

13-cis retinoic acid가
OLETF 쥐를 이용한
제2형 당뇨병성 신경병증에
미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 상 훈

13-cis retinoic acid가
OLETF 쥐를 이용한
제2형 당뇨병성 신경병증에
미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 상 훈

13-cis retinoic acid가
OLETF 쥐를 이용한
제2형 당뇨병성 신경병증에
미치는 영향

지도 안 철 우 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 훈

이상훈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

연세대학교 의학과 대학원에 입학한 것이 엇그제 같은데 벌써 졸업을 준비하게 되었습니다. 바쁘고 힘든 레지던트 생활과 학업을 병행하는 일이 결코 쉽지는 않았지만 뒤쳐지지 않고 무사히 학업에 정진할 수 있게 된 것을 생각해보면 그동안 저를 도와준 많은 고마운 분들이 계셨다는 것을 느끼게 됩니다. 먼저 이 논문이 완성되기까지 많은 관심과 격려로 늘 변함없이 따뜻하게 지도해 주신 안철우 선생님과 노태웅 선생님께서 진심으로 감사드립니다. 저의 미흡한 논문을 자상하게 심사해주시고 지적해주신 김경래 선생님, 김원주 선생님께도 머리 숙여 감사의 말씀을 드립니다. 멀리 미국에서 해외 연수중인 박형천 선생님, 많은 임상경험과 가르침을 주신 하성규 선생님, 이 외에도 좁은 지면에 저에게 도움이 되어 주었던 여러 선생님들을 일일이 열거하면서 감사의 마음을 전하지는 못하지만 이 논문이 나오기까지 저에게 힘이 되어준 모든 여러분들께 감사의 마음을 전합니다. 끝으로 아낌없는 지원과 믿음으로 저를 지켜본 저의 아내와 부모님, 장인, 장모님께도 고마움과 사랑의 마음을 전하며 오늘의 작은 열매에 자만하지 않고 계속 정진하면서 나아가도록 하겠습니다.

2006년 12월 저자 이 상 훈 씀

차 례

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
가. 13- <i>cis</i> retinoic acid	6
나. 실험동물	6
2. 방법	7
가. 13- <i>cis</i> retinoic acid의 투여방법	7
나. 혈액과 요 검사와 시행 목적	7
(1) 혈액 검사	7
(가) 혈청학적 검사	7
(나) ELISA 검사	7
IGF-1(total), IGFBP-3, insulin, C-peptide	
(2) 요 검사	7
다. 신경 모세혈관 밀도	8
3. 통계 분석	8

III. 결 과	9
1. 몸무게의 변화	9
2. 혈당의 변화	9
3. <i>c-peptide</i> , <i>insulin</i> 의 변화	12
4. 신장기능의 변화	12
5. IGF-I, IGFBP-3의 변화	14
6. IGF-I/IGFBP-3 molar ratio의 변화	16
7. 신경 모세혈관 밀도의 변화	18
8. 지방대사와 표지자들	20
9. 간효소 수치와 변화	20
IV. 고 찰	21
V. 결 론	26
참고문헌	27
영문요약	33

그림 차례

- 그림 1. OLETF와 LETO군 간의 몸무게 비교 9
- 그림 2. OLETF와 LETO군 간의 혈당비교 10
- 그림 3. 13-*cis* retinoic acid 투약 전·후 OGTT결과에
대한 AUC(area under the curve)의 비교 11
- 그림 4. OLETF, LETO군에 관계없이 13-*cis* retinoic
acid 투여군과 비투여군 간의 소변 내 albumin
농도의 비교 13
- 그림 5. OLETF, LETO군의 혈중 IGF-I 수치비교 ... 14
- 그림 6. OLETF와 LETO군 간의 혈중 IGFBP-3
수치비교 15
- 그림 7. OLETF군에서 13-*cis* retinoic acid의 투여 후
IGFBP-3 수치 15
- 그림 8. OLETF, LETO군 간의 IGF-I/IGFBP-3 molar
ratio 비교 16
- 그림 9. LETO, OLETF 각각의 군 내에서 13-*cis*
retinoic acid 투여가 IGF-I/IGFBP-3 molar
ratio에 미치는 영향 17
- 그림 10. OLETF, LETO군에서 신경 모세혈관 밀도의
비교 19
- 그림 11. LETO, OLETF 각각의 군 내에서 13-*cis*
retinoic acid 투여가 신경 모세혈관 밀도에
미치는 영향 19

표 차례

표 1. LETO, OLETF군에서 <i>insulin</i> , <i>c-peptide</i>	12
표 2. OLETF군에서 13- <i>cis retinoic acid</i> 투여에 따른 <i>insulin</i> , <i>c-peptide</i>	12
표 3. LETO, OLETF군에서 BUN, <i>creatinine</i>	13
표 4. OLETF군에서 13- <i>cis retinoic acid</i> 투여에 따른 <i>urine albumin</i> , <i>creatinine</i> , <i>albumin/creatinine</i> <i>ratio</i>	13
표 5. LETO, OLETF군에서 IGF-I, IGFBP-3, IGF-I/ IGFBP-3 molar ratio	17
표 6. LETO군에서 13- <i>cis retinoic acid</i> 투여에 따른 IGF-I, IGFBP-3, IGF-I/IGFBP-3 molar ratio 비교	18
표 7. OLETF군에서 13- <i>cis retinoic acid</i> 투여에 따른 IGF-I, IGFBP-3, IGF-I/IGFBP-3 molar ratio 비교	18
표 8. LETO, OLETF군에서 신경 모세혈관 밀도	20
표 9. LETO, OLETF군에서 13- <i>cis retinoic acid</i> 투여 전·후에 따른 신경 모세혈관 밀도	20

13-*cis* retinoic acid가 OLETF 쥐를 이용한 제2형 당뇨병성 신경병증에 미치는 영향

연구목적: 최근 당뇨병성 신경병증에 효과가 있는 여러 신약 후보 물질들이 대두되고 있으나, 그 작용 기전과 효과에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구는 제 2형 당뇨병의 동물모델인 OLETF 쥐에서 현재 당뇨병성 신경병증 치료의 후보 물질로서의 가능성이 제시되고 있는 Retinoic acid receptor(RAR) 및 retinoid X receptor(RXR) agonist(RARA)들 중에서 RAR 효현제인 13-*cis* retinoic acid 투여에 따른 당뇨병성 신경병증 발생 억제효과와 그 기전을 분석하고자 하였다.

연구방법: OLETF 쥐 20마리와 대조군 LETO 쥐 10마리를 각각 반씩 나누어 받은 13-*cis*-retinoic acid를 arachis oil에 섞어 매일 12주간 경구 투여하고, 나머지 받은 arachis oil만 같은 시간에 경구 투여하였다. 신경 모세혈관 밀도(Nerve capillary density)는 신경조직을 절제하여 morphometry 방법으로 각 군 간의 총 신경 면적을 정량화하였고, 모세혈관의 수를 총 신경면적으로 나누어 신경 모세혈관 밀도를 계산하였다.

연구결과: 당뇨병 개체인 OLETF군과 비 당뇨병 개체인 LETO군을 비교하였을 때 OLETF군에서는 혈중 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 높게 측정되었다. 13-*cis*-retinoic acid의 투여가 OLETF 군에서 IGF-I에는 영향이 없으나 혈중 IGFBP-3를 증가시켜 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio를 감소시키는 것을 확인하였다. LETO, OLETF 두 군 모두에서 13-*cis* retinoic acid 투여 후에 신경 모세혈관 밀도(nerve capillary density)의 평균값은 감소하였으나 통계학적인 의미는 없었다.

결론: 13-*cis* retinoic acid의 투여는 IGFBP-3의 수치를 상승시켜 IGF-I/IGF-BP3 molar ratio를 감소시키고, 또한 병변의 진행에 따른 hypoperfusion과 hypoxia를 개선시켜 신경 모세혈관 밀도를 증가시키는 것으로 생각된다.

Key Words: 당뇨병성 신경병증, RAR(*retinoic acid* receptor) agonist, 13-*cis*-*retinoic acid*, IGF-I/IGFBP-3 molar ratio, 신경 모세혈관 밀도

13-*cis* retinoic acid가 OLETF 쥐를 이용한 제2형 당뇨병성 신경병증에 미치는 영향

<지도교수 안 철 우>

연세대학교 대학원 의학과

이 상 훈

I. 서 론

1980년대부터 국내의 당뇨병 환자는 급격히 증가하여 유병률이 7-8%에 육박하면서 당뇨병 및 당뇨병성 만성 합병증으로 인한 노동력 상실과 이로 인한 의료비 지출이 연간 220억원에 이르고 있는 등 사회적으로 심각한 문제가 되고 있고, 당뇨병의 유병률과 발생률은 이미 구미 선진국을 앞지르고 있는 실정이다. 최근의 국내 당뇨병 역학 보고에 의하면 당뇨병 유병률 조사 당시 진단되지 않았던 환자가 다수 존재하며, 또한 당뇨병의 전단계로 알려진 내당능 장애의 유병률도 상당히 높게 조사되었다. 알려진 바로는 내당능장애에 속하는 환자는 연간 5-12%에서 현성 당뇨병으로 이행되는 고위험군이다. 따라서 현시점에서 한국인 당뇨병 환자의 임상특성, 혈당 및 합병증 관리에 있어서 병인기전에 근거한 새로운 치료지침의 수립이 필요한 상황이다.¹

당뇨병에 대한 인식변화와 치료방법의 급속한 발전과 더불어 당뇨병 환자의 평균 수명이 연장되면서 당뇨병성 만성합병증이 현저히 증가하고 있다. 최근 국내에서도 당뇨병 환자의 대혈관 합병증으로 인한 관상동맥

이나 뇌혈관의 죽상경화증이 급속히 증가하고 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 특히, 당뇨병의 여러 만성 합병증 중에서 당뇨병성 신경병증은 비교적 일찍 발병하고 자율신경병증 등 복잡하고 난치성 합병증으로 진행되어 당뇨병성 족부질환의 주요한 원인이 되고 있다. 이미 국내에서는 1980년대 후반 이후부터 당뇨병성 족부질환으로 상당수의 환자가 절단 등의 위험에 직면하고, 이러한 상황의 배경에 당뇨병성 신경병증이 현재 가장 많은 원인을 차지하고 있는 상황이다.² 따라서 이를 예방하고 치료효과를 보이는 약제의 개발이 필요한 시점이나 당뇨병성 신경병증은 현재로서는 표준적인 치료방법이 확립되지 않아, 당뇨병성 신경병증의 기전규명을 통한 신약개발의 기반 구축이 필요한 상태이다. 최근에는 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist 계열의 약물들이 인슐린 저항성을 근간으로 하는 대사성 증후군에서 효과적으로 사용되고 있는데, RXR-PPAR heterodimer에 의한 인슐린 저항성 억제 유전자의 조절은 이들 약물의 주요 작용 기전 중의 하나이다,⁴ PPAR agonist에 대한 연구와 실용화는 상당히 진행되어 있으나 α , β 그리고 γ 의 아형으로 구성되어 있는 retinoid acid receptor (RAR) 또는 retinoid X receptor (RXR)에 선택적인 retinoic acid 유도체의 개발은 최근에 시작되었으며 내분비 영역의 약물 개발에서 현재 주요 연구소 및 제약회사들이 이 분야를 선점하려고 노력하고 있다.³⁻⁵

당뇨병성 자율신경병증의 병인은 아직 명확하게 규명되지 않았으며, 고혈당의 조절상태에 따른 대사 장애설, 신경미세혈관 장애설, Nerve growth factor(NGF) 부족설, 및 교감신경절에 대한 항체 및 항미주 (anti-vagus) 신경 항체의 발현 등 자가면역설 등이 있다. 그 외에 고혈당에 의한 폴리올 경로의 활성화, protein kinase C의 활성화에 의한 혈관 수축 및 신경 혈류 감소, 산화스트레스에 의한 내피세포 손

상, AGE(advanced glycosylation end products) 형성, 필수 지방산 결핍 등이 관여한다고 알려져 있다. Retinoic acid 유도체가 당뇨병성 신경병증의 병인의 매개체인 TGF- β , IGF-axis와 같은 성장 인자에 직접적 또는 간접적인 작용을 미친다는 분자 생물학적 연구 보고가 최근 나오면서,⁶⁻⁸ retinoic acid 유도체들을 통한 성장인자들의 조절을 통해서 당뇨병성 신경병증의 예방 또는 개선의 효과를 기대할 수 있다. 특히, 성장 인자 중에서 IGF-axis는 인슐린의 기능을 조절하는데 핵심적인 역할을 하고 있으며,⁹ 이러한 결과를 바탕으로 retinoid acid receptor agonist(RARA)는 제2형 당뇨병 및 당뇨병성 합병증(신경병증)의 좋은 치료제가 될 가능성이 매우 높다. 최근에 산화성 스트레스, AGE, NGF도 신경병증의 발병기전에 역할을 하고 있다는 연구결과의 측면에서도 RARA가 산화성 스트레스를 비롯하여 여러 관련 인자들의 개선의 가능성에서, 당뇨병성 신경병증의 치료 및 예방 효과의 가능성도 기대할 수 있겠다. 본 연구과제의 목표는 RARA의 당뇨병성 신경병증의 예방 효과와 신경병증의 진행 억제 약리작용과 기전을 확인하여, 당뇨병성 신경병증의 치료제로서의 가능성을 연구하고자 하였다.

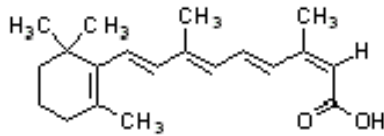
II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA)

RAR 효현제는 Sigma 회사에서 제조한 13-*cis*-retinoic acid(isotretinoin)를 사용하였다. 용량은 kg당 2mg을 arachis oil 에 섞어 총량을 0.2mL로 하였다.

13-*cis*-retinoic acid(isotretinoin) FW : 300.4 Sigma co. St. Louis, MO,USA



<The chemical structure of 13-*cis*-retinoic acid(isotretinoin)>

나. 실험동물

제2형 당뇨병의 실험동물 모델인 생후 6주된 OLETF 쥐 (Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats, Tokushima Research Institute Otsuka, Pharmaceutical ; Tokushima, Japan) 20마리와, 대조군으로써 생후 6주된 LETO rats (Long-Evans-Tokushima-Otsuka rats, Tokushima Research Institute Otsuka, Pharmaceutical ; Tokushima, Japan) 10마리를 온도가 25℃, 실내습도가 40~60%로 잘 유지되는 사육실에서 충분한 사료 및 식수를 제공하면서 사육하였다.

2. 방법

가. 13-*cis*-retinoic acid의 투여방법

OLETF 쥐 20마리와 대조군 LETO 쥐 10마리를 각각 반씩 나누어 받은 13-*cis*-retinoic acid를 arachis oil에 섞어 매일 12주간 경구 투여하고, 나머지 반은 arachis oil만 같은 시간에 경구 투여하였다.

나. 혈액 및 요 검사와 방법

동물실험은 총 12주간 시행하였으며 매주 1회의 체중과 혈당을 측정하고 총 2회의 경구 당 부하 검사를 시행하였다. 13-*cis*-retinoic acid의 당뇨병성 신경병증에 대한 치료 효과가 있는지를 조사하기 위하여, 48시간 소변 수집검사 및 실험 종료 시 쥐를 희생시키면서 심장에서 혈액을 채취하여 각종 생화학 검사를 시행하였다. 검사의 내용은 아래와 같다.

(1) 혈액 및 요 검사

(가) 혈청학적 검사 : 혈중 glucose, BUN, creatinine, SGOT, SGPT, 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 유리지방산의 농도를 측정하였다.

(나) Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) 검사 : IGF-1, IGF BP-3, TGF- β , insulin, c-peptide의 수치를 측정하였다.

(다) 방사선 면역 조사법 : 요중 알부민 양을 측정하였다.

(2) 방법

(가) 13-*cis*-retinoic acid의 혈중 지질대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈중 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 유리지방산을 측정하였다.

(나) 48시간 요량을 측정하고 동시에 방사선 면역 조사법으로 요중 단백(알부민) 배설량을 측정. 요 시료는 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 요 creatinine 및 단백뇨를 측정하는데 이용하였다.

(다) 간장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간 효소 수치 (SGOT/SGPT)를 검사하였다.

다. 신경 모세혈관 밀도(Nerve capillary density)

동물실험이 종료된 상태에서 신경조직을 절제하여 morphometry 방법으로 각 군 간의 총 신경 면적을 정량화하였다. 각각의 rat에서 신경조직을 절제하여 횡단면으로 3 μ m 두께의 조직을 얻어 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하였고 분석할 신경조직은 자동 형태 분석시스템(automated image analysis system)으로 다음의 사항을 측정하였다.

- (1) 총 신경 면적(total nerve area, mm²)
- (2) 모세혈관 수(capillary number)

3. 통계 분석

연구종료 시점까지 LETO 쥐는 총 5마리(13-*cis* retinoic acid 투여군 3마리, 대조군 2마리) OLETF 쥐는 총 13마리(13-*cis*-retinoic acid 투여군 5마리, 대조군 8마리)가 생존하였고, 각 군의 개체수가 적어 비모수적인 통계분석을 시행하였다. 4군을 통합하여 통계분석을 하였을 경우는 Kruskal-Wallis 검정을 시행하였고, 두 군 간의 비교시, 예를 들어 13-*cis* retinoic acid 투여와 관련되어 LETO 혹은 OLETF 군 내에서의 차이를 비교하거나, 13-*cis* retinoic acid 투여군과 비 투여군으로 나눌 때, 혹은 OLETF와 LETO 두 군으로 나눌 때는 Mann-Whitney 검정을 사용하였다. 통계결과는 p-value 0.05를 기준으로 하여 이 값보다 작을 때 대립 가설을 의미 있는 것으로 판단하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 몸무게의 변화

LETO군보다 OLETF군, 즉 당뇨병이 있는 군에서 몸무게가 의미 있게 높은 값으로 측정되었다.(LETO군: 519.5 ± 28.7 g, OLETF군 631.0 ± 21.3 g, $p < 0.05$, 그림 1) 각각의 군 안에서 13-*cis* retinoic acid 투여에 의한 차이나, 각 군에 상관없이 전체적으로 13-*cis* retinoic acid 투여, 대조군으로 나누어서 비교 시에는 통계적으로 의미있는 결과를 보이지 않았다.($p > 0.05$)

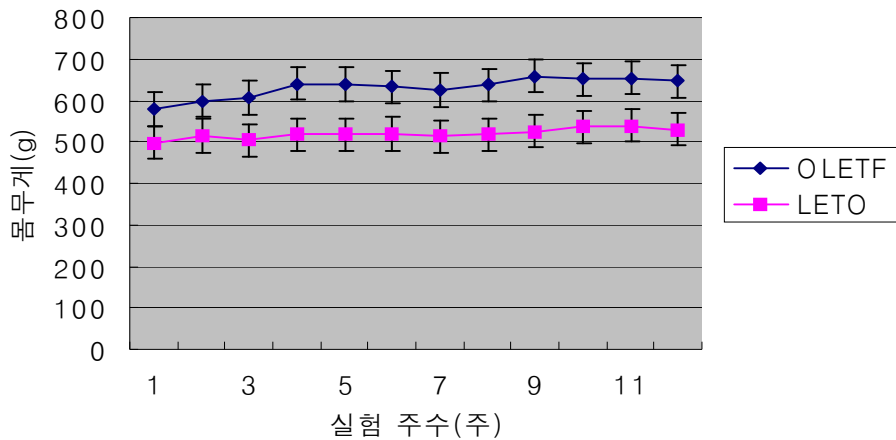


그림 1. OLETF군과 LETO군의 몸무게 비교 그래프.

2. 혈당의 변화

OLETF, LETO 두 군 간에 측정시작 3주부터 통계적으로 의미있는 혈당의 차이를 보였다.($p < 0.05$, 그림 2) OLETF군은 2주부터 혈당이 120 mg/dL 이상을 보이기 시작하여 당뇨병으로의 진행을 확인할 수 있었다.(그림 2)

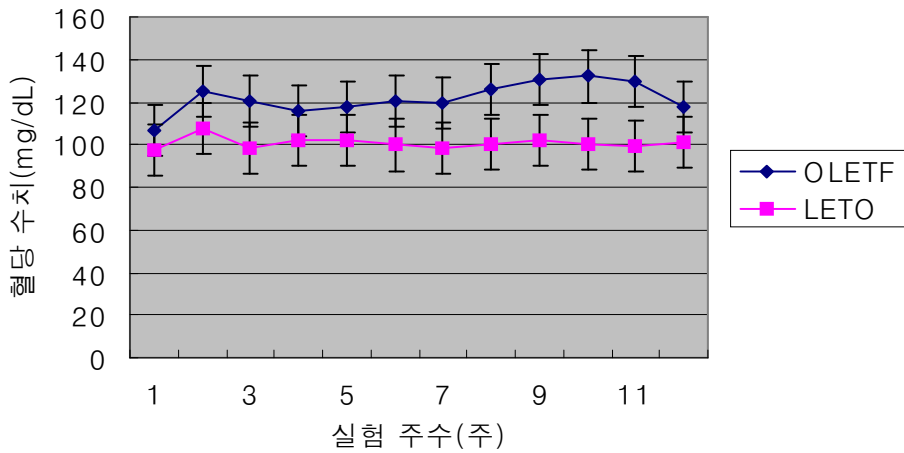


그림 2. OLETF군과 LETO군 간의 혈당비교.

OLETF, LETO 두 군 간에 측정시작 3주부터 의미있는 혈당의 차이를 보였다

그러나 각 군 내에서 13-*cis* retinoic acid 투여에 의한 차이나, 각 군에 상관없이 13-*cis* retinoic acid 투여, 대조군으로 나누어서 비교 시에는 통계적으로 의미있는 결과를 보이지 않았다.($p > 0.05$) 내당능 검사에서도 혈당처럼 13-*cis* retinoic acid 투여에 의한 차이를 확인할 수 없었고($p > 0.05$), 13-*cis* retinoic acid 투여와 상관없이 OLETF군에서만 AUC(area under the curve)가 의미있게 차이를 보였다.($p < 0.05$, 그림 3)

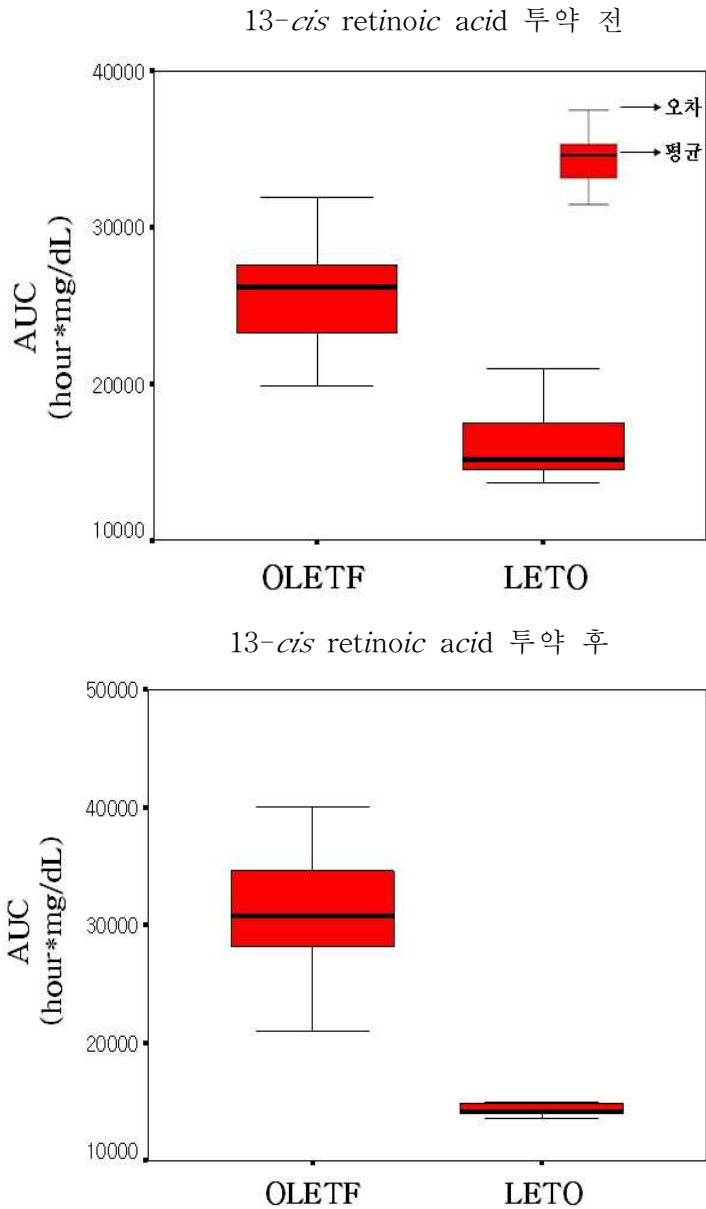


그림 3. 13-*cis* RA 투약 전·후 OGTT결과에 대한 AUC의 비교.
OLETF군에서 LETO군보다 투약 전과 후 모두에서 AUC가 높은 값을 보여 (투약전 $p=0.002$, 투약 후 0.001) 당뇨병이 지속되고 있음을 알 수 있다.

3. c-peptide, insulin의 변화

OLETF군에서 c-peptide, insulin 수치가 높게 측정되었다. (p<0.05, 표 1) 13-cis retinoic acid의 투여는 OLETF군에서만 혈청 c-peptide 농도의 의미있는 차이를 유발하였다.(p=0.03, 표 2)

표 1. LETO, OLETF군에서 Insulin¹, c-peptide²

	LETO	OLETF	p value
Insulin	5.7 ± 2.5	10.8 ± 3.7	< 0.05
c-peptide	0.21 ± 0.07	0.29 ± 0.07	< 0.05

¹: 단위는 $\mu\text{IU/mL}$ 이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄.

²: 단위는 ng/mL 이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄.

표 2. OLETF군에서 13-cis RA* 투여에 따른 Insulin¹, c-peptide²

OLETF군	13-cis RA 투여전	13-cis RA 투여 후	p value
Insulin ($\mu\text{IU/mL}$)	9.8 ± 4.1	12.6 ± 2.2	> 0.05
c-peptide (ng/mL)	0.26 ± 0.07	0.34 ± 0.04	< 0.05

* Retinoic acid

¹: 단위는 $\mu\text{IU/mL}$ 이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄.

²: 단위는 ng/mL 이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄

4. 신장기능의 변화.

LETO군에서 혈중 BUN, creatinine 수치가 OLETF군보다 높게 측정되었다.(표 3) 소변 내 creatinine의 농도는 OLETF군에서 통계적으로 의미있게 높게 측정되었다.(data not shown) 13-cis retinoic acid 투여 유무에 따라 비교하였을 때, 투여군에서 소변 내 albumin 농도가 낮았지만(p=0.09, 표 4), 소변 내 albumin/creatinine ratio는 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.(p=0.07)

표 3. LETO, OLETF군에서 BUN, creatinine¹

	LETO	OLETF	p value
BUN	5.7 ± 2.5	10.8 ± 3.7	0.01
Creatinine	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.01

¹: 각각의 단위는 mg/dL이며 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

표 4. OLETF군에서 13-*cis* RA투여에 따른 urine albumin¹, urine creatinine², urine albumin/creatinine ratio

	13- <i>cis</i> RA 투여전	13- <i>cis</i> RA 투여 후	p value
urine albumin	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.1	0.09
urine creatinine	89.8 ± 38.4	100.7 ± 21.5	0.28
urine albumin/creatinine × 100	163.7 ± 39.2	353.2 ± 70.4	0.07

^{1,2}: 각각의 단위는 mg/dL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

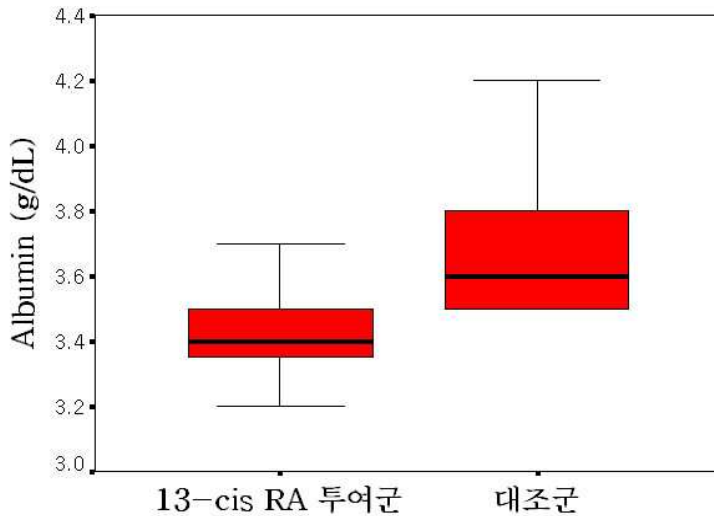


그림 4. OLETF, LETO군에 관계없이 13-*cis* RA 투여군과 비 투여군 간의 소변 내 albumin 농도의 비교.

5. IGF-I, IGFBP3의 변화

1) IGF-I

OLETF군에서 IGF-I이 높게 측정되었고($p=0.001$, 그림 5, 표 5), 13-*cis* retinoic acid 투여는 LETO군에서만 혈중 IGF-I 수치를 의미 있게 감소시켰다.($p=0.02$, 표 6)

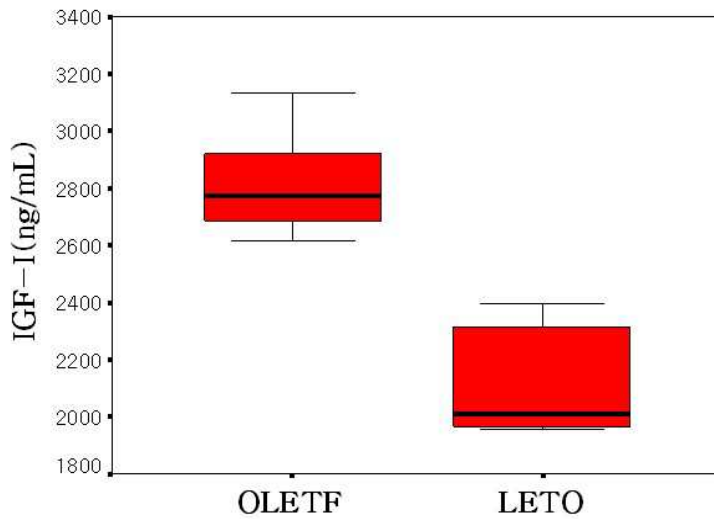


그림 5. OLETF, LETO군의 혈중 IGF-I 수치 비교.

OLETF군에서 IGF-I이 LETO군보다 높게 측정되었다. ($p=0.001$)

2) IGFBP-3

OLETF군에서 LETO군보다 IGFBP-3 수치가 낮았고($p=0.001$, 그림 6, 표 5) OLETF군에서는 13-*cis* retinoic acid 투여가 IGFBP-3를 상승시키는 결과를 보였으나($p=0.002$, 그림 7, 표 7), LETO군에서는 IGFBP-3의 수치 차이가 없었다.($p=0.61$, 표 6)

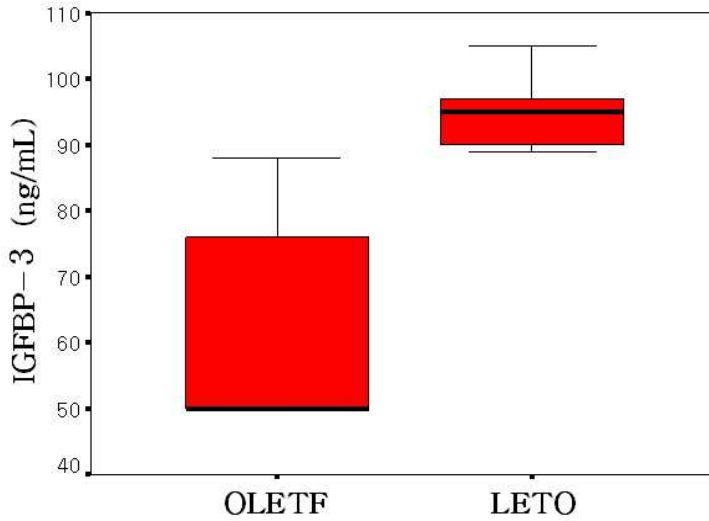


그림 6. OLETF, LETO군 간의 혈중 IGFBP-3 수치 비교.

OLETF군에서 IGFBP-3 수치가 낮게 측정되어 당뇨병이 발생할 경우, IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 증가함을 알 수 있다.(p=0.001)

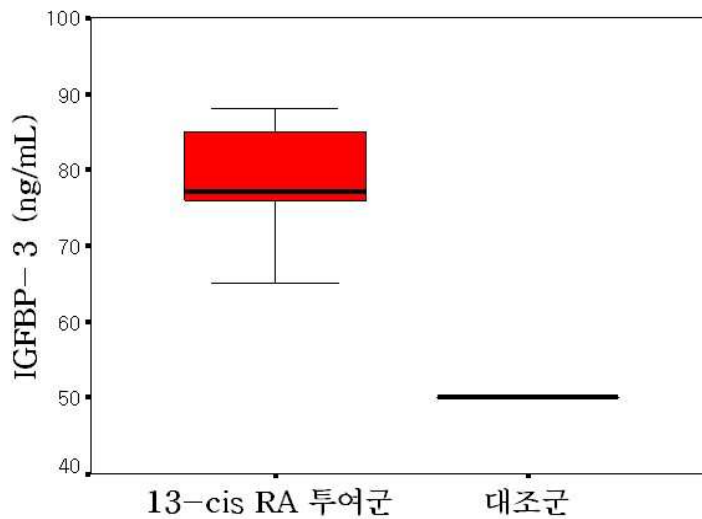


그림 7. OLETF군에서 13-*cis* RA의 투여 후 IGFBP-3 수치

13-*cis* RA의 투여가 OLETF 군에서만 혈중 IGFBP-3의 수치를 상승시키는 효과를 확인하였다.(p=0.002)

3) IGF-I/IGFBP-3 molar ratio

OLETF, LETO군을 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio로 비교하였을 때 OLETF군에서 높은 값을 보였다.($p=0.001$, 그림 8, 표 5) 각 군 내에서(LETO, OLETF군) 13-*cis* retinoic acid 투여에 의한 molar ratio의 변화가 있는지 보고자 하였다. OLETF군에서는 13-*cis* retinoic acid에 의하여 molar ratio가 감소하였지만($p=0.002$, 그림 9, 표 7) LETO군에서는 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.($p=0.2$, 그림 9, 표 7) 한편, 혈중 TGF- β 는 각 군 간에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. (data not shown)

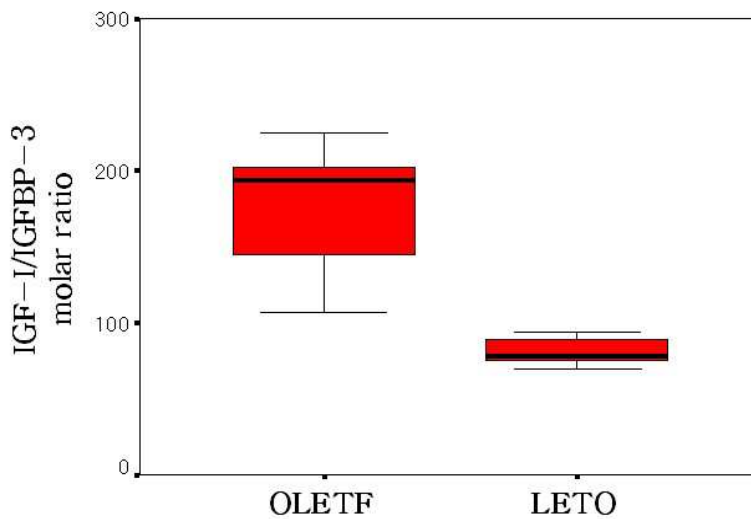


그림 8. OLETF, LETO군 간의 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio 비교
OLETF군에서 더 높은 수치를 보여 당뇨병이 있을 경우 molar ratio가 증가함을 알 수 있었다.($p= 0.001$)

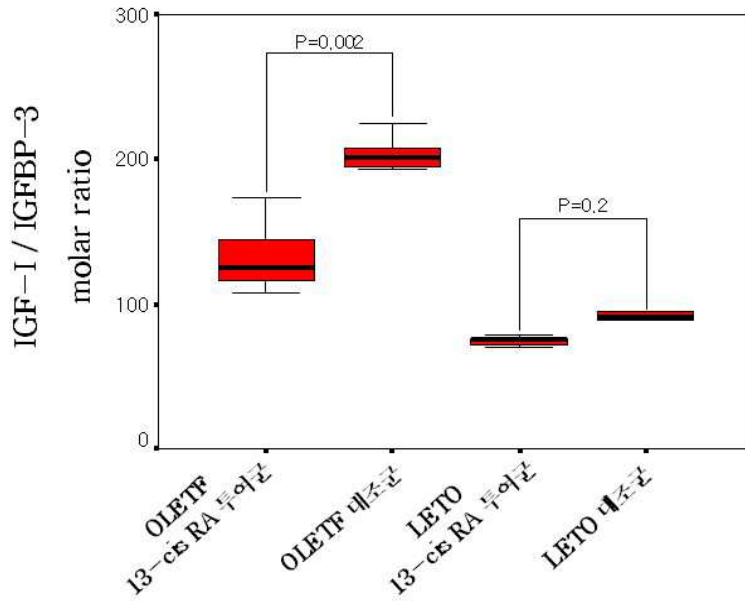


그림 9. 각 군에서 13-*cis* RA의 투여가 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio에 미치는 영향.

OLETF군에서는 13-*cis* retinoic acid의 투여로 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 감소하고(p=0.002), LETO군에서는 13-*cis* retinoic acid 투여가 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio에 영향을 주지 못하였다.(p=0.2)

표 5. LETO, OLETF군에서 IGF-I¹, IGFBP-3², IGF-I/IGFBP-3 molar ratio

	LETO	OLETF	p value
IGF-I	2127.6 ± 209.3	2825.9 ± 182.8	< 0.01
IGFBP-3	95.2 ± 6.4	60.9 ± 15.2	< 0.01
IGF-I/IGFBP-3 ratio	81.1 ± 10.2	176.5 ± 39.3	0.01

¹: 단위는 ng/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

²: 단위는 µg/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

표 6. LETO군에서 13-*cis* RA* 투여에 따른 IGF-I¹, IGFBP-3², IGF-I/IGFBP-3 molar ratio

LETO군	13- <i>cis</i> RA 투여 전	13- <i>cis</i> RA 투여 후	p value
IGF-I	2353.5 ± 55.9	1977.0 ± 31.9	< 0.01
IGFBP-3	93.10 ± 5.7	96.7 ± 7.6	0.61
IGF-I/IGFBP-3 molar ratio	91.5 ± 3.4	74.1 ± 4.6	0.2

*: Retinoic acid

¹: 단위는 ng/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

²: 단위는 µg/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

표 7. OLETF군에서 13-*cis* RA 투여에 따른 IGF-I¹, IGFBP-3², IGF-I/IGFBP-3 molar ratio

OLETF군	13- <i>cis</i> RA 투여 전	13- <i>cis</i> RA 투여 후	p value
IGF-I	2815.4 ± 148.3	2842.6 ± 247.4	0.81
IGFBP-3	50.0 ± 0.1	78.2 ± 9.0	< 0.01
IGF-I/IGFBP-3 molar ratio	203.3 ± 10.7	133.6 ± 26.5	< 0.01

*: Retinoic acid

¹: 단위는 ng/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

²: 단위는 µg/mL이고 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타냄

6. 신경 모세혈관 밀도(Nerve capillary density)의 변화

OLETF, LETO군 간의 비교에서 신경 모세혈관 밀도는 OLETF군에서 낮게 측정되었다.(p=0.005, 그림 10, 표 8) OLETF, LETO군 모두에서 13-*cis* retinoic acid 투여 후에 신경 모세혈관 밀도의 평균값은 감소하였으나 통계학적으로 의미있는 변화는 보이지 않았다.(LETO군, p=0.8; OLETF군, p=0.18, 그림 11, 표 9)

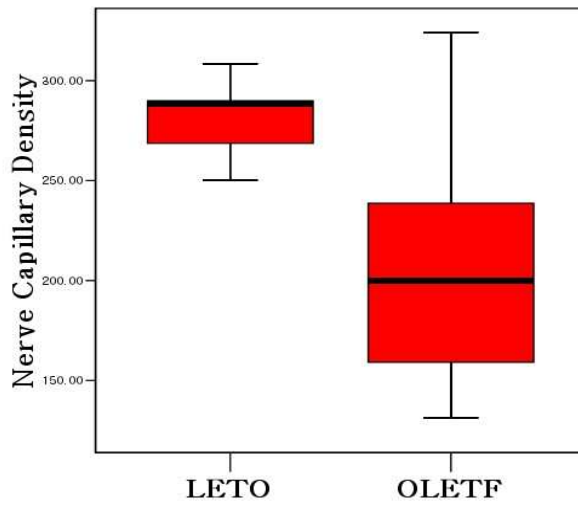


그림 10. OLETF, LETO군에서 신경 모세혈관 밀도의 비교.
OLETF 군에서 LETO군보다 신경 모세혈관 밀도가 낮다. 당뇨가 있는 경우 신경 모세혈관 밀도가 감소함을 알 수 있다.($p=0.005$)

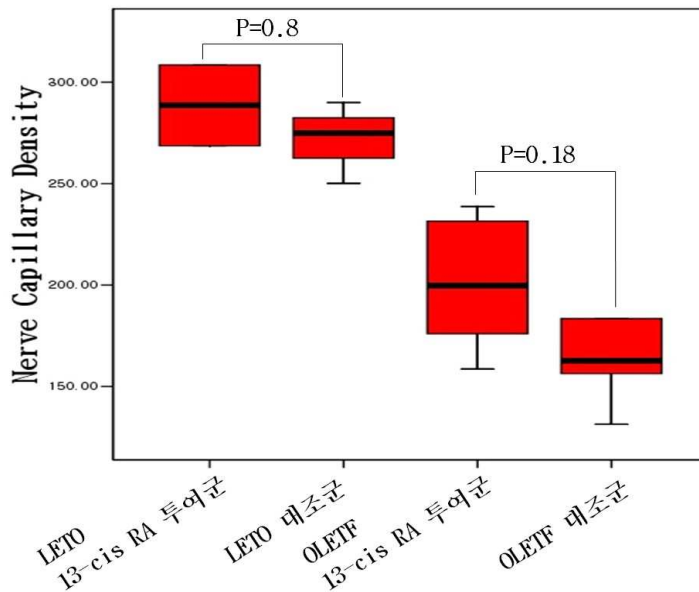


그림 11. OLETF, LETO 각각의 군내에서 13-*cis* RA의 투여가 신경 모세혈관 밀도에 미치는 영향.

표 8. LETO, OLETF군에서 신경 모세혈관 밀도

	LETO	OLETF	p value
NCD*	278.4 ± 22.0	199.0 ± 51.9	0.005

*: Nerve capillary density (신경 모세혈관 밀도, number/mm²)

표 9. LETO, OLETF 각 군에서 13-*cis* retinoic acid 투여 전·후에 따른 신경 모세혈관 밀도

	13- <i>cis</i> RA 투여 전	13- <i>cis</i> RA 투여 후	p value
LETO군 NCD*	288.5 ± 28.1	271.7 ± 20.1	0.8
OLETF군 NCD*	212.1 ± 53.1	178.0 ± 47.4	0.18

*: Nerve capillary density (신경 모세혈관 밀도, capillary number/mm²)

7. 지방대사 표지자의 변화.

LETO군과 OLETF군으로 나누어 비교하였을 때, OLETF 군에서 총 콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산 수치가 통계학적으로 의미 있게 높은 값을 보였다.(총콜레스테롤, p=0.026; 중성지방, p<0.001; 유리지방산, p<0.001) OLETF, LETO군 각각의 군내에서 13-*cis* retinoic acid의 투여는 위 3가지 검사결과에서 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

8. 간효소(SGOT, SGPT) 수치에의 변화

당뇨병의 존재유무나 13-*cis* retinoic acid 투여가 간효소 수치에 미치는 영향은 없었다. (data not shown)

IV. 고찰

OETF 쥐의 당뇨병은 인슐린 저항성이 발생되고, 그 후에 췌장의 베타세포의 기능부전으로 이어져 발생한다고 알려져 있는데, 시기적으로 태생 16주에 인슐린 저항성이 발생되고 40주면 베타세포 기능부전으로 이어진다고 한다.¹⁰ 본 연구에서 OETF 쥐와 LETO 쥐에서 태생 2주부터 혈당과 몸무게에서 차이를 보이기 시작하였고, 쥐를 희생시키기 직전인 12주째의 OGTT 검사결과의 AUC(area under the curve)에 대한 비교에서도 차이를 보여, 두 군 간의 비교가 당뇨병의 연구에 적합함을 알 수 있었다.

지방조직은 호르몬의 중요한 원천으로 adipokine (adiponectin, leptin, TNF- α , resistin)을 분비하는데, 이중 adiponectin 수치가 인슐린 민감성, 지방조직양 등과 비례관계를 보이는 것으로 보고 되고 있다.^{4,11-13} 최근 당뇨병의 치료제로 각광받는 것 중의 하나가 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor) 효현제인 TZDs(thiazolidinediones)계통의 약이다. 이 약은 PPAR- γ 가 지방조직 형성과 관련되어 FFA(free fatty acid)와 TG(triglyceride)가 지방세포 내로 축적되게 하여 간이나 골격근으로의 축적되는 양을 감소시켜 인슐린 민감도를 증가시킨다. 또한 TZDs는 PPAR를 통하여 adiponectin 유전자의 발현을 증가시킴으로서 인슐린 민감도 향상에 기여하리라고 추측된다.^{14,15}

PPAR- γ 의 경우 adiponectin의 유전자 발현을 증가시켜, adipokine이 PPAR- γ 와 작용하여 insulin 저항성 개선에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는데, 증거로 PPAR- γ 기능소실 돌연변이를 보이는 개체에서 혈중 adiponectin이 매우 낮아, PPAR- γ 의 활성도와 adiponectin 발현 사이의 밀접한 관계에 대하여 보고 된 바 있다.¹⁵ 지질대사의 개선에 대한 기전으로 인슐린의 지방분해 억제작용과 연관지어 생각해 볼 수 있는데, 이러한 인슐린의 작용에 이상이 발생하면 FFA가 말초조직에서 간으로 전달되는 양이 증가하여 간에서 중성지방으로 저장되거나 TG-rich

VLDL(very low density lipoprotein)로 저장되어 혈중 중성지방의 상승, VLDL과 HDL(high density lipoprotein) 사이의 cholesterol ester의 교환이 일어나 HDL 감소, VLDL의 증가가 발생하고 결과적으로 지방간이 발생한다. 그러나 PPAR- γ 효현제는 인슐린 저항성을 개선하여 인슐린의 작용을 증가시켜 지방분해를 억제하여 혈중 중성지방의 농도를 낮추고 HDL의 농도를 상승시켜, 지질대사의 개선에도 영향을 줄 것으로 생각되고 있다.¹⁶

13-*cis* retinoic acid의 인슐린저항성과 지질대사 개선에 대한 가능한 기전으로, 9-*cis* retinoic acid를 성숙된 지방세포에 투여하여 배양하였을 때 retinoid X receptor/PPAR gamma heterodimer의 활성화를 통하여 지방세포 형성과 당 축적을 유발하고, leptin의 분비를 억제하여 혈당을 감소시키고, 중성지방이나 유리지방산이 지방세포로 축적되게 하는 것이며, 이런 작용은 투여용량에 비례한 효과를 보인다. 또한 RAR 효현제 중 ATRA 보다 9-*cis* retinoic acid가 PPAR- γ 와 서로 상승작용을 한다고 보고 되었다.^{17,18} 본 연구에서는 13-*cis* retinoic acid의 투여가 혈당이나 지방대사에 변화를 유발하는 것을 확인할 수는 없었다.

IGF-I은 single chain peptide로 구성되어 있고 pro-insulin과 비슷한 구조적 유사성을 가지고 있으며 여러 조직에서 합성되지만 대부분은 간에서 만들어진다. 이러한 IGF-I은 성장 호르몬, insulin, 영양섭취 등에 의해서 조절 받으며 여러 세포들의 증식과 분화에 관여하며 insulin과 비슷한 대사 효과를 보이며¹⁹ 인슐린의 약 1/12의 혈당강하 효과가 있다고 알려져 있다.^{20,21}

IGF-1 gene knock-out mouse에서 혈청내의 IGF-I의 수치가 정상 15~20% 까지 감소하고 성장 호르몬은 6배까지 증가하여 결국 혈당이 증가되는데, 이런 쥐의 fasting/glucose challenge test시 정상 쥐와 같은 혈청 내 혈당수치를 보이지만 혈청내의 인슐린은 높아, 즉 고인슐린혈증을 보여 인슐린에 대한 저항성을 보인 것으로 보고한 바 있다.^{22,23} 그러

나 이런 인슐린 저항성은 IGF-I의 감소 때문인지 성장호르몬의 증가에 의한 몸의 구성성분의 변화인지는 확실하지 않다. 또한 쥐를 이용한 다른 실험에서 IGF-I, IGF-II 또는 IGF-I 수용체가 결핍된 경우, 당뇨병나 케톤산혈증은 발생하지 않는다고 보고 된 바 있어²⁴, 당뇨병의 현증 및 합병증의 발생도 IGF-I과 관련이 되리라 추측할 수 있다. 만일 당뇨병에서 IGF-I을 외부에서 투여해 준다면 성장호르몬의 감소를 통하여, 또는 IGF-I의 직접적인 작용으로 인슐린 저항성을 개선시켜 혈당강하를 유발할 수 있을 것으로 생각된다. 실제 임상실험에서 IGF-I을 주입시, IGF-I은 인슐린 감수성을 증가시켜 말초에서 당수입이 증가되고, 당의 분해 및 글리코겐의 합성이 증가되어 혈당 강하 작용이 일어나고, 간에서의 당 배출을 억제한다는 보고가 있다.²⁵⁻³⁰

당뇨병에서는 IGFBP-3의 단백질분해(proteolysis)가 증가되고 이 과정에 의해서 생성된 IGFBP-3의 aminoterminal fragment가 인슐린과 IGF-I 수용체의 자가 인산화(autophosphorylation)를 억제함으로써 인슐린 저항성을 증가시킨다. 이러한 IGFBP-3의 단백질분해(proteolysis)의 증가는 인슐린 결핍 또는 인슐린 저항성이 있는 경우에 IGF-I의 합성 감소에 따른 보상작용으로 생각되며 실제 1형 당뇨병, 인슐린 치료를 받고 있지 않는 2형 당뇨병에서 단백질분해된 IGFBP-3의 수치가 상승되어 있어 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio는 변화가 없거나 상승되어 있다고 한다.^{31,32}

RAR 효현제의 IGF-axis에 미치는 영향에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는데 IGF-I의 활성화에 의한 IRS-I(insulin receptor substrate 1)의 인산화에 의한 세포증식자극 과정 중 인산화 과정을 retinoic acid가 억제한다고 보고 되었다.⁶⁻⁸ Retinoic acid가 IGF-I의 down stream signaling 억제를 통하여 MCF-7(breast cancer cell line)의 증식을 억제한다는 보고도 있다.³³ 이러한 Retinoic acid의 항 증식 효과는 중앙분야에서 많이 연구되고 있다. 특히 폐암이나 유방암 분야에서 retinoic acid 유도체인 9-*cis* retinoic acid의 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio 조절을 통한 항 증식 효과는 최근에 보고 되고 있다.³⁴⁻³⁶ 그러나 IGF-I은 암세

포 연구나 동물의 IGF-I gene knock-out mouse의 연구에서 보고 되었듯이, IGFBP-3와 연관되어 항 증식 작용을 나타내기도 하고, 당뇨병의 발생이나 합병증의 발생에 관여되는데, 이것은 혈당을 조절하는 것과 다른 방향으로 작용한다고 생각할 수 있다.^{26,34-36}

본 연구에서는 당뇨병 개체인 OLETF군과 정상개체인 LETO군을 비교하였을 때 LETO군보다 OLETF군에서 IGF-I의 수치는 높고, IGFBP-3는 낮아져 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 높게 유지되는 것을 확인하였다. 한편 OLETF군에서 13-*cis* retinoic acid 투여 후에 IGF-I의 수치는 변화가 없고 IGFBP-3는 증가하여 결국 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 투여전보다 감소하였다. 만일 13-*cis* retinoic acid의 투여로 IGFBP-3의 단백질분해(proteolysis)가 감소하여 IGFBP-3의 수치가 상승되었다면 인슐린 저항성이 개선되어 혈당 개선효과가 동반될 것으로 예상되지만 본 연구에서는 통계적으로 의미 있는 혈당개선 효과는 나타나지 않았다. Endoneurial capillary density(신경내막 모세혈관 밀도)와 intercapillary distance는 epineurial perfusion을 반영하고³⁷ 당뇨병성 신경병증 환자에서는 의미 있는 luminal area의 변화나 신경내막 모세혈관 밀도의 변화 없이 sural nerve에서 산소압(oxygen tension)이 감소되어 있다.³⁸⁻⁴³ 또한 subclinical neuropathy에서는 epineurial nerve의 혈류량이 증가하고 이는 동정맥 shunting과 관련이 있다고 한다.³ 이러한 사실로 미루어 볼 때 신경내막 모세혈관 밀도의 증가는 hyperperfusion이나 hypoxia의 보상적인 반응이라고 추측할 수 있다. 일부 연구에서는 당뇨병성 신경병증을 포함한 진행성 신경병증에서 신경내막 모세혈관의 변화 없이 신경외막 모세혈관(epineurial capillary)만 증가한다고 보고하였고, 신경내막 모세혈관 밀도가 신경기능과 반비례 관계에 있다고 이야기되고 있기도 하다.⁴⁵ 또한 초기의 당뇨병성 신경병증의 경우 신경내막 모세혈관 밀도가 보상적인 반응으로 인해서 증가하지만 신경병증이 있으면 이러한 신경 모세혈관 밀도(Nerve capillary density)의 변화는 소실되며³⁸⁻⁴³ 만일 진행된 당뇨병성 신경증의 경우에는 신경 모세혈관 밀도가 감소될 것이다.

본 연구에서는 총 12주 간의 실험기간을 통하여 신경조직의 변화를 보기 위하여 시행한 형태분석(morphometry)에서 LETO군과 OLETF군에서 신경 모세혈관 밀도의 차이는 없었으며 13-*cis* retinoic acid 투여에 의한 통계적 의미를 가지는 신경 모세혈관 밀도 차이도 확인할 수는 없었다. 아마도 이는 연구 진행기간이 형태학적 변화를 보기에는 충분치 못했고 대상 실험군의 수가 적었기 때문일 가능성과 13-*cis* retinoic acid의 투여로 인해서 산화스트레스(oxidative stress)가 감소하고 동정맥 shunting을 감소시켜 혈류량의 증가와 함께 결과적으로 신경 모세혈관 밀도의 증가를 가져온 것으로 생각된다.

V.결 론

1. 본 연구에서 당뇨병 개체인 OLETF 쥐와 비 당뇨병 개체인 LETO 쥐를 이용하여 당뇨병 개체에서는 혈중 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 높음을 확인하였다.

2. 당뇨병 개체인 OLETF 군과 정상개체인 LETO 군을 비교하였을 때 OLETF군에서 IGF-I은 높고, IGFBP-3는 낮아져서 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio가 높게 유지되는 것을 확인하였다. 13-*cis* retinoic acid 투여 후에 OLETF 군에서 IGF-I은 변화가 없는 상태에서 IGFBP-3가 증가하였고 이는 결국에 IGF-I/IGFBP-3 molar ratio를 낮게 하였다.

3. LETO, OLETF군에서 13-*cis* retinoic acid 투여 후에 신경 모세혈관 밀도(nerve capillary density)는 변하지 않은 것으로 나타났다. 아마도 13-*cis* retinoic acid의 투여가 동정맥 shunting을 감소시키고 결과적으로 감소되어야 할 신경모세혈관 밀도를 증가시켰기 때문에 신경 모세혈관 밀도의 변화가 없는 것처럼 나타났다고 추측할 수 있다.

참고문헌

1. 한국인 당뇨병의 역학. *J Korean Diabet Ass.* 2001;25
2. 우리나라의 사망원인의 변천과 현황. *대한의학협회지* 1993;36
3. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004;10(4):1-7
4. Grunel M, Savage DB, Krishna V, Chartterjee OK, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2412-2421.
5. Zusi C, Lorenzi MV, Valerie Vivat-Hannah. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. *DDT* 2002;7(23):1165-1174
6. Song JI, Lango MN, Hwang JD, Drenning SD, Zeng Q, Lamph WW et al Abrogation of transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor autocrine signaling by an RXR-selective retinoid (LGD1069, Targretin) in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 2001;61:5919-5925
7. Pendaries V, Verrecchia F, Michel S, Mauviel A. Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene.* 2003;22:8212-8220
8. Del Rincon SV, Rousseau C, Samanta R, Miller WH Jr. Retinoic acid-induced growth arrest of MCF-7 cells involves the selective regulation of the IRS-1/PI 3-kinase/AKT pathway. *Oncogene.* 2003;22:3353-3360
9. Holt RI, Simpson HL, Sonksen PH. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet Med* 2003;20:3-15

10. Kenji S, Kaori I. What is the primary event for the development of diabetes mellitus in OLETF rats? *Obesity and NIDDM. Lessons from the OLETF rat.* 1999;105-109
11. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-946
12. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentration of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkey. *Diabetes* 2001;50:1126-1133.
13. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE, The adipocyte-secreted protein Arcp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947-953.
14. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentration of adiponectin, a adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-2099.
15. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002;143:998-1007.
16. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106:453-458
17. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-688.
18. Hong SE, Ahn IS, Jung HS, Rayner DV, Do MS. Effect of

- retinoic acid on leptin, glycerol, and glucose levels in mature rat adipocytes in vitro. *J Med Food* 2004;7(3):320-326.
20. Boulware SD, Tamborlane WV, Rennert NJ, Gesundheit N, Sherwin RS. Comparison of the metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and insulin. Dose-response relationships in healthy young and middle-aged adults. *J Clin Invest* 1994;93:1131-1139.
 21. Russell-Jones DL, Bates AT, Umpleby AM, Hennessy TR, Bowes SB, et al. A comparison of the effects of IGF-I and insulin on glucose metabolism, fat metabolism and the cardiovascular system in normal human volunteers. *Eur J Clin Invest* 1995;25:403-411.
 22. Sjogren K, Wallenius K, Liu JL, Bohlooly YM, Pacini G, Svensson L, et al. Liver-derived IGF-I is of importance for normal carbohydrate and lipid metabolism. *Diabetes* 2001;50:1539-1545.
 23. Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, et al. Liver-specific igh-1 gene deletion leads to muscle insensitivity. *Diabetes* 2001;50:1110-1118.
 24. Lamothe B, Baudry A, Desbois P, Lamotte L, Bucchini D, et al. Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem J*. 1998;335:193-204.
 25. Jacob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. *J Clin Invest* 1989;83:1717-1723
 26. Shojaee-Moradie F, Umpleby AM, Thomason MJ, Jackson NC, Boroujerdi MA, et al. Comparison of the effects of insulin-like growth factor-I, insulin and combined infusions of insulin and insulin-like growth factor-I on glucose metabolism

- in dogs. *Eur J Clin Invest* 1995;25(12):920-928.
27. Carroll PV, Umpleby M, Ward GS, Imuere S, Alexander E, Dunger Det al. rhIGF-I administration reduces insulin requirements, decreases growth hormone secretion, and improves the lipid profile in adults with IDDM. *Diabetes* 1997; 46:1453-1458.
 28. Carroll PV, Christ ER, Umpleby AM, Gowrie I, Jackson N, Bowes SB et al. IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* 2000;49:789-796.
 29. Acerini CL, Patton CM, Savage MO, Kernell A, Westphal O, Dunger DB. Randomised placebo-controlled trial of human recombinant insulin-like growth factor I plus intensive insulin therapy in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1997;350:1199-1204.
 30. Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J. The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for *in vivo* biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1518-1524.
 31. Lassarre, C., F. Duron, and M. Binoux, Use of the ligand immunofunctional assay for human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) to analyze IGFBP-3 proteolysis and *igf-i* bioavailability in healthy adults, GH-deficient and acromegalic patients, and diabetics. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 2001;86(5): 1942-52.
 32. Devi, G.R., et al., Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and its proteolytic fragments on

- ligand binding, cell surface association, and IGF-I receptor signaling. *Endocrinology*, 2000;141(11):4171-4179.
33. White MF, The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;40 Suppl 2:S2-17.
 34. Lee HY, Chang YS, Han JY, Liu DD, Lee JJ, et al. Effects of 9-*cis*-retinoic acid on the insulin-like growth factor axis in former smokers. *J Clin Oncol* 2005;23(19):4439-4449.
 35. Decensi A, Johansson H, Miceli R, Mariani L, Camerini T, et al. Long-term effects of fenretinide, a retinoic acid derivative, on the insulin-like growth factor system in women with early breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(10):1047-1053.
 36. Torrisi R, Parodi S, Fontana V, Pensa F, Casella C, et al. Effect of fenretinide on plasma IGF-I and IGFBP-3 in early breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998 Jun 10;76(6):787-790.
 37. Low PA, Lagerlund TD, McManis PG: Nerve blood flow and oxygen delivery in normal, diabetic, and ischemic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 1989;31:355 - 438.
 38. Malik RA, Veves A, Masson EA, Sharma AK, Ah-See AK, Schady W, Lye RH, Boulton AJ: Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:557 - 561.
 39. Malik RA, Newrick PG, Sharma AK, Jennings A, Ah-See AK, Mayhew TM et al. Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia* 1989;32:92 - 102.
 40. Khawaja KI, Walker D, Hayat SA, Boulton AJ, Malik RA Clinico-pathological features of postural hypotension in diabetic

- autonomic neuropathy. *Diabet Med* 2000. 17:163 - 166.
41. Newrick PG, Wilson AJ, Jakubowski J, Boulton AJ, Ward JD Sural nerve oxygen tension in diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;293:1053 - 1054.
 42. Britland ST, Young RJ, Sharma AK, Clarke BF Relationship of endoneurial capillary abnormalities to type and severity of diabetic polyneuropathy. *Diabetes* 1990;39:909 - 913.
 43. Bradley J, Thomas PK, King RHM, Llewelyn JG, Muddle JR, Watkins PJ Morphometry of endoneurial capillaries in diabetic sensory and autonomic neuropathy. *Diabetologia* 1990;33:611 - 618.
 44. Tesfaye S, Malik R, Harris N, Jakubowski JJ, Mody C, Rennie IG, Ward JD Arterio-venous shunting and proliferating new vessels in acute painful neuropathy of rapid glycaemic control (*insulin neuritis*). *Diabetologia* 1996;39:329 - 335.
 45. Soley Thraínsdóttir, Rayez A. Malik, Lars B. Dahlín, Peter Wiksell, Karl F. Eriksson, Ingmar Rose´n et al. Endoneurial Capillary Abnormalities Presage Deterioration of Glucose Tolerance and Accompany Peripheral Neuropathy in Man. *Diabetes* 2003;VOL. 52:2616-2622.

Abstract

The effects of 13-*cis* retinoic acid on
Type 2 diabetic neuropathy in OLETF rat

Sang Hun Lee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Chul Woo Ahn)

Purpose : Some reported several new drugs that have effect on the DM neuropathy, but the action mechanisms are not known. Retinoic acid receptor(RAR) & retinoid X receptor(RXR) agonists are developed as the candidates for therapeutic agents for DM neuropathy. We studied about the action mechanism & effect on the DM neuropathy of RAR agonist (13-*cis* retinoic acid).

Method : Among 20 OLETF rats and 10 LETO rats, half of each group received 13-*cis*-retinoic acid admixed to arachis oil for 12 weeks by enteral feeding, while the other half received arachis oil only for the same period. Nerve capillary density was calculated by dividing the number of capillary by total nerve area, which was quantified using morphometry method in resected nerve tissue.

Result : The 13-*cis* retinoic acid modulated the IGF-I/IGFBP-3 molar ratio by increasing the serum level of IGFBP-3 on OLETF group, without modulating the serum level of IGF-I. Nerve

capillary density of both group did not change after medication of 13-*cis* retinoic acid

Conclustion : 13-*cis* retinoic acid decrease IGF-I/IGFBP-3 molar ratio by *increasing* the serum level of IGFBP-3 and *increase* nerve capillary density by *improvement* of the tissue hypoxia and hypoperfusion. This effect suggest that 13-*cis* retinoic acid can delay the progresison of diabetic neuropathy.

Key Words: Diabetic neuropathy, RAR(*retinoic acid* receptor) agonist, 13-*cis*-*retinoic acid*, IGF-I/IGFBP-3 molar ratio, Nerve capillary density