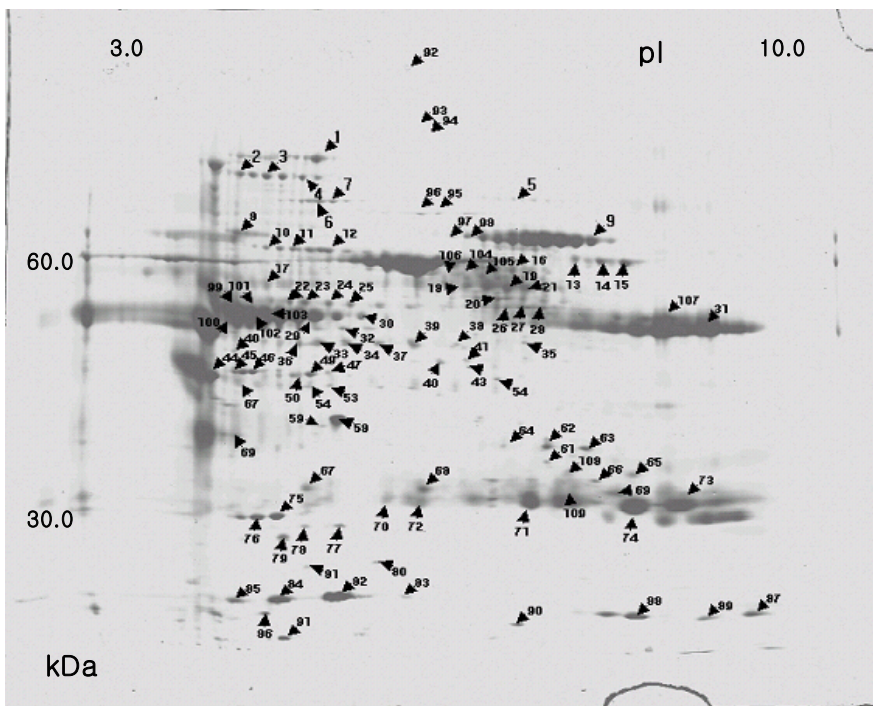
(Table 4). 단백질의 분자량이나 pI는 데이터베이스(SwissProt.)와 거의 일치하였다.

#### 4. 당뇨병망막병증에서 발현 변화를 보인 단백질들

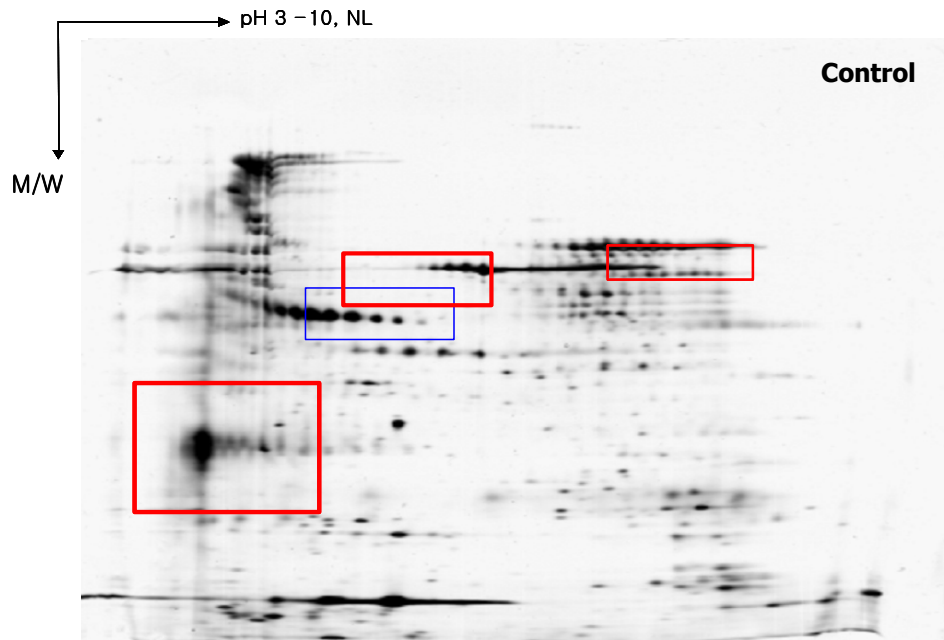
이와 같이 정상과 비교하였을 때 당뇨병망막병증 유리체에서 증가한 단백질들은 alpha-1-antitrypsin, fibrinogen gamma chain, LOMP protein, alpha-18-glycoprotein, complement C<sub>3</sub> & C<sub>4</sub>, Ig gamma-1 chain C region, zinc alpha-2-glycoprotein, carbonic anhydrase I, guanylyl cyclase actining protein 2, hemopexin, keratin type II cytoskeletal 1, antithrombin III, serine/threonine protein phosphatase 2A, transitional endoplasmic reticulum ATPase, Ig A alpha-2 chain C region, apolipoprotein A-I & IV, dual specificity mitogen-activated protein kinase 7으로 총 19종이다 (Table 5). 반대로 당뇨병망막병증 유리체에서 감소한 단백질은 PEDF(pigment epithelium derived factor), transthyretin, Ig kappa chain VII region, Ig kappa light chain으로 총 4종 이었다 (Table 6, Figure 7).



**Figure 3.** Two-dimensional electrophoresis image of the vitreous with proliferative diabetic retinopathy before using 1,000,000 cut off membrane does not show the details of the protein spots.



**Figure 4.** Two-dimensional electrophoresis image of the vitreous with proliferative diabetic retinopathy after using 1,000,000 cut off membrane shows the detail of the protein spots. Vitreous map with numbering after image analysis have the spots which show the difference of density between the control vitreous and the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.



**Figure 5.** Two-dimensional electrophoresis map of the control vitreous. Color boxes show the altered proteins between the control vitreous and the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.

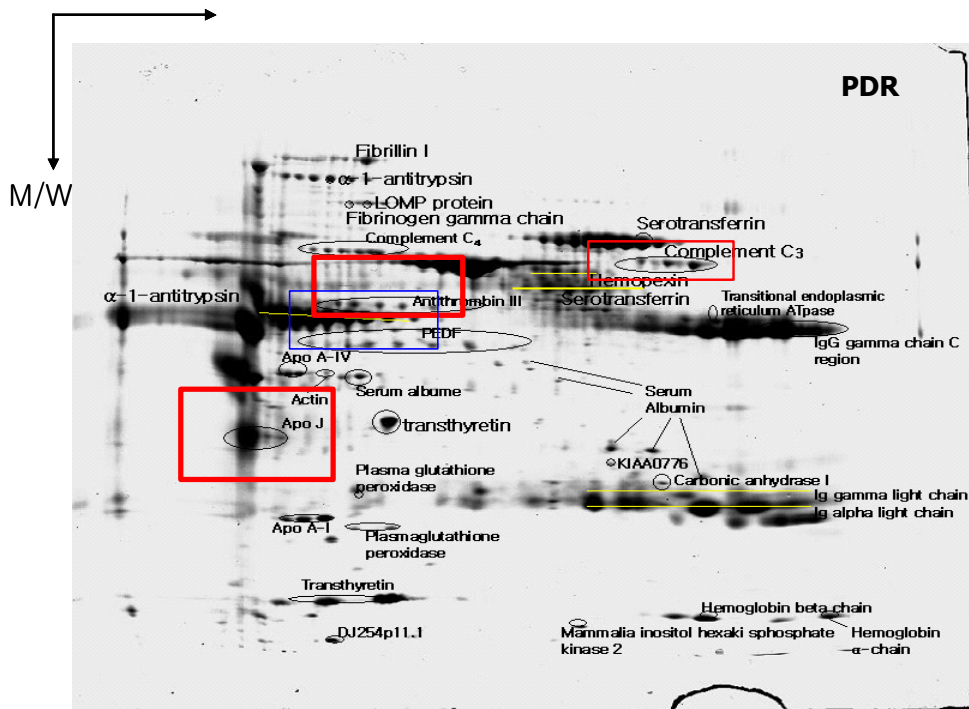
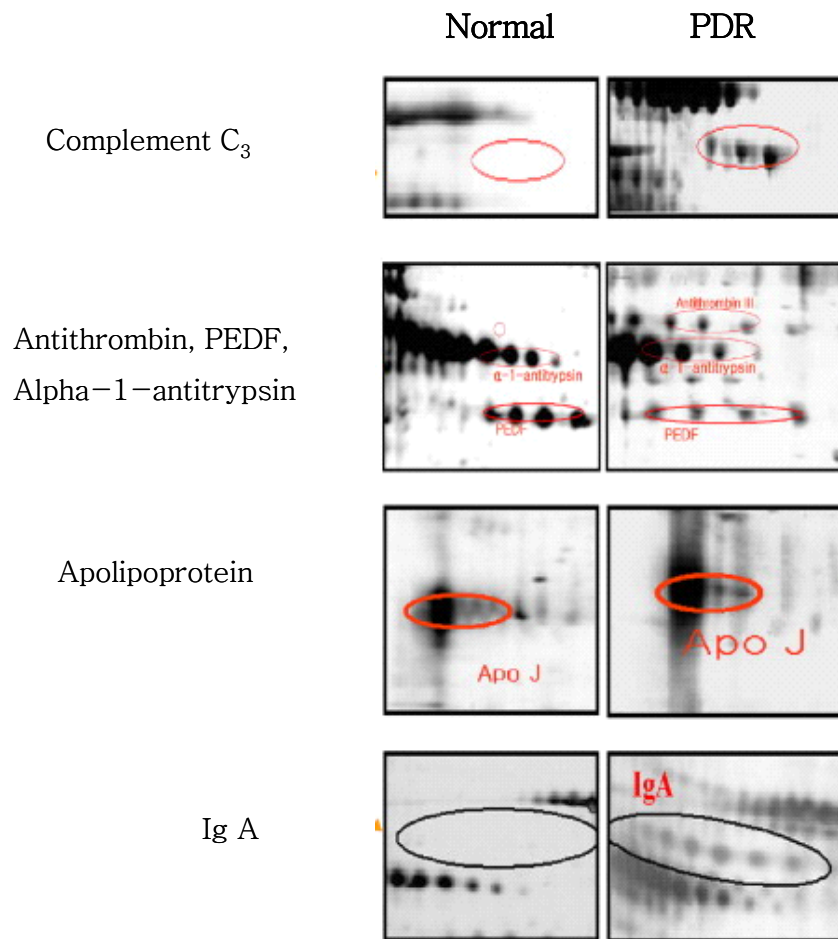


Figure 6. Two-dimensional electrophoresis map of the proliferative diabetic retinopathy vitreous. Color boxes show the altered proteins between the control vitreous and the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.



**Figure 7.** This picture shows example of the protein alteration in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. Some proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy vitreous (in the boxes) including complement C<sub>3</sub>, antithrombin, alpha-1-antitrypsin, IgA show up-regulation and others including pigment epithelium derived factor(PEDF) show down-regulation compared with the control vitreous.

**Table 3.** Identified proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy from each spots on the 2-dimensional gel.

Spot No. <sup>1</sup>	Identified proteins	Accession No. <sup>2</sup>	Cov <sup>3</sup> %	Matching Peptides	MOWSE Score	T/Mr/pI <sup>4</sup>
1	Fibrillin 1	P35555	3.8	9	8.47E+03	312315/3.8
2	Alpha-1-antitrypsin	Q7M0E1	33.97	11	3.26E+08	46737/5.5
3	Alpha-1-antitrypsin	Q7M0E1	40.91	15	1.72E+12	46737/5.5
4	Alpha-1-antitrypsin	Q7M0E1	40.91	14	2.52E+11	46737/5.5
5						
6	Fibrinogen gamma chain	P02679	25.63	9	1.23E+06	49482/5.8
7	LOMO protein	Q9UQM5	11.42	6	7.37E+04	89665/5.8
8						
9	Serotransferrin	P02787	15.76	13	4.07E+08	77050/7.2
10	Alpha-1B-glycoprotein	P04217	22.15	8	3.49E+05	51941/5.9
11	Alpha-1B-glycoprotein	P04217	26.79	9	5.72E+06	51941/5.9
12	Complement C4	P01028	9.71	11	3.63E+08	192336/7.2
13	Complement C3	P01024	19.3	23	2.57E+18	187165/6.3
14	Complement C3	P01024	23.27	30	8.93E+24	187165/6.3
15	Complement C3	P01024	20.63	25	4.91E+20	187165/6.3
16	Hemopexin	P02790	19.48	9	1.22E+05	51677/7
17			16.63	8	3.29E+04	47883/6.6
18	Hypothetical 80.6kDa protein	Q9UG02	20.11	9	1.50E+06	80584/9

19	KIAA1642 protein	Q9H254	12.52	17	6.75E+ 13225405/5.5
20	Serum albumin	P02768	20.36	11	7.16E+ 0669367/6.2
21	Serotransferrin	P02787	22.92	14	3.33E+ 0977050/7.2
22	AntithrombinIII	Q13815	26.08	11	2.42E+ 0752603/6.7
23	AntithrombinIII	Q13815	25.22	11	6.25E+ 0652603/6.7
24					
25	AntithrombinIII	Q13815	38.36	15	7.42E+ 0952603/6.7
26	Serotransferrin	P02787	12.18	9	1.37E+ 0677050/7.2
27	Serotransferrin	P02787	11.6	7	3.37E+ 0477050/7.2
28	Serum albumin	P02768	28.41	14	1.03E+ 0969367/6.2
29	Alpha-1-antitrypsin	P04217	40.91	16	5.71E+ 1246737/5.5
30					
31	Ig gamma-1 chain C region	P01857	28.48	6	6.15E+ 0536106/8.6
32	Fibrinogen gamma chain	P02679	32.95	11	9.32E+ 0749482/5.8
33	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	31.58	13	2.87E+ 1046329/6.1
34	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	21.29	8	7.66E+ 0546329/6.1
35					
36	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	19.62	7	2.72E+ 0546329/6.1
37	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	31.58	13	2.87E+ 1046329/6.1
38	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	21.29	8	7.66E+ 0546329/6.1
39	Pigment epithelium -derived factor	Q13236	21.29	8	7.66E+ 0546329/6.1



---

40	Alpha-1-antitrypsin	Q7M4R2	23.92	7	3.09E+0546737/5.5
41	Serotransferrin	P02787	9.03	6	1.28E+0477050/7.2
42	Serotransferrin	P02787	16.76	10	3.80E+0677050/7.2
43					
44	Apolipoprotein A-IV	Q15969	40.4	15	1.84E+1045371/5.4
45	Apolipoprotein A-IV	Q15969	45.71	18	1.03E+1245371/5.4
46	Apolipoprotein A-IV	Q15969	37.37	14	3.44E+0945371/5.4
47	Serum albumin	P02768	11.66	7	1.14E+0469367/6.2
48	Serum albumin	P02768	13.96	7	2.59E+0469367/6.2
49	Serum albumin	P02768	13.46	9	1.05E+0569367/6.2
50	Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	10.79	8	7.44E+0359519/5.2
51					
52	Zinc-alpha-2 -glycoprotein	P25311	34.58	10	4.82E+0633872/5.8
53	Actin, gamma-enteric smooth muscle	P12718	18.88	5	5.33E+0341877/5.4
54	Serum albumin	P02768	12.32	8	5.98E+0469367/6.2
55	Serum albumin	P02768	12.81	7	2.57E+0469367/6.2
56					
57	Complement C3	P01024	10.34	15	4.49E+12187165/6.3
58	Transthyretin	P02766	49.66	6	1.37E+0615887/5.7
59	Celldivision protein kinase3		26.23	5	1.44E+0435046/9.1
60					
61	Serum albumin	P02768	12.48	8	5.36E+0369367/6.2

---

62	Serum albumin	P02768	15.27	9	3.00E+0669367/6.2
63					
64	Kertin, type II cytoskeletal 1		25.04	9	7.73E+0765887/8.4
65	Serum albmin	P02768	16.09	9	3.49E+0569367/6.2
66	Carbonic anhydrase I	P00915	50.38	9	4.19E+09 28739/7
67	Prostaqlandin-H2 D-isomerase	P41222	32.63	4	1.00E+0521029/8.1
68	Prostaqlandin-H2 D-isomerase	P41222	32.63	4	1.00E+0521029/8.1
69	Ephrin B-2	P52799	17.72	5	9.20E+0336923/9.2
70	Prostaqlandin-H2 D-isomerase	P41222	32.63	4	1.00E+0521029/8.1
71	Guanylyl cyclase activating protein 2	Q9UMX6	24.62	4	1.88E+0423347/4.7
72	Guanylyl cyclase activating protein 2	Q9UMX6	24.62	3	1.63E+0323347/4.7
73	Guanylyl cyclase activating protein 2	Q9UMX6	24.62	4	1.88E+0423347/4.7
74	Serum albumin	P02768	14.94	9	1.18E+0469367/6.2
75	Apolipoprotein A-I	Q9UCS8		15	3.00E+1030778/5.7
76	Apolipoprotein A-I	Q9UCS8	48.31	16	1.70E+1130778/5.7
77	Plasma glutathione peroxidase	P22352	35.4	7	2.35E+0525506/8.4
78	Plasma glutathione peroxidase	P22352	42.04	10	1.00E+0725506/8.4
79	Hypothetical 82.6kDa protein	Q9UG02	14.84	6	6.86E+0682643/8.9
80					
81					
82	Transthyretin	P02766	85.71	10	2.48E+1015887/5.7

83	Transthyretin	P02766	48.3	4	3.79E+04 15887/5.7
84	Transthyretin	P02766	48.98	6	4.41E+05 15887/5.7
85	Transthyretin	P02766	49.66	7	3.79E+06 15887/5.7
86					
87	Hemoglobin alpha chain	P01922	55.32	5	7.09E+04 15126/9
88	Hemoglobin beta chain	P02023	62.33	8	2.76E+07 15867/7.3
89	Hemoglobin alpha chain Mammalian inositol	P01922	48.94	4	1.81E+04 15126/9
90	hexakisphosphate kinase 2	Q9UHH9	13.15	3	2.00E+02 49180/6.9
91	DJ254P11.1	Q9H575	46.96	3	4.72E+03 12676/4.8
92	Serum albumin	P02768	11.99	7	2.63E+04 69367/6.2
93					
94	Serum albumin	P02768	18.39	10	4.04E+05 69367/6.2
95	Protein-tyrosine-phosphatase	Q99952	8.08	4	2.24E+02 50384/8.4
96	Serine/threonine protein phosphatase 2A	Q15172	16.05	5	2.10E+04 56194/6.6
97	Serum albumin	P02768	11.99	7	2.63E+04 69367/6.2
98	Serum albumin	P02768	21.18	12	1.66E+08 69367/6.2
99	Alpha-1-antitrypsin	P04217	33.49	14	1.01E+11 46737/5.5
100	Alpha-1-antitrypsin	P04217	35.89	14	2.93E+10 46737/5.5
101	Keratin, type II cytoskeletal 1		25.66	12	2.21E+08 65887/8.4
102	Alpha-1-antitrypsin	P04217	33.49	13	8.16E+09 46737/5.5
103	Alpha-1-antitrypsin	P04217	28.23	11	2.31E+08 46737/5.5

---

104	Serum albumin	P02768	21.84	12	4.35E+0669367/6.2
105	Serum albumin	P02768	18.06	10	2.92E+0669367/6.2
106	Keratin, type II cytoskeletal 1		17.57	6	8.85E+0465887/8.4
107	Ig gamma-1 chain C region	P01857	27.88	7	3.22E+0536106/8.6
108	DJ393D12.1		14.78	4	1.85E+0354781/6.5
109	Transthyretin	P02766			
110					

---

<sup>1</sup> Spot number refers to the numbers assigned in Figure 4

<sup>2</sup> Accession number in SWISS-PROT and TrEMBL database

<sup>3</sup> Sequence coverage

<sup>4</sup> Theoretical  $pI$  and  $M_r$

**Table 4.** Identified 36 proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. Isoproteins from Table 3 were considered as same protein.

No.	Identified proteins <sup>1</sup>
1	Actin, gamma-enteric smooth muscle
2	Alpha-1-antitrypsin
3	Alpha-1B-glycoprotein
4	Antithrombin III
5	Apolipoprotein A-I
6	Apolipoprotein A-IV
7	Carbonic anhydrase I
8	Celldivision protein kinase 3
9	Complement C3
10	Complement C4
11	Epherin B-2
12	DJ254P11.1
13	DJ393DI2.1
14	Fibrillin 1
15	Fibrinogen gamma chain
16	Guanylyl cyclase activating protein 2
17	Hemoglobin alpha chain
18	Hemoglobin beta chain
19	Hemopexin

---

20	Hypothetical 80.6kDa protein
21	Hypothetical 82.6kDa protein
22	Ig gamma-1 chain C region
23	Keratin, type I cytoskeletal 10
24	Keratin, type II cytoskeletal 1
25	KIAA 1642 protein
26	LOMO protein
27	Mammalian inositol hexakisphosphate kinase 2
28	Pigment epithelium-derived factor
29	Plasma glutathione peroxidase
30	Prostaglandin-H2 D-isomerase
31	Protein-tyrosine phosphatase
32	Serine/threonin protein phosphatase 2A
33	Serotransferrin
34	Serum albumin
35	Transthyretin
36	Zinc-alpha-2-glycoprotein

---

<sup>1</sup> alphabet order

**Table 5.** Up-regulated proteins and their expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.

Identified protein	Molecular		Maches	Expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy
	mass (DA)	pI		
$\alpha$ -1-antitrypsin	46737	5.5	15	anti-angiogenesis, vitreous hemorrhage, vitreous traction
Fibrinogen gamma chain	49482	5.8	9	vitreous membrane
LOMP protein	89665	5.8	6	
$\alpha$ -18-glycoprotein	51941	5.9	9	
Complement C4	192336	7.2	11	immune related inflammation
Complement C3	187165	6.3	23	immune related inflammation
Ig Gamma-1 chain C region	36106	8.6	6	immune related inflammation
Zinc $\alpha$ -2-glycoprotein	33872	5.8	10	antiproliferation
Carbonic anhydrase I	28739	7.0	9	protection of retinal edema
Guanylyl cyclase actining protein 2	23347	4.7	4	

---

Hemopexin	51677	7.0	9	neuroprotection, antiinflammation
Keratin, type II cytoskeletal 1	65887	8.4	6	
Antithrombin III	52603	6.7	11	hypercoagulation, antiinflammation
Serine, threonine protein	56194	6.6	5	antiapoptosis, cell survival in hypoxia
phosphatase 2A Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89322	5.2	6	increased metabolic activity
Ig Alpha-2 chain C region	50581	9.34	5	immune related inflammation
Apolipoprotein A-IV	45371	5.4	18	retinal exudate, retinal edema
Apolipoprotein A-I	30778	5.7	15	retinal exudate, retinal edema
Dual specificity mitogen-activated protein kinase 7	47485	9.5	5	retinal cell damage, antiapoptosis of vascular endothelium

---



**Table 6.** Down-regulated proteins and their expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.

Identified protein	Molecular		Maches	Expected functions in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy
	mass (DA)	pI		
Transthyretin	15887	5.7	10	decreased retinol cycling
PEDF (pigment epithelium derived factor)	46329	6.1	13	angiogenesis
Ig kappa chain VII region	25506	8.4	10	immune related inflammation
Ig kappa light chain	82643	8.9	10	immune related inflammation

#### IV. 고찰

유리체 검체를 얻을 때와 유리체의 2차원 전기영동을 시행할 때의 문제점들은 You's bottle과 미세필터 막을 이용하여 해결할 수 있었다. You's bottle은 기존의 자동 유리체절제기에 있는 능동적인 흡입력을 그대로 이용하므로 망막의 손상없이 안구의 용적을 자동적으로 유지하면서 유리체 검체를 얻을 수 있게 하였다. 미세필터 막을 이용한 유리체의 원심분리는 유리체의 고분자당을 제거하여 2차원 전기영동을 시행할 때 단백질의 분리가 용이하도록 해 주었다. 향후 이러한 방법을 사용하는 것은 프로테오믹스를 이용한 유리체의 단백질 분석을 조금 더 쉽게 해 줄 것이다.

눈 속에 채워져 있는 투명한 결합조직인 유리체는 눈의 움직임에 따른 완충작용과 광학적 매질의 역할을 하고 있는 것 이외에 눈 속에서 망막과 수정체의 생리적 또는 병리적 기전을 담당하고 있다. 안구의 4/5를 차지하는 유리체의 용적은 약 4ml, 무게는 4g 인데 99%가 물로 구성되었고, 0.9%가 무기염과 저분자량의 유기질로 구성되었으며, 약 0.1%가 단백질과 히알루론산(hyaluronic acid)이다. 이처럼 유리체내의 단백질은 매우 소량이지만 이 단백질의 변화가 눈 속의 당뇨망막병증과 같은 병적인 상태에서 많은 역할을 할 것으로 생각된다. 유리체의 함수용적은 히알루론산의 중합체에 따라 결정된다.<sup>12,13</sup> 히알루론산은 높은 음성 정전기전류를 띄고 있다. 히알루론산 중합체는 양극의 물분자와 공간관계를 유지하게 되어 딱딱한 스펀지와 같이 물을 함유할 수 있게 된다. 물은 화학적으로 히알루론산과 결합하지는 않으며 그물창 속의 물처럼 중합체 코일에 붙어있게 된다. 양극을 띤 철이나 단백질을 넣으면 중합체의 구조가 변하여 유리체의 함수 용적이 감소하게 된다. 또한 빛이나 대사에서 생긴 자유기도 히알루론산의 구조를 바꿀 수 있고 proteoglycan과 아교질(collagen)과의 연결에

영향을 주어 젤 형태가 무너진다.<sup>14</sup> 아교질 분자는 교차연결되고 응집하여 평행한 교원질 섬유(collagen fibril) 다발을 형성하게 되는데, 물이 친수성인 히알루론산 분자를 끌어당기면서 액화된 유리체에 용해된 히알루론산 분자가 공간을 만들게 된다.<sup>15</sup> 연령이 증가하면 이와 같이 유리체의 공간구조가 파괴되고 아교질들은 뭉치게 되는 변성이 일어나게 되는 것이다.

유리체에 있는 주된 단백질은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent analysis)로 측정했을 때 albumin (293+/-18mg/l), transferrin (73.7+/-6.6mg/l), immunoglobulin G (33.5+/-3mg/l), alpha 1-antitrypsin (14.1+/- 2.9mg/l), alpha 1-acid glycoprotein (4+/-0.7 mg/l) 및 lactoferrin (<50ug/l)이다.<sup>16</sup> 본 연구에서는 유리체를 구성하고 있는 단백질 중 36가지를 구별하였는데 이들 중에서 정상 유리체와 비교했을 때 당뇨병망막병증 유리체에서 증가한 단백질은 19종류이며, 감소한 단백질은 4종류이었다.

먼저 증가한 단백질의 종류와 특징들을 알아볼 필요가 있을 것이다. Antitrypsin은 간에서 만들어지는 glycoprotein으로 394개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자량은 51,000이다. 이것은 혈액에서 주된 단백질분해효소억제제(antiprotease)로 작용하는데 주로 leukocyte elastase를 억제한다. Alpha-1-antitrypsin 결핍이 있으면 leukocyte elastase가 쌓이게 되고 폐의 표면을 파괴시켜 폐기종을 일으키기도 한다. 폐에서는 neutrophil chemoattractant로 작용하기도 한다.<sup>17</sup> 담배의 oxidizing agent들이 antitrypsin을 불활성화시켜 폐기종의 원인이 될 수 있다.<sup>18</sup> 암과 관련된 한 연구에 의하면 혈관생성을 억제하는 효과가 있다고 하였다.<sup>19</sup>

Antitrypsin이 유리체에서도 이와 같은 기능을 보인다면 당뇨병망막병증에서 신생혈관억제와 같은 보호효과를 예상할 수 있겠지만 유리체에서 antitrypsin의 신생혈관억제 역할에 대해서는 연구된 바가 없다. 그러나 망막박리 환자의 망막하액에서 trypsin과 유사한 단백질분해효소와 그 억제

체가 발견되었으며 이들의 불균형이 증식유리체망막병증(proliferative vitreoretinopathy)을 일으킬지 모른다는 보고가 있다.<sup>20</sup> 증식당뇨망막병증 환자의 혈액에서 alpha-1-antitrypsin은 정상임에도 불구하고 trypsin과 유사한 효소의 활성이 현저히 증가되었으며 이것이 유리체출혈과 관련이 있을 것이라는 견해도 있다.<sup>21</sup> 당뇨망막병증 환자의 혈액에서는 antitrypsin이 정상인데 유리체에서는 왜 증가되어 있는 이유는 잘 모르지만 이들의 균형이 깨지는 것은 유리체의 견인을 유발할 수 있는 있음을 의미할 수 있을 것이며 향후 혈액과 유리체에서의 비교가 필요하리라 생각된다.

섬유소(fibrinogen)는 6개의 peptide로 구성되어있는 340kD, 46nm의 혈장단백질로 혈액에는 2-3mg/ml 정도 있다. 이것은 1번 혈액응고인자로 혈액응고 단계 최종 물질인 fibrin의 전구물질이다. 혈액에 섬유소가 부족한 소아에서 양안에 유리체 출혈이 발생한 경우와 같이 섬유소가 부족할 경우 혈액응고에 문제가 발생하여 눈 속 출혈에도 직접 영향을 줄 수 있는 것 같다.<sup>22</sup> 섬유소는 또한 염증이 있으면 증가하는 염증관련 물질이다. 한 연구에서 눈 속에 섬유소원을 토끼 눈에 주사했더니 유리체가 액화되면서 유리체막이 생기는 것을 발견하였는데 이때 섬유소원은 긴 fibrin polymer를 형성하여 유리체 내의 세포가 증식하는 기질(matrix) 역할을 하였다. 그러나 정상 유리체에서는 이 막이 오래 지속되지는 않은 것으로 보아 섬유소 용해계(fibrinolytic system)가 작용하고 있는 것으로 보인다.<sup>23</sup> 그러나 당뇨망막병증과 같은 병적인 상황에서는 유리체 증식 및 막 형성에 관여할 수 있을 것이다.

보체(complement, 이하 C)는 면역반응이 관련된 세포분해에 관여하는 20종류 이상의 혈액 단백질을 의미한다. C<sub>1-9</sub>은 전형적 경로(classic pathway)에 의해 활성화되며, 나머지는 교대 경로(alternative pathway)로 활성화된다. 전형적 경로는 C<sub>1</sub>의 결합으로 활성화되는데 IgM, IgG1, IgG3,

C1q 등을 갖고 있는 일차 항원-항체 복합체가 하나의 IgM에 결합하거나 두개의 IgG에 결합하게 된다. 고대 경로는 IgA 면역복합체나 세균의 독, 미생물의 세포벽이나 다당류와 같은 비면역물질로 활성화되는 것이 다르다. 전형적 경로는 C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>을 단계적으로 거치며, 고대 경로는 B, D, P의 인자를 거친다. 두 가지 길 모두 결국 C<sub>5</sub>를 거쳐 막공격복합체(membrane attack complex)를 형성하게 된다. 보체의 활성화로 많은 생리학 적 보체 조각들이 형성되며 이것이 anaphylatoxin, opsonin, 화학주성인자(chemotactic factor)로 작용하게 된다.<sup>24</sup>

Sohn 등은 정상적인 유리체에 이 보체가 활성화되는 것을 막는 요소들이 있음이 밝혀졌는데 이것은 MCP, DAF, CD59가 관여한다고 하였다.<sup>25</sup> Grisanti 등은 증식유리체망막병증에서 유리체 내에 C<sub>3</sub>가 증가했으며 C1q-fixed IgG가 있는 것으로 보아 체액항체의존성 면역반응(humoral antibody-dependent immune reaction)이 관여한다고 보았다.<sup>26</sup> 유리체의 주 단백질들은 albumin, transferrin, alpha 1-antitrypsin, IgG, prealbumin인데 정상과 비교할 때 당뇨병망막병증 유리체에서 IgG가 높게 나왔다는 보고가 있다. 이것은 혈청과 유사한 단백질 이동(shift)을 보여 주는 예로 혈액망막장벽(blood-retinal barrier)이 깨졌음을 의미한다고 하였다. 그러나 그들은 신생혈관 생성과 관련된 단백질의 변화를 찾아내지는 못하였다.<sup>26</sup> 본 연구에서 당뇨병망막병증 유리체에 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>와 함께 IgG가 증가되어 있다는 것은 항원항체복합체에 의한 전형적 경로로 보체가 활성화되었음을 의미한다. 즉 당뇨병망막병증도 증식유리체망막병증에서 볼 수 있는 면역반응 관련 염증반응이 관여한다고 볼 수 있을 것이다.

Zinc alpha-2-glycoprotein(이하 ZAG)은 눈물을 포함하여 상피와 체액에 널리 퍼져 있는 43kDa 크기의 단백질이며 지방세포에서 지방분해를 돕는 기능이 있다.<sup>27,28</sup> ZAG는 암의 말기에 매우 증가하는 물질이기도 한데,

ZAG가 증가하는 것은 암의 증식(proliferation)과 관련이 있으며, 분화(differentiation)는 억제되고 있음을 반영한다고 하였다.<sup>27,29</sup> 구강세포의 한 연구에서 ZAG는 세포부착물질(cell adhesion molecule)로 작용하여 암세포를 억제한다고 하였다.<sup>30</sup> 유리체에서의 기능은 알려져 있지 않지만, 암과 같이 증식하는 세포에 직접 작용하여 증식을 억제하는 방어기전이 있을 것으로 보인다.

탄산탈수효소(carbonic anhydrase)는 중탄산이온( $\text{HCO}_3^-$ ) 재흡수에서 중요한 단계인 탄산염의 탈수를 촉매한다. 탄산탈수효소를 억제하는 것은  $\text{NaHCO}_3$ 의 재흡수를 차단하여 수분을 배출시키는 효과가 있으므로 망막의 부종을 치료하는데 이용되고 있으며<sup>31</sup> 또한 실제로 Takahashi 등은 혈액망막장벽을 통한 눈의 바깥쪽 투과성을 증가시키는 기능이 있음을 확인하였다.<sup>31,32</sup> 그러므로 유리체 내 탄산탈수효소의 증가는 당뇨병망막병증에서 흔히 볼 수 있는 망막 혈관의 투과성 증가로 발생하는 망막 부종에 대한 병리기전에 관여하는 것으로 볼 수 있을 것이다.

응혈효소(hemopexin)는 57kD의 single chain heme binding plasma glycoprotein으로 haptoglobin과는 다르게 hemoglobin에 결합하지는 않는다. 혈장에는 1mg/ml 정도 존재하며 heme을 파괴하기 위해 간으로 운반하는 역할을 한다. 그러나 혈액의 존재와는 무관하게 독립적으로 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte)의 유착을 억제하여 염증을 억제하는 기능이 있음이 보고되었다.<sup>33</sup> 최근 면역질환의 연구에서 보면 응혈효소는 손상된 말초신경에서도 합성되는 것이 알려졌는데, 포식세포(phagocyte)의 축적과 포식기능을 억제함으로써 염증을 억제하여 신경을 회복시키는 데 기여하는 것으로 알려졌다.<sup>34</sup> 손상된 시신경에서 응혈효소가 합성된다는 증거는 없으나, 당뇨병망막병증의 유리체에서 응혈효소의 항염증 작용이 있을 가능성을 배제할 수는 없을 것이다.

항트롬빈(antithrombin)은 트롬빈의 효과를 억제하여 혈액이 응고되지 않게 하는 효과를 가지고 있다. 항트롬빈이 부족하면 혈장 내 혈액응고인자 II, IX, X의 억제가 이루어지지 않아서 과응고 상태를 유발시켜 혈전증이 재발할 수 있다. 항트롬빈 III는 정상 혈액에서 있을 수 있는 작은 혈전을 제거하는 역할을 한다. 정상적인 농도는 0.20-0.45mg/ml이며 간질환이나 과중성혈관내응고증후군(disseminated intravascular coagulation syndrome, DIC)이 있으면 양이 저하된다.<sup>35</sup>

당뇨망막병증 유리체에서 혈장 단백질인 항트롬빈 III가 증가한 것은 망막혈관장벽이 깨지면서 항트롬빈 III 성분이 많은 혈액이 눈 속으로 누출되었기 때문으로 생각된다. 실제로 당뇨병은 혈액의 과응고 상태를 일으켜서 당뇨망막병증에서 보이는 미세혈관의 합병증을 가속화 하고 있기 때문이다.<sup>36</sup> 항트롬빈 III는 당뇨망막병증이 없는 군보다 당뇨망막병증이 있는 군의 혈액에서 더 많았다는 보고도 있다.<sup>37</sup> 만약 항트롬빈 III가 당뇨병에서 보이는 혈액의 과응고상태와 관련이 있으며, 이것이 당뇨망막병증의 미세혈관 합병증과 관련이 있다면 혈액에서 항트롬빈 III를 조사하는 것이 초기의 미세혈관 합병증을 예측하는 데 도움을 줄 수도 있을 것이다. 한 연구에서 포도막염이 있을 때 눈 속의 염증을 제거하는데 항트롬빈 III가 도움을 줄 수 있을 것이라고 하였다. Yamashiro 등은 endotoxin으로 유발된 쥐의 포도막염에서 항트롬빈 III는 백혈구의 rolling effect를 억제시켜 백혈구의 침착과 단백질의 누출을 방지하는 효과가 있음을 발견하였다.<sup>38</sup> 그러므로 당뇨망막병증 유리체에서 누출된 항트롬빈 III가 눈 속 염증반응에 대해 방어기전을 수행할 가능성도 생각해 볼 수 있을 것이다.

Serine/threonine protein phosphatase 2(이하 PP2)는 당뇨병을 포함한 여러 질환에서 세포외유출(exocytosis)를 담당하는 단백질로 인슐린 분비, 비만세포(mast cell)의 염증매개물질 분비 및 신경전달을 담당하는 것으로

알려졌다.<sup>39</sup> 또한 PP2는 염증붉은근육미세섬유(myosin)와 결합하여 혈관의 평활근 세포를 이완시키는 작용을 하는데 당뇨병 환자의 경우 인슐린이 PP2를 자극하여 평활근 세포의 이완을 더욱 증가시키는 것으로 알려졌다.<sup>40</sup> Garcia 등은 PP1과 PP2가 신경세포에서 세포사멸과 관련이 있을 것을 언급하였는데<sup>41</sup> 최근 연구에서 PP2와 이것의 이중 단백질인 PP5가 뇌에서 저산소증으로 유발된 세포자멸사(apoptosis) 관련 연속단계(cascade)를 억제하여 저산소증에서도 세포가 생존할 수 있도록 하는 역할을 담당한다고 하였다.<sup>42,43</sup> 당뇨병이 있는 환자의 혈액에서 PP2가 증가한다면 유리체 출혈을 동반한 당뇨망막병증 유리체에서도 PP2가 증가할 것이다. 유리체 내에 증가한 PP2의 눈 속 기능은 알려져 있지 않지만 망막세포가 저산소증에서 세포자멸사의 연속단계를 밟지 않고 생존할 수 있도록 도와주는 역할을 하고 있을 지도 모르겠다.

이행세포질그물 아테노신삼인산효소(transitional endoplasmic reticulum ATPase, 이하 TERA)는 세포질그물에서 골지복합체(Golgi complex)로 세포막을 이동시키는데 필요한 효소이다. 세포질그물은 과립(rough)과 무과립(smooth)로 나눌 수 있는데 표면에 리보솜(ribosome)이 많은 과립세포질그물은 단백질을 합성하는 세포에 많으며, 세포내에서 사용되거나 외부로 유출되는 단백질을 격리하고 보관하는 기능이 있다. 표면에 리보솜이 없는 무과립세포질그물은 스테로이드 합성에 필요한 효소를 제공하고, 제독하며, 당원(glycogen)을 파괴하는 등 여러 가지 기능들이 있다. 신장병 환자의 연구에서 TERA는 aldosterone을 만성적으로 증가시키는 기능이 있음을 밝혔는데 이것이 신장의 손상을 유발하는 한 요인이 될 수 있다고 하였다.<sup>44</sup> 그러므로 TERA가 증가했다는 것은 세포질그물에서 골지복합체로의 활발한 막의 이동을 돕는다는 뜻이며 다른 의미로 활발한 대사를 지원하고 있는 상태라는 의미이다.<sup>45</sup> 당뇨망막병증의 유리체에 TERA가 증가한 것은



병적인 기전이나 방어적인 기전에 대해 활발한 대사가 이루어짐을 의미하는 것으로 볼 수 있을 것이다.

아포지방단백(apolipoprotein)은 혈청지방단백의 성분으로 kringle domain들을 가지고 있다. 아포지방단백 A-I은 고비중리포단백질(high density lipoprotein)의 주성분으로 간 이외의 조직에서 간으로 콜레스테롤을 저장하는데 도움을 준다. 11번 염색체의 긴 팔(long arm)에 관련 유전자가 있다. 아포지방단백 A-IV는 암죽미립(chylomicron)에서 분비된다. Kawai 등은 당뇨병망막병증이 심한 환자의 눈물에서 아포지방단백 A-I이 발견된다고 하여 눈물로 당뇨병망막병증을 진단할 수 있다고 하였다.<sup>46</sup> 지방단백 A는 1형 당뇨병 환자 중 당뇨병망막병증의 상태와 관련이 있으며 30mg/dl가 넘게되면 증식성 당뇨병망막병증을 의심할 수 있다는 연구도 있다.<sup>47</sup> Lyons 등에 의하면 당뇨병망막병증은 남자에게서만 small LDL, apoB, small HDL, LDL 입자 농도(particle concentration)에 비례하며, large LDL, large HDL, LDL size, HDL size에 반비례한다고 하였다. 또한 아포지방단백 A-I, lipoprotein은 당뇨병망막병증과 무관하다고 하였다.<sup>48</sup> Cusick 등은 고지혈증이 당뇨병망막병증에서 볼 수 있는 경성 삼출물과 관련이 있는데 그 중에서 LDL의 주 구성성분인 아포지방단백 B와 cholesteryl ester와 관련이 있다고 보고 있다. 그 두 가지 혈중 농도를 낮추었을 때 경성삼출물이 좋아질 수 있음을 보고하였다.<sup>49,50</sup> 이와 같이 아포지방단백은 당뇨병망막병증을 반영하는 것으로 보이는데 특히 혈관에서 누출된 혈액으로부터 아포지방단백 관련 삼출물이 남으면 망막의 부종이 올 수 있고 이것은 시력소실의 또 다른 직접적인 원인도 될 수 있다.

Mitogen-activated protein kinase(분열제활성단백키나아제, 이하 MK)는 여러 가지 세포외 자극으로 활성화되는 multigene family이며, 세포의 생존을 조절하는 기능이 있다. 이것은 세포표면의 수용체와 세포내 조절의 대

상이 되는 표적(target)을 연결시켜주는 작용을 통해서 이루어진다. MK는 이중 인산화(dual phosphorylation)의 특성에 따라 extracellular signal-regulated protein kinase(ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase 및 p38 등 세 종류로 나누어진다.<sup>51</sup> 이 중에서 p38은 당뇨병이 있을 때 감각신경에서 산화자극(oxidative stress)과 당에 의해 활성이 증가하며 이것이 세포의 손상을 일으켜 신경병증을 일으킬 수 있음이 알려졌다.<sup>52,53</sup> 다른 MK도 당뇨병 환자에서 여러 자극에 의해 protein kinase C가 활성화되고 그로 인해 MK가 자극을 받아서 당뇨병성 신증, 신경병증, 망막병증의 전반적인 병리기전에 관여하고 있는 것으로 보고 있다.<sup>54</sup> 그러나 MK1은 혈관 속을 흐르는 혈액이 항정 결흐름(steady laminar flow)을 보이는 경우 활성화되어 혈관 내피세포를 세포자멸사로부터 보호하는 기능이 있음을 알려졌다.<sup>55,56</sup> 당뇨망막병증 유리체 내에서 증가한 MK는 망막세포손상과 관련된 작용을 할 것으로 생각되나 일부는 혈관 내피세포의 세포자멸사를 막는 역할을 하고 있을 가능성도 있다.

정상 유리체와 비교하여 당뇨망막병증 유리체에서 줄어든 단백질들도 있다. Transthyretin(이하 TTR)은 thyroxine과 retinol-binding protein을 운반하는 혈청단백질이다. 이것은 127 아미노산으로 구성된 4개의 유닛이 tetramer를 형성하고 있다. 간과 맥락막총(choroidal plexus)에서 합성된다.<sup>57</sup> TTR은 혈액망막장벽을 넘지 못하는 것으로 되어 있지만 쥐와 소의 눈 속 여러 곳에서 TTR이 있다는 것이 증명되었다. 특히 망막색소상피에 한정되어 TTR mRNA가 존재하는 것으로 보아 망막색소상피에서 눈에 특이적인 TTR을 자체 합성할 것으로 보고 있으며, 기능은 retinol cycling에 관여할 것으로 생각된다.<sup>58</sup> 혈액망막장벽이 파괴된 당뇨망막병증에서 오히려 TTR이 감소하였다는 것은 특이한 일이다. 만약 TTR이 혈액망막장벽과 무관하다면 눈에 특이적인 TTR 합성이 망막색소상피에서 감소한 것으

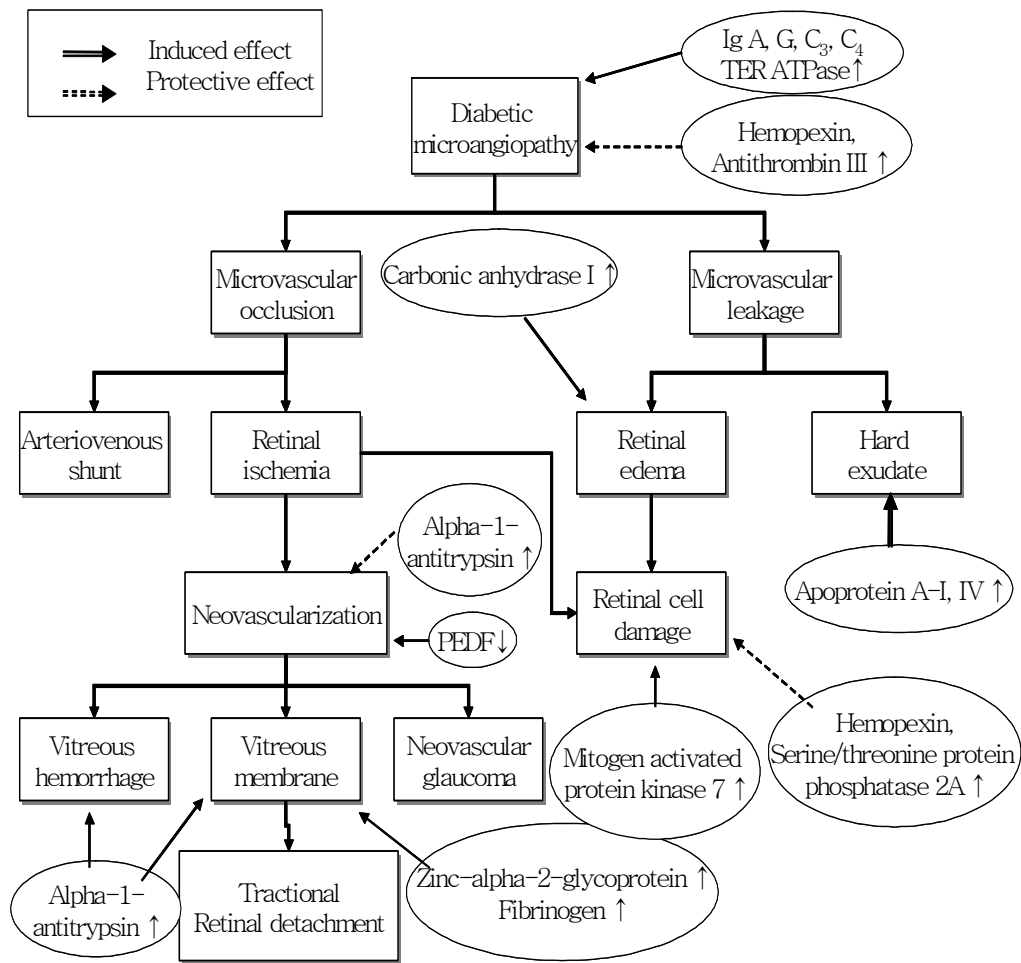
로 해석할 수 있을 것이다. 그렇다면 이것은 당뇨망막병증에서 망막색소상피의 기능이 감소되어 TTR의 합성이 감소하고 이로 인해 retinol cycling에 문제를 일으켜서 시세포(photoreceptor cell)의 기능 장애를 가져올 수도 있다. Cellular retinaldehyde binding protein(CRALBP)를 제거한 쥐에서 visual cycle의 문제가 생긴 경우 암순응의 장애를 유발한다는 결과를 예들 든다면 당뇨망막병증 환자의 유리체에서 감소한 TTR이 환자의 시기능 저하와 관련성을 유추해 볼 수 있을 것이다.<sup>59</sup>

Pigment epithelium derived factor(이하 PEDF)는 vascular endothelial growth factor(VEGF)와 함께 저산소증으로 유발되어 뮐러세포(Muller cell)에서 분비되는 angiogenic cytokine이다.<sup>60</sup> PEDF는 serine protease inhibitor라는 큰 범주에 속하는 glycoprotein으로 망막모세포종의 망막색소상피 배양에서 처음 분리되었는데 강력한 신경분화기능을 가진 인자로 소개되었다.<sup>61</sup> 최근 세포배양과 동물모델을 통해 PEDF가 망막내피세포(retinal endothelial cell)의 성장과 이동을 막고, 허혈로 유도된 망막의 신생혈관을 억제하는 것으로 알려졌다.<sup>62,63</sup> Duh 등은 동물 실험에서 PEDF가 당뇨망막병증 유리체에서 증가되어 있으므로 PEDF가 눈 속의 신생혈관 형성을 조절하는데 도움을 줄 것이라고 하였다.<sup>64</sup> 그러나 Ogata 등은 망막 박리와 같은 질환에서는 유리체에 PEDF가 증가되어 있지만 당뇨망막병증에서는 감소되어 있는데 그 결과로 신생혈관이 유발되는 것이라고 하였다.<sup>65</sup> Spranger 등은 신생혈관과 관련된 질환의 유리체에서 PEDF가 저하되어 있는 것을 발견했으며, 증식당뇨망막병증의 병리에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각하였다.<sup>66</sup> 또한 Nakanish 등은 당뇨망막병증 유리체의 단백질과 황반원공 환자의 단백질을 비교한 결과 당뇨망막병증 유리체에서 신생혈관 생성을 억제하는 PEDF가 증가되었다고 하였다.<sup>67</sup> Boehm 등은 증식당뇨망막병증 방수에서도 PEDF가 매우 저하된 것을 발견하였는데 그

는 PEDF가 방수의 혈관생성 활동을 역조절하고 있는 것으로 설명하였다.<sup>68</sup> Stellmach 등은 PEDF가 활성화된 혈관내피세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하여 당뇨망막병증이나 미숙아망막병증에서 보이는 허혈로 유도된 신생혈관형성을 억제한다고 하였다.<sup>69</sup> 본 연구에서도 당뇨망막병증 유리체 내 PEDF가 감소되었음이 확인되었으며 이것은 신생혈관 생성이 PEDF의 저하로 인한 것임을 의미하는 것이다. 여러 연구에서 당뇨망막병증의 신생혈관 생성과 관련된 여러 인자들을 증명하였지만, 본 연구의 결과에 의하면 신생혈관 생성과 관련된 단백질은 PEDF가 유일하였다. 당뇨망막병증에서 보이는 신생혈관의 생성과 관련된 대표적인 인자로 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, 이하 VEGF)를 들 수 있다. 그러나 본 연구에서는 발견되지 않았다. 저자가 생각하는 그 이유 중의 하나는 당뇨망막병증 유리체에서 PEDF의 양은 프로테오믹스 기법으로 검출되기에 충분한 1 $\mu$ g/ml 정도가 있는 반면 VEGF는 그것의 1/1,000에 해당하는 1,000pg/ml 정도 있기 때문이라고 생각된다.<sup>71,71</sup> 또한 극소량의 변화를 보인 물질을 영상분석에서 잡아내지 못하여 발현변화가 없는 것으로 인식했을 가능성도 배제할 수 없으며, 발현변화가 없는 단백질들 중 단백질을 정확히 알아내지 못한 16개의 미세한 점에 포함되어 있을 가능성 또한 배제할 수 없다. 그럼에도 불구하고 이런 결과는 다른 신생혈관 관련 인자들의 기능을 부인하는 것이 아니며, 프로테오믹스 기법으로 정상 유리체와 비교하였을 때 가장 두드러진 발현 변화를 보인 것 정도로 해석할 수 있을 것이다. 극소량으로 존재하면서 당뇨망막병증에 영향을 줄 수 있는 VEGF를 비롯한 알려진 여러 신생혈관 유발인자들에 대해 프로테오믹스 기법으로 찾아내는 연구를 계속할 필요가 있을 것이다.

정상 유리체와 비교하여 당뇨망막병증 유리체에서 발현 변화를 보인 단백질들의 작용이나 기전에 대해 문헌고찰을 통해 알아본 바와 같이 이 단

백질들의 작용을 크게 당뇨망막병증으로 인해 발생한 병리기전과 이것에 대응하는 방어기전으로 분류할 수 있을 것이다. 그림 8은 당뇨망막병증의 병리기전 각 단계에서 변화를 보인 유리체의 단백질들이 어떠한 기능을 할 수 있을 지에 대하여 표시하였다. 각각의 단계에는 병리기전을 유발할 것으로 생각되는 단백질들과 방어작용을 할 것으로 기대되는 단백질들이 있다. 병리기전을 유발할 것으로 생각되는 단백질들과 그 상태에는 초기 당뇨망막병증의 혈관병증을 유발하는 Ig A, G, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, TER ATPase의 증가, 신생혈관 생성을 유발하는 PEDF의 감소, 유리체 출혈을 유발하는 alpha-1-antitrypsin의 증가, 유리체 막을 형성하는 alpha-1-antitrypsin, zinc-alpha-2-glycoprotein, fibrinogen의 증가, 망막허혈이 있을 때 망막세포의 손상을 유발하는 mitogen activated protein kinase 7의 증가 및 경성 삼출물을 증가시키는 apoprotein A-I, IV의 증가 등을 들 수 있다. 또한 방어작용을 할 것으로 기대되는 단백질들과 그 상태에는 초기 당뇨망막병증의 혈관병증 유발을 억제하는 hemopexin, antithrombin III의 증가를 들 수 있으며, 신생혈관 생성을 억제하는 alpha-1-antitrypsin의 증가를 들 수 있고, 망막허혈로부터 망막세포의 손상을 보호하는 hemopexin, serine/threonin protein phosphatase 2A의 증가 등을 들 수 있을 것이다 (그림 8). 그러나 유리체에서 각 단백질들이 직접적으로 어떤 기능을 보이고 있는지에 대해서는 향후 연구과제로 삼아야 할 것이다. 이와 같이 당뇨망막병증의 병리기전에 관여하고 있는 단백질들을 연구하는 것은 당뇨망막병증이 생기기 이전부터의 변화를 진단하고 적극적인 예방에 임할 근거를 마련하는 것 뿐 아니라 이후 각 단계의 병리기전을 차단하기 위한 치료법을 발견하는 데에 도움을 줄 것으로 기대하는 바이다.



**Figure 8.** Cascade of diabetic retinopathy pathology & expected functions of the proteins in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy.

## V. 결론

프로테오믹스를 이용하여 정상인의 유리체와 증식당뇨망막병증 환자의 유리체를 비교분석하고 당뇨망막병증에서 유리체내 단백질의 발현 변화를 알아보아 이를 통해 당뇨망막증에 관여할 것으로 보이는 단백질을 알아보았다. 이를 위해 증식당뇨망막병증 환자의 유리체와 정상 유리체를 대상으로 2차원 전기영동을 시행한 후 젤에 있는 단백질 점들의 변화를 이미지 분석으로 비교하였고, 변화된 것들이 무슨 단백질인지 알아내기 위해 MALDI-TOF/ESI-TOF 질량분석을 시행하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 젤에 있는 총 110개의 단백질 점들을 분석한 결과 정상 유리체와 비교하여 당뇨망막병증 유리체에서 23개의 단백질들이 발현 변화를 보였다.
2. 정상 유리체와 비교하였을 때 Alpha-1-antitrypsin, 면역글로불린 A와 G, 보체 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>를 포함하여 19개의 단백질들이 당뇨망막병증 유리체에서 증가하였고, pigment epithelium derived protein(PEDF)을 포함하여 4개의 단백질들이 감소하였다.
3. Albumin, α-1 antitrypsin, transferrin, complement C<sub>4</sub>, apolipoprotein A-I, Ig G, transthyretin은 혈장 단백질에서 볼 수 있는 것으로 당뇨망막병증에서 볼 수 있는 유리체 출혈과 관련이 있을 것이다.
4. 당뇨망막병증의 병리기전 중 신생혈관 형성에 주된 역할을 담당하는 단백질은 PEDF로 생각된다.
5. 면역글로불린A와 G, 보체 C<sub>3</sub>와 C<sub>4</sub>의 증가는 당뇨망막병증의 병리 기전으로 면역관련 염증이 관여함을 시사하고 있다.
6. Zinc-α-2-glycoprotein, fibrinogen 등은 유리체 견인막 형성과 관련된 것으로 보이며 견인망막박리 형성에 관여할 것으로 생각된다.

7. Alpha-1-antitrypsin, hemopexin, antithrombin III, serine/threonine protein phosphatase 등의 단백질들은 당뇨망막병증의 기전에서 방어작용을 하고 있는 것으로 보인다.

이와 같이 당뇨망막병증의 병리기전에 관여하고 있는 단백질들을 연구하는 것은 당뇨망막병증이 생기기 이전부터의 변화를 진단하고 적극적인 예방에 임할 근거를 마련하는 것 뿐 아니라 이후 각 단계의 병리기전을 차단하기 위한 치료법을 발견하는 데에 도움을 줄 것으로 기대하는 바이다. 그러나 작용기전이 잘 알려지지 않은 단백질에 대해서는 다른 조직에서의 기능을 참고한 것이므로 유리체에서 이러한 단백질들이 당뇨망막병증에서 직접적으로 어떤 기능을 보이고 있는지에 대해서는 향후 연구과제로 삼아야 할 것이다.



## 참고문헌

1. 의료보험관리공단. 1995 의료보험통계연보(제17호), 의료보험관리공단, 1996.
2. 통계청. 1995년 사망원인통계연보(제16권), 통계청, 1997.
3. 이홍규. 당뇨병의 역학; 예방을 위한 기본. 당뇨병. 1995;19(부록3):5-14.
4. 신찬수, 김현규, 김원배, 박경수, 김성연, 조보연, 이홍규, 고창순, 김용익, 신영수, 백희영, 오태근, 박용수, 양병균. 경기도 연천 지역에서 당뇨병의 발생률, 당뇨병 1996;20:264-272.
5. Kahn HA, Hiller R. Blindness caused by diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1974;78:58-67.
6. 정흠. 당뇨병과 눈, 제1판, 서울대학교 출판부, 1998.
7. Rollin R, Mediero A, Martinez-Montero JC, Roldan-Pallares M, Suarez-Leoz M, Vidal-Fernandez P, Cortes-Valdes C, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango R. Atrial natriuretic peptide in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2004;10:450-457.
8. Duh EJ, Yang HS, Haller JA, De Juan E, Humayun MS, Gehlbach P, Melia M, Pieramici D, Harlan JB, Campochiaro PA, Zack DJ. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol* 2004;137(4):668-674.
9. Xu X, Zhu Q, Xia X, Zhang S, Gu Q, Luo D. Blood-retinal barrier breakdown induced by activation of protein kinase C via vascular endothelial growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Curr*

- Eye Rex 2004;28(4):251-256.
10. Yang P, McKay BS, Allen JB, Jaffe GJ. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2438-2446.
  11. Nicoletti R, Venza I, Ceci G, Visalli M, Teti D, Reibaldi A. Vitreous polyamines spermidine, putrescine, and spermine in human proliferative disorders of the retina. *Br J Ophthalmol* 2003;87(8):1038-1042.
  12. Balazs EA. Molecular morphology of the vitreous body. In Smelser GK ed: *The structure of the eye*, New York, 1961, Academic Press.
  13. Balazs EA. Physiology of the vitreous body, In Schepens, CL, ed: *Proceedings of the Second Conference of the Retina Foundation*, St Louis, 1960, Mosby.
  14. Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, Chakrabarti B. Effects of visible light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Rex* 1987;44:863-870.
  15. Sebag J. Ageing of the vitreous. *Eye* 1987;1:254-262.
  16. Clausen R, Weller M, Wiedemann P, Heimann K, Hilgers RD, Zilles K. An immunochemical quantitative analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;229(2):186-190.
  17. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, McElvaney NG. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 2004;125(5):1952-1957.

18. Shaker SB, Dirksen A, Laursen LC, Maltbaek N, Christensen L, Sander U, Seersholm N, Skovgaard LT, Nielsen L, Kok-Jensen A. Short-term reproducibility of computed tomography-based lung density measurements in alpha-1 antitrypsin deficiency and smokers with emphysema. *Acta Radiol* 2004;45(4):424-430.
19. Huang H, Campbell SC, Nelius T, Bedford DF, Veliceasa D, Bouck NP, Volpert OV. Alpha-1-antitrypsin inhibits angiogenesis and tumor growth. *Int J Cancer* 2004; Aug 12 [Epub ahead of print].
20. Katsnelson LA, Chesnokova NB, Antelava ND. Activities of trypsin-like serine proteases and their inhibitors in blood and subretinal fluid of patients with different stages of proliferative vitreoretinopathy in rhegmatogenous retinal detachment. *Vestn Oftalmol* 2000;116(1):24-26.
21. Chesnokova NB, Kuznetsova TP, Davydova GA, Grigor'ev AV. Parameters of blood proteinase inhibitor balance and hyperlipoproteinemia in patients with proliferative diabetic retinopathy with vitreous hemorrhage. *Vestn Oftalmol* 1999;115(6):29-32.
22. Marshman WE, Adams GG, Ohri R. Bilateral vitreous hemorrhages in an infant with low fibrinogen levels. *J AAPOS* 1999;3(4):255-256.
23. Mansour AM, Chess J, Henkind P. Fibrinogen-induced vitreous membranes. *Ophthalmic Res* 1987;19(3):164-169.
24. Grisanti S, Esser P, Weller M, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy. Activation of the complement system. *Ophthalmologie* 1992;89(1):50-54.
25. Sohn JH, Kaplan HJ, Suk HJ, Bora PS, Bora NS. Complement

- regulatory activity of normal human intraocular fluid is mediated by MCP, DAF, and CD59. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(13):4195-4202.
26. Bresgen M, Baum U, Esser P, Wiedemann P, Heimann K. Protein composition of the vitreous body in proliferative diabetic retinopathy. An analysis with 2-D-electrophoresis. *Ophthalmologie* 1994;91(6):758-762.
27. Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(8):2500-2505.
28. Molloy MP, Bolis S, Herbert BR, Ou K, Tyler MI, van Dyk DD, Willcox MD, Gooley AA, Williams KL, Morris CA, Walsh BJ. Establishment of the human reflex tear two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis reference map: new proteins of potential diagnostic value. *Electrophoresis* 1997;18(15):2811-2815.
29. He N, Brysk H, Tying SK, Ohkubo I, Brysk MM. Zinc-alpha(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression. *J Cell Biochem Suppl* 2001; 36:162-169.
30. Lei G, Brysk H, Arany I, Tying SK, Srinivasan G, Brysk MM. Characterization of zinc-alpha(2)-glycoprotein as a cell adhesion molecule that inhibits the proliferation of an oral tumor cell line. *J Cell Biochem* 1999;75(1):160-169.
31. Moldow B, Sander B, Larsen M, Lund-Andersen H. Effects of acetazolamide on passive and active transport of fluorescein across

- the normal BRB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(8):1770-1775.
32. Takahashi J, Mori F, Hikichi T, Yoshida A. Effect of acetazolamide on outward permeability of blood-retina barrier using differential vitreous fluorophotometry. *Curr Eye Res* 2001;23(3):166-170.
33. Suzuki K, Kobayashi N, Doi T, Hijikata T, Machida I, Namiki H. Inhibition of Mg<sup>2+</sup>-dependent adhesion of polymorphonuclear leukocytes by serum hemopexin: differences in divalent-cation dependency of cell adhesion in the presence and absence of serum. *Cell Struct Funct* 2003;28(4):243-253.
34. Suzuki K, Namiki H. Serum hemopexin: suppressive effect on neutrophil functions and prospect of clinical application to autoimmune diseases. *Nippon Rinsho* 2004;62(3):577-586.
35. Mammen EF. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Semin Thromb Hemost* 1998;24(1):19-25.
36. Asakawa H, Tokunaga K, Kawakami F. Elevation of fibrinogen and thrombin-antithrombin III complex levels of type 2 diabetes mellitus patients with retinopathy and nephropathy. *J Diabetes Complications* 2000;14(3):121-126.
37. Borseley DQ, Prowse CV, Gray RS, Dawes J, James K, Elton RA, Clarke BF. Platelet and coagulation factors in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Pathol* 1984;37(6):659-664.
38. Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, Honjo M, Nonaka A, Miyamoto K, Honda Y, Tanihara H, Ogura Y. Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

- 2001;42(7):1553-1560.
39. Sim AT, Baldwin ML, Rostas JA, Holst J, Ludowyke RI. The role of serine/threonine protein phosphatases in exocytosis. *Biochem J* 2003;373:641-659.
  40. Sandu OA, Ragolia L, Begum N. Diabetes in the Goto-Kakizaki rat is accompanied by impaired insulin-mediated myosin-bound phosphatase activation and vascular smooth muscle cell relaxation. *Diabetes* 2000;49(12):2178-2189.
  41. Garcia A, Cayla X, Guergnon J, Dessauge F, Hospital V, Rebollo MP, Fleischer A, Rebollo A. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 2003;85(8):721-726.
  42. Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE. Ser/thr protein phosphatase 5 (PP5) inactivates hypoxia-induced activation of an ASK-1/MKK-4/JNK-signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; Aug 24 [Epub ahead of print].
  43. Truttmann AC, Ashraf Q, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of hypoxia on protein phosphatase 2A activity, subcellular distribution and expression in cerebral cortex of newborn piglets. *Neuroscience* 2004;127(2):355-363.
  44. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*

- 2004;43(4):841-848.
45. Zhang L, Ashendel CL, Becker GW, Morre DJ. Isolation and characterization of the principal ATPase associated with transitional endoplasmic reticulum of rat liver. *J Cell Biol* 1994;127:1871-1883.
  46. Kawai S, Nakajima T, Hokari S, Komoda T, Kawai K. Apolipoprotein A-I concentration in tears in diabetic retinopathy. *Ann Clin Biochem* 2002;39:56-61.
  47. Guerci B, Meyer L, Sommer S, George JL, Ziegler O, Drouin P, Angioi-Duprez K. Severity of diabetic retinopathy is linked to lipoprotein (a) in type 1 diabetic patients. *Diabetes Metab* 1999;25(5):412-418.
  48. Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng D, Lackland DT, McGee D, Garvey WT, Klein RL. Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):910-918.
  49. Cusick M, Chew EY, Chan CC, Kruth HS, Murphy RP, Ferris FL 3rd. Histopathology and regression of retinal hard exudates in diabetic retinopathy after reduction of elevated serum lipid levels. *Ophthalmology* 2003;110(11):2126-2133.
  50. Chew EY, Klein ML, Ferris FL 3rd, Remaley NA, Murphy RP, Chantry K, Hoogwerf BJ, Miller D. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol* 1996;114(9):1079-1084.
  51. Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big

- mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 1996;271(28):16586-16590.
52. Agthong S, Tomlinson DR. Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Nov;973:359-62.
53. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton AJ, Fernyhough P, Tomlinson DR. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J* 2001;15(13):2508-2514.
54. Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases have the capacity to trigger all the cellular events necessary for the development of diabetic nephropathy, retinopathy and neuropathy. *Diabetologia* 1999;42(11):1271-1281.
55. Pi X, Yan C, Berk BC. Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis. *Circ Res* 2004;94(3):362-369.
56. Yoshizumi M, Abe J, Tsuchiya K, Berk BC, Tamaki T. Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Sci* 2003;91(3):172-176.
57. Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 2004;69:271-295.
58. Dwork AJ, Cavallaro T, Martone RL, Goodman DS, Schon EA, Herbert J. Distribution of transthyretin in the rat eye. *Invest*



- Ophthalmol Vis Sci 1990;31(3):489-496.
59. Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J, Possin DE, Crabb JW. Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* 2001;29(3):739-748.
60. Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Muller) cells in hypoxia. *Neuroreport* 2004;15(10):1633-1637.
61. Tombran-Tink J, Chader CG, Johnson LV. PEDF: Pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 1991;53:411-414.
62. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu HJ, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-248.
63. Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:821-830.
64. Duh EJ, Yang HS, Haller JA, De Juan E, Humayun MS, Gehlbach P, Melia M, Pieramici D, Harlan JB, Campochiaro PA, Zack DJ. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol* 2004;137(4):668-674.
65. Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Sakamoto T, Matsumura M. Pigment epithelium-derived factor in the

- vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):378-382.
66. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M, Ristow M, Francis MK, et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 2002;50:2641-2645.
67. Nakanishi T, Koyama R, Ikeda T, Shimizu A. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;776(1):89-100.
68. Boehm BO, Lang G, Feldmann B, Kurkhaus A, Rosinger S, Volpert O, Lang GK, Bouck N. Proliferative diabetic retinopathy is associated with a low level of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor. a pilot study. *Horm Metab Res* 2003;35(6):382-386.
69. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2593-2597.
70. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Nakanish Y, Kitano S, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema and other retinal disorders. *Am J Ophthalmol* 2002;133(4):537-543.
71. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and

vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 2002;134(3):348-352.

## Abstract

### Proteomic analysis of the diabetic retinopathy vitreous

Sung Jin Lee

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Oh Woong Kwon)

This study analyzed protein alterations between the normal vitreous and the vitreous with proliferative diabetic retinopathy by proteomics to find the proteins which may elicit diabetic retinopathy.

Two-dimensional electrophoresis was used to make the protein map. Image analysis between the spots on each gels by a proteomics based approach were used to reveal vitreous protein alterations which may elicit proliferative diabetic retinopathy. MALDI-TOF/ESI-TOF mass spectrometry also was used to identify altered protein spots on the gel.

Of the 110 different spots on each gels, 36 different proteins were identified and among them 23 proteins were altered in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy compared with normal vitreous. Nineteen proteins including alpha-1-antitrypsin, Ig G and A, and complement C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> were increased in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy and 4 proteins including pigment epithelium derived factor were decreased compared to the normal vitreous.

The authors found that pigment epithelium derived factor may be the key protein that induces the neovascularization in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. Increased levels of Ig G and A and C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> is thought to be related to the autoimmune inflammation in early diabetic microangiopathy. Furthermore, proteins such as alpha-1-antitrypsin may contribute to protective functions of the ischemic retinal cells.

---

Key words : analysis, diabetic retinopathy, electrophoresis, MALDI-TOF, protein, proteomics, vitreous