

허혈 및 재관류된 흰쥐의 앞정강근에서 주령에 따라 나타나는 Bcl-2, Bax 분포와 세포사멸에 관한 연구

서윤경, 김종현¹, 임현성, 신채수, 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ¹한양대학교 의과대학 정형외과학교실

간추림 : 장기간의 허혈 및 재관류는 뼈대근육에서 세포손상과 세포사멸을 일으키며, 이때 나타나는 손상과 세포사멸은 주로 재관류에 여러 신호전달체계가 활성화되어 일어나게 된다. Bcl-2와 Bax는 세포사멸을 조절하는 주요한 단백질로, Bcl-2는 세포사멸을 억제하고 Bax는 촉진하는 것으로 알려져 있다.

이에 본 연구자들은 흰쥐의 앞정강근을 허혈시켰을 때 나타나는 Bcl-2와 Bax의 면역반응과 세포사멸을 주령에 따라 관찰하고자 본 실험을 시행하였다.

실험동물은 9주령, 30주령 및 65주령 이상의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였고, 정상대조군과 4시간 허혈군으로 나누어, 재관류 0, 3 및 24시간 경과 후 원앞정강근을 적출하여 Bcl-2와 Bax의 면역염색을 하였고, TUNEL 방법으로 세포사멸을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군의 9주령에서 Bcl-2와 Bax 면역반응은 미약한 양성, 30주령의 Bcl-2와 Bax 면역반응은 미약한 또는 정도의 양성반응으로 9주령에 비해 증가하였으며, 65주령의 경우 Bcl-2 면역반응은 미약한 양성 또는 음성반응으로 감소하였고, Bax 면역반응은 미약한 또는 정도의 양성반응으로 증가되었다. 나이에 따른 세포사멸은 변화가 없었다.
2. Bax의 분포 변동과 세포사멸 사이에서 비례관계를 관찰하였다.
3. 허혈 후 재관류시 나이가 들에 따라 세포사멸이 증가하였다.

이상의 결과에서, 허혈 및 재관류시 앞정강근에서 일어나는 세포사멸은 나이가 들에 따라서 증가하는 것을 알 수 있었고, 세포사멸의 증가와 Bax의 증가는 비례관계에 있음을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 허혈, 앞정강근, Bcl-2, Bax, 세포사멸

서 론

뼈대근육의 허혈 및 재관류는 세포손상과 부종, 혈관손상을 일으킨다. 이러한 손상의 원인으로는 세포내 자유산소기발생, 에너지고갈, 백혈구침착, 칼슘 과축적 등이 제기되고 있다 (Pang 등 1993).

자유산소기 (oxygen free radical)는 주로 허혈 및 재관류시 생성되어 (Baxter 등 1995) 이온통로 (ion channel) 이동, 막전위 (membrane depolarization), 신호전달체계 (signal transduction)에 영향을 주어 세

포괴사와 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Piper 등 1996).

세포사멸 (apoptosis)은 정상발달과정이나 노화과정에서 염증반응없이 세포를 제거하는 기전으로, 활성산소기 (reactive oxygen species)에 의해 세포내 자극이 있는 경우 cytochrome c 의존경로 (cytochrome c-dependent pathway)를 통해 일어난다 (Cook 등 1999, Daugas 등 2000). Cytochrome c의 유리는 세포사멸에서 중심이 되는 단계로, Bcl-2계 단백질에 의해서 조절된다. Bcl-2계 단백질은 세포사멸억제인자인 Bcl-2, Bcl-xL 등과 세포사멸촉진인자인 Bax, Bad 등으로 구성되어있다 (Rossé 등 1998,

교신저자: 백두진 (한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)
전자우편: paikdj@hanyang.ac.kr

Tsujimoto와 Shimizu, 2000).

이에 저자들은 허혈 및 재관류시 흰쥐에서 앞정강근(tibialis anterior muscle)에서 주령에 따라 나타나는 Bcl-2, Bax의 발현과 세포사멸을 관찰하기 위하여 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 9주령 (9주군), 30주령 (30주군) 및 65주령 이상 (65주군)의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 정상대조군과 4시간 허혈군으로 나누고, 재관류 경과시간에 따라서 0시간, 3시간 및 24시간 경과군으로 세분하였으며, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험처치

실험동물은 urethane (1.15 g/kg)을 생리식염수에 희석하여 2회 복강주사하여 마취시킨 후 실험을 실시하였다. 허혈은 개복 후 흰쥐용 혈관집계를 사용하여 왼은엉덩동맥(left common iliac artery)을 4시간 폐색하였다. 허혈 후 혈관집계를 제거하여 재관류시켰으며, 재관류후 0시간, 3시간 및 24시간 뒤에 실험동물을 희생시켜 왼쪽 앞정강근을 적출하였다. 65주군의 경우 24시간 이상의 마취를 견디지 못하고 죽어서 재관류 후 18시간에 실험동물을 희생시켜 24시간군으로 대체하였다. 재관류 후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰다. 마취된 실험동물은 처치 후 혹은 허혈기간 및 재관류시 백열전등을 이용하여 체온을 유지시켰다.

적출한 근육은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 24시간 이내로 고정시킨 후 6 μ m두께의 파라핀절편을 제작하였다.

3. Bcl-2 및 Bax 면역조직화학염색

Bcl-2 및 Bax의 분포를 관찰하기위해 제작한 파라핀절편을 탈파라핀 및 함수시킨 뒤 phosphate

buffered saline (PBS, pH 7.4)용액에 세척하고 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액에 5분간 반응시킨 다음 실온에서 0.4% pepsin을 8분간 처리하였다. Blocking 용액을 37°C에서 1시간 처리한 뒤, 일차항체 rabbit anti-human Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1 : 200, rabbit anti-mouse Bax (Santa Cruz, USA)를 1 : 100으로 희석하여 4°C에서 12시간 반응시켰으며, 2차항체 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector lab., USA)를 실온에서 40분간 반응시킨 후 ABC (Vector, USA)용액을 실온에서 30분간 적용하였다. DAB (Vector, USA) 시료를 이용하여 7분간 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

일차항체의 분별력있는 농도를 알아보기 위하여 Bcl-2를 1 : 30, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200으로 희석하여 염색을 시행한 결과 1 : 200에서 의미있는 반응을 나타내었고, Bax는 1 : 30, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200으로 희석하여 염색을 시행한 결과 1 : 100에서 의미있는 반응을 나타내었다. 면역조직반응이 확실한지 확인하기 위하여 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다. 각 군의 근육을 $\times 400$ 로 관찰하여 사진촬영하여 분석하였고, 면역반응의

Table 1. Immunoreactivities of Bcl-2 in the ischemic reperfused tibialis anterior muscles of the rat

Age (weeks)	Normal control	Ischemia for 4 h and reperfusion (h)		
		0	3	24 (18)
9	±	±, +	++	+, ++
35	±, +	+	++, +++	±
65	±, -	+, ++	+	±

± : trace, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong.

Table 2. Immunoreactivities of Bax in the ischemic reperfused tibialis anterior muscles of the rat

Age (weeks)	Normal control	Ischemia for 4 h and reperfusion (h)		
		0	3	24 (18)
9	±	+, ++	+++, +++	+, ++
35	±, +	+	++	±
65	±, +	+++, +	++	±

± : trace, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong.

Table 3. Number of apoptotic nuclei in the ischemic reperfused tibialis anterior muscles of the rat

Age (weeks)	Normal control	Ischemia for 4 h and reperfusion (h)		
		0	3	24 (18)
9	0	0	1	0
35	0	1	7	4
65	0	3	11	4

크기와 정도를 음성반응(-), 미약한 양성반응(±), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++)과 강한 양성반응(+++)으로 구분하였으며, Table 1, 2에 요약하였다.

4. 세포사멸 분석

세포사멸은 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated nick labeling) 분석원리를 이용한 ApopTag kit (Intergen Co., USA)를 사용하였다. 탈파라핀 및 함수과정을 거친 뒤 proteinase K (DAKO Co., USA)를 실온에서 15분, 3% 과산화수소를 5분간 처리하였다. TdT를 이용하여 digoxigenin을 분절된 DNA 가닥의 3'-OH말단에 부착하는 과정을 37°C에서 1시간 시행하였고 이어서 stop-wash buffer를 10분간 적용하였다. Peroxidase가 부착된 anti-digoxigenin 항체를 실온에서 30분 적용한 후에 DAB (Vector, USA)를 이용하여 7분간 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색을 실시하여 광학현미경으로 핵이 갈색으로 염색된 세포사멸 양성반응 세포를 관찰하였다. 각 군의 대표적인 사진 10장을 선택하여 세포사멸 양성반응을 나타내는 핵의 수를 세어서 평균을 내었고, Table 3에 요약하였다.

결 과

1. Bcl-2 면역반응

1) 9주군의 정상대조군은 미약한 양성반응(±)을 나타내었으며 (Fig. 1), 허혈 후 재관류 0시간에 미약한 양성(±) 또는 경도의 양성반응(+)으로 (Fig.

2), 3시간에 중등도의 양성반응(++)으로 (Fig. 3), 24시간에 경도(+) 또는 중등도의 양성반응(++)으로 관찰되었다 (Fig. 4).

2) 30주군의 정상대조군은 미약한(±) 또는 경도의 양성반응(+)을 나타내었고 (Fig. 5), 허혈 후 재관류 0시간에 경도의 양성반응(+)으로 (Fig. 6), 3시간에는 중등도의 양성(++) 또는 강한 양성반응(+++)으로 (Fig. 7), 24시간에 미약한 양성반응(±)으로 관찰되었다 (Fig. 8).

3) 65주군의 정상대조군은 미약한 양성(±) 또는 음성(-)으로 (Fig. 9), 허혈 후 재관류 0시간에 경도의 양성(+) 또는 중등도 양성반응(++)으로 (Fig. 10), 3시간에는 경도의 양성(+)으로 (Fig. 11), 18시간에는 미약한 양성반응(±)으로 관찰되었다 (Fig. 12).

2. Bax 면역염색

1) 9주군의 정상대조군은 미약한 양성반응(±) (Fig. 13), 허혈 후 재관류 0시간에는 경도(+) 또는 중등도의 양성반응(++)으로 (Fig. 14), 3시간에 강한 양성(+++) 또는 중등도의 양성반응(++)으로 (Fig. 15), 24시간에는 경도의 양성(+) 또는 중등도 양성반응(++)으로 관찰되었다 (Fig. 16).

2) 30주군의 정상대조군은 미약한(±) 또는 경도의 양성반응(+)을 나타내었고 (Fig. 17), 허혈 후 재관류 0시간에 경도의 양성반응(+)으로 (Fig. 18), 3시간에는 중등도의 양성반응(++)으로 (Fig. 19), 24시간에는 미약한 양성반응(±)으로 관찰되었다 (Fig. 20).

3) 65주군의 정상대조군은 미약한(±) 또는 경도의 양성반응(+)을 나타내었고 (Fig. 21), 허혈 후 재관류 0과 3시간에는 중등도(++) 또는 경도의 양성반응(+)으로 (Figs. 22, 23), 18시간에는 미약한 양성반응(±)으로 관찰되었다 (Fig. 24).

3. 세포사멸

1) 9주군의 정상대조군과 허혈 후 재관류 0시간에는 세포사멸 양성반응세포는 관찰되지 않았으며 (Figs. 25, 26), 3시간에는 1개 (Fig. 27), 24시간에는

0개가 관찰되었다(Fig. 28).

2) 30주군의 정상대조군은 세포사멸 양성반응세포는 관찰되지 않았다(Fig. 29). 허혈 후 재관류 0시간에 1개(Fig. 30), 3시간에 7개(Fig. 31), 24시간에 4개가 관찰되었다(Fig. 32).

3) 65주군의 정상대조군에서 세포사멸 양성세포는 관찰되지 않았다(Fig. 33). 허혈 후 재관류 0시간에 3개(Fig. 34), 3시간에 11개(Fig. 35), 18시간에 4개가 관찰되었다(Fig. 36).

4. 음성대조군

일차항체를 적용하지 않고 반응을 시킨 정상대조군의 Bcl-2와 Bax의 면역반응은 음성 반응(-)으로 관찰되었고(Figs. 37, 38), 세포사멸 양성세포는 관찰되지 않았다(Fig. 39).

고찰

노화가 진행되면서 일어나는 세포의 변화는 조직의 종류에 따라 다르다고 알려져 있다. 뼈대근육은 노화가 되면서 운동신경세포(motor neuron)의 감소, 호르몬의 변화, 세포사멸 등에 의해서 근육양이 감소되며(Holloszy 등 1991), 세포사멸은 뼈대근육의 노화에 주된 역할을 하고 있다(Cai 등 1998).

세포사멸은 각각의 자극에 특이적인 신호전달경로를 통해 활성화되지만, 이는 결국 death protein이라 불리는 caspase를 활성화시키는 단계로 집중되며, caspase 활성을 조절하는 몇가지 유전자중 가장 특징적인 것은 Bcl-2계 단백질(Bcl-2 family protein)이다(Alnemri 등 1996). Bcl-2계 단백질은 세포사멸 억제인자(anti-apoptotic member)와 촉진인자(pro-apoptotic member)로 이루어져 있는데(Tsujimoto 1998), 살아있는 세포에서는 주로 억제인자가 사립체에서 cytochrome c 유리를 막고 있으며, 세포사멸 촉진인자가 활성화되면 세포사멸이 일어난다(Zha 등 1996).

Bcl-2는 세포사멸 억제인자로 주로 사립체의 바깥막(outer mitochondrial membrane)에 위치하고 있으며 cytochrome c의 유리를 방해하고, Bax는 세포

사멸 촉진인자로 대부분 세포질에 위치하고 있다. 활성화되면 사립체로 이동한다(Adams와 Cory 1998). 일단 Bax가 사립체로 이동하면 사립체에서 세포질로 cytochrome c를 유리되고 세포사멸이 일어나게 된다(Srinivasula 등 1998, Liu 등 1998).

Bcl-2계 단백질의 세포사멸 억제인자와 촉진인자는 heterodimer를 형성하여 서로의 활성을 억제시키고, 다른 사립체 단백질과 상호작용하여 사립체의 변화를 조절한다고 생각되어지고 있다(Tsujimoto와 Shimizu, 2000). Hockenbery 등(1993)은 세포사멸 촉진인자인 Bad가 Bcl-2와 결합을 하면, Bax는 homodimer를 형성하게 되어 세포사멸을 촉진시키고, Bad와 Bcl-2의 결합이 일어나지 않으면, Bcl-2와 Bax가 결합되어 세포사멸이 억제된다고 하였다. 이러한 Bcl-2와 Bax의 이형이합체형성(heterodimerization)은 DNA 분절(fragmentation)을 감소시킬 수 있다고 하였으며, 이형이합체형성은 Bcl-2와 Bax의 비율의존 방식에 의해서 일어난다고 하였다. Misao 등(1996)도 Bcl-2계 단백질의 세포사멸 촉진인자와 억제인자의 절대치가 세포죽음에 직접적인 영향을 주는 것이 아니라 이 둘의 비율이 세포의 운명을 결정한다고 하였다. Azhar 등(1999b) 역시 억제인자와 촉진인자의 비율에 의해 세포운명이 결정된다고 하였으나, Bad의 높은 발현과 같은 다른 요소도 배제하지는 않았다.

이처럼 Bcl-2계 단백질이 세포사멸을 조절하는 방식에 대해서는 여러 이론들이 제기되고 있으나 아직까지는 그 방식이 명확히 밝혀지지 않고 있다. 최근에는 많은 연구자들이 노화와 관련하여 Bcl-2계 단백질을 연구하고 있으며, 허혈시 일어나는 세포사멸과 Bcl-2계 단백질의 관계에도 관심을 두고 있다.

본 실험에서는 흰쥐의 앞정강근에서 허혈 및 재관류시 나타나는 Bcl-2와 Bax의 면역반응과 세포사멸을 주령에 따라서 비교관찰하였다.

Centurione 등(2002)은 22~24개월과 4~6개월된 흰쥐의 심장에서 일어나는 세포사멸은 차이가 없었고, Bcl-2와 Bax는 22~24개월된 흰쥐군에서 증가되었다고 하였으나, Azhar 등(1999b)은 흰쥐의 심장이나 뇌에서 Bcl-2와 Bcl-xL이 4~6개월군이

나 22~24개월군에서 비슷하다고 하였다. 본 실험에서는 주령에 따른 세포사멸은 차이가 없었고, 65주령군의 경우 9개월군에 비해 Bax는 증가하였으나 Bcl-2는 비슷하거나 감소하였다.

Liu 등(1998)은 흰쥐의 심장에서 관상동맥 폐색 후 Bax가 증가된다고 하였고, Fortuno 등(1998)은 원발성고혈압 흰쥐의 심장에서 Bax가 증가된다고 하였고, 이들은 정상보다 증가된 Bax의 발현이 세포사멸과 관련이 있다고 주장하였다. 또한 Misao 등(1996)과 Murohara 등(1995)은 심장에서 허혈 후 일어나는 세포사멸이 노화군에서 더 빨리 시작되며, Bcl-2와 Bax 비율은 노화군에서 더 높다고 하였다. 이들은 Bax가 노화군에서 더 많이 나타나는 것은, 만성적으로 스트레스(stress)를 받고 있기 때문이라고 하였으며, 이런 이유 때문에 허혈 후 3시간에 젊은군 보다 빨리 세포사멸이 시작된다고 하였다. 본 실험에서 세포사멸의 증가 또는 감소는 Bax 면역반응이 증가 또는 감소하는 경향과 일치함을 관찰할 수 있었고, 모든 주령군에서 재관류 3시간에 세포사멸이 가장 많이 관찰되었고, 24시간에 감소하는 경향을 나타내었다. 재관류 0시간에 65주군의 Bcl-2 면역반응이 다른 군보다 높게 나타났음에도 불구하고 세포사멸이 더 많이 관찰된 것은 Bax 면역반응이 다른 주령군에 비해서 높았기 때문이라고 생각할 수 있었다.

Azhar 등(1999b)과 Centurione 등(2002)은 흰쥐의 심장을 허혈 후 재관류시키면 나이가 들에 따라 세포사멸이 증가된다고 하였고, Azhar 등(1999a) 역시 노화된 22~24개월과 6~8개월된 생쥐의 심장에서 세포사멸의 차이는 없다고 하였으나, 허혈 및 재관류시에는 노화된 심장에서 세포사멸이 증가된다고 하였다. Azhar 등(1999b)은 노화군에서 비록 Bcl-2 발현이 높게 나타나지만 허혈 후 세포사멸이 많이 일어난다고 하였는데, 이는 Bax의 발현이 나이가 들에 따라 증가되며, 젊은군에 비해서 자극에 대한 역치(threshold)가 낮아져 더 손상받기 쉽기 때문이라고 하였다(Azhar 등 1999b, Liu 등 1998). 또한 허혈시 노화군에서 더 많은 세포사멸이 일어나는 것은 나이가 들에 따라 세포내 여러 효소의 양과 그 활성이 낮아지고(Bak 등 1998), 사

립체 수가 감소하며(Conley 등 2000), 항상성 유지 기전이 효과적이지 못하고, 자극에 쉽게 손상을 받는 상태가 되기 때문이라 하였다(Azhar 등 1999b). 본 실험에서는 허혈 후 일어나는 세포사멸은 나이가 들에 따라 증가됨을 알 수 있었으며, 정상대조군이나 허혈군에서 Bcl-2가 9주군이나 30주군에 비해 65주군에서 낮게 관찰된 것도 세포사멸 증가에 영향을 줄 수 있다고 생각하였다.

이상의 결과에서, 허혈 및 재관류시 앞정강근에서 일어나는 세포사멸은 나이가 들에 따라서 증가한다는 것을 알 수 있었으며, 세포사멸의 증가와 Bax의 증가는 비례한다고 생각할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Adams JM, Cory S : The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 : 1322-1326, 1998.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 : 171, 1996.
- Azhar G, Gao W, Liu L, Wei JY : Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart influence of age. *Exp Gerontol* 34 : 699-714, 1999a.
- Azhar G, Liu L, Zhang X, Wei JY : Influence of age on hypoxia/reoxygenation-induced DNA fragmentation and bcl-2, bcl-xl, bax and fas in the rat heart and brain. *Mech Ageing Dev* 112 : 5-25, 1999b.
- Bak MI, Wei JY, Ingwall JS : Interaction of hypoxia and aging in the heart: analysis of high energy phosphate content. *J Mol Cell Cardiol* 30 : 661-672, 1998.
- Baxter GF, Goma FM, Yellon DM : Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 115 : 222-224, 1995.
- Cai J, Yang J, Jones DP : Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366 : 139-149, 1998.
- Centurione L, Antonucci A, Miscia S, Grilli A, Rapino M, Grifone G, Di Giacomo V, Di Giulio C, Falconi M, Cataldi A : Age-related death-survival balance in myocardium: an immunohistochemical and biochemical study. *Mech Ageing Dev* 123 : 341-350, 2002.

- Conley KE, Jubrias SA, Esselman PC : Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J Physiol* 526 : 203-210, 2000.
- Cook SA, Sugden PH, Clerk A : Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res* 85 : 940-949, 1999.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G : Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14 : 729-739, 2000.
- Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J : Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension* 32 : 280-286, 1998.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 : 241-251, 1993.
- Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC : Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing* 60 : 199-213, 1991.
- Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei JY : Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol* 275 : R315-322, 1998.
- Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H : Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 94 : 1506-1512, 1996.
- Murohara T, Guo JP, Lefer AM : Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 274 : 1246-1253, 1995.
- Pang CY, Forrest CR, Mounsey R : Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery* 14 : 176-182, 1993.
- Piper HM, Balsler C, Ladilov YV, Schafer M, Siegmund B, Ruiz-Mean M, Garcia-Dorado D : The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 91 : 191-202, 1996.
- Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C : Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* Jan 29 : 496-499, 1998.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES : Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1 : 949-957, 1998.
- Tsujimoto Y, Shimizu S : Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS letters* 466 : 6-10, 2000.
- Tsujimoto Y : Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes Cells* 3 : 697-707, 1998.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ : Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X (L). *Cell* 87 : 619-628, 1996.

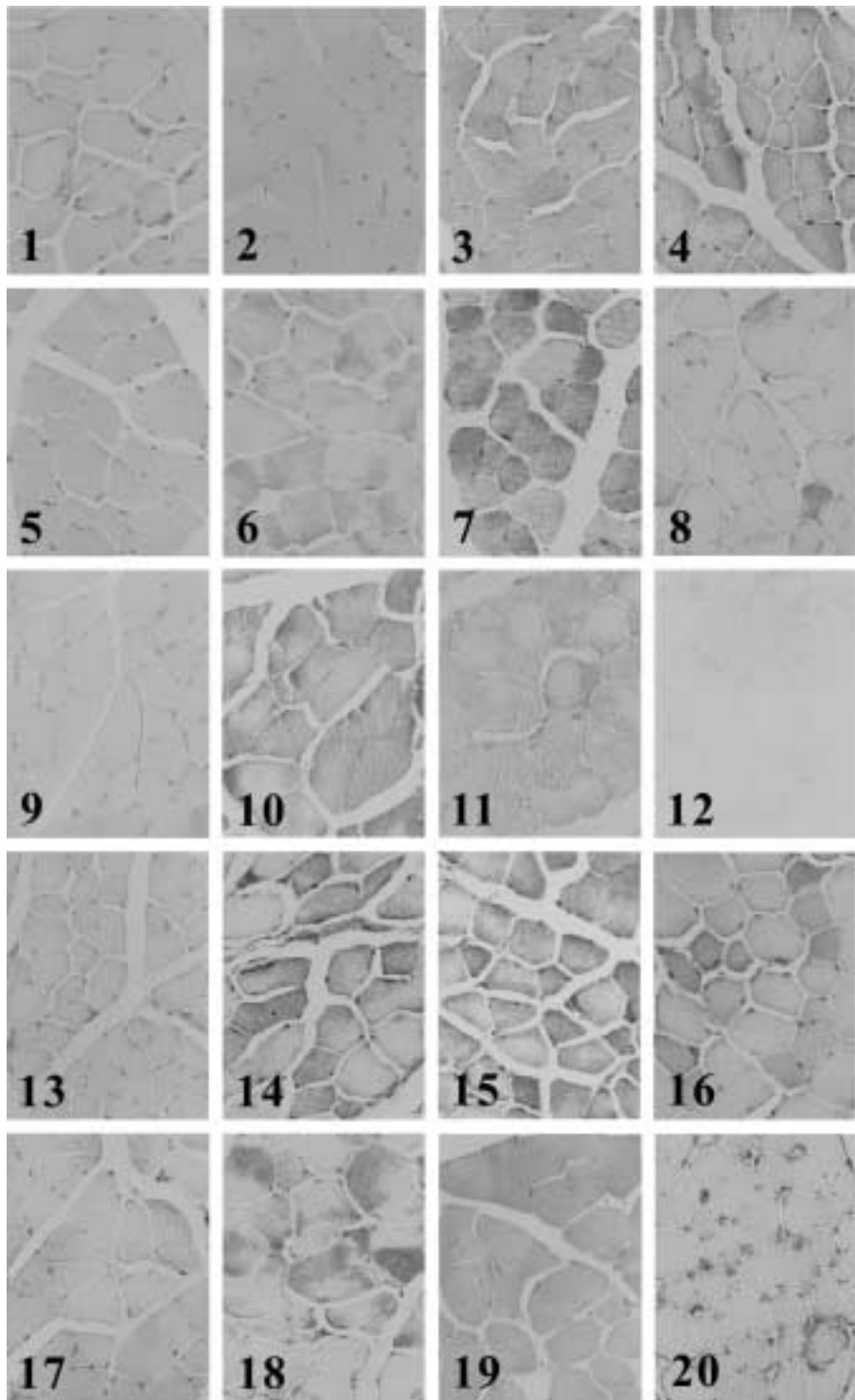
Legends for Figures

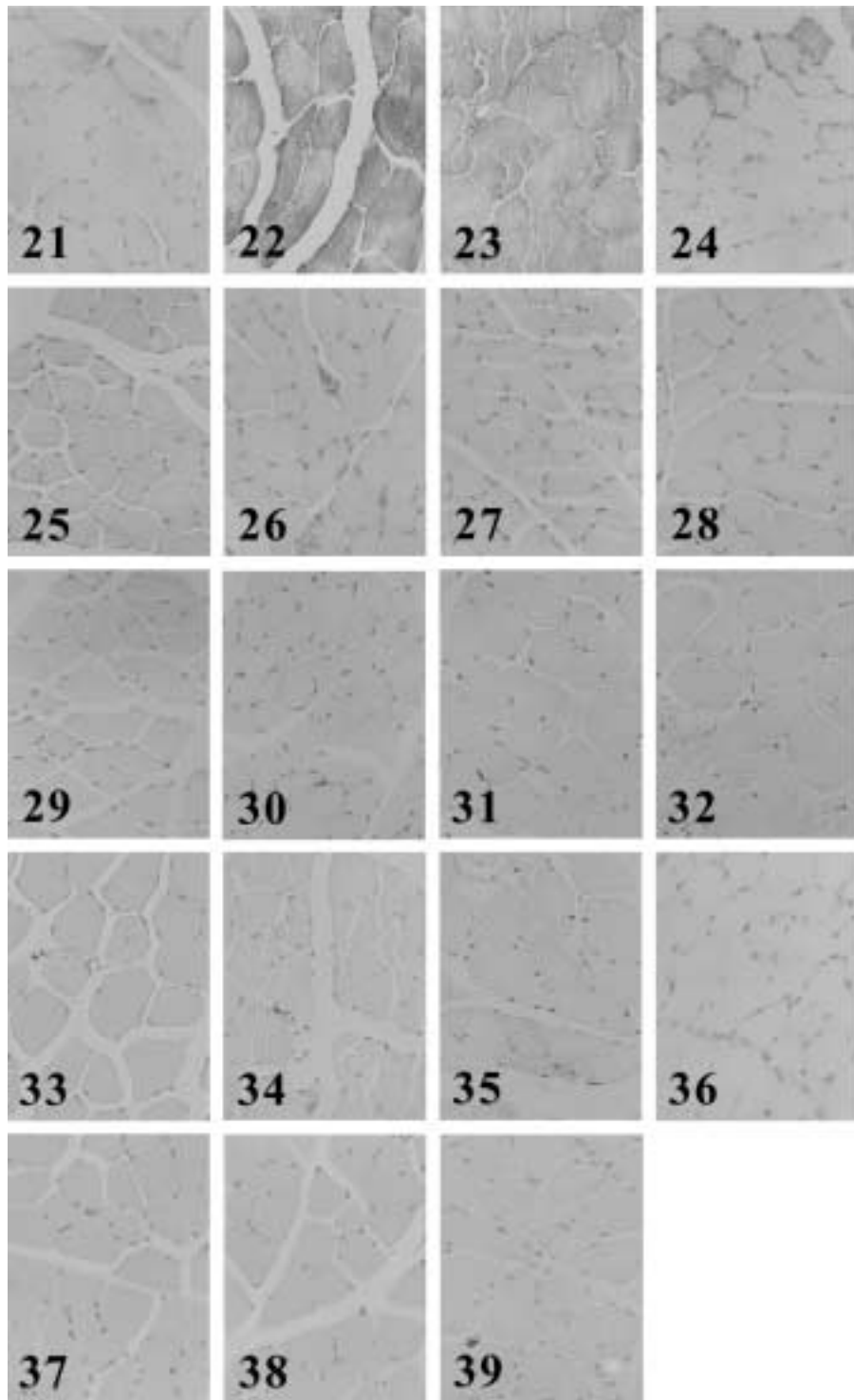
- Fig. 1.** Bcl-2 immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 2.** Bcl-2 immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 3.** Bcl-2 immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 4.** Bcl-2 immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 5.** Bcl-2 immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 6.** Bcl-2 immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 7.** Bcl-2 immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Moderate or strong immunoreactivities are observed.
- Fig. 8.** Bcl-2 immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 9.** Bcl-2 immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace or negative immunoreactivities are observed.
- Fig. 10.** Bcl-2 immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 11.** Bcl-2 immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 12.** Bcl-2 immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle 18 hours reperfusion after ischemia. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 13.** Bax immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 14.** Bax immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 15.** Bax immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Strong or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 16.** Bax immunoreactivities on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 17.** Bax immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 18.** Bax immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 19.** Bax immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 20.** Bax immunoreactivities on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 21.** Bax immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 22.** Bax immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Moderate or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 23.** Bax immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior m. 3 hours reperfusion after ischemia. Moderate or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 24.** Bax immunoreactivities on 65 wks old rat tibialis anterior muscle 18 hours reperfusion after ischemia. Weak or trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 25.** Apoptotic reactions on 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no apoptotic nuclei.
- Fig. 26.** Apoptotic reactions on 9 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. There are no apoptotic nuclei.
- Fig. 27.** Apoptotic reactions on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. An apoptotic nucleus is observed.
- Fig. 28.** Apoptotic reactions on 9 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. There are no apoptotic nuclei.
- Fig. 29.** Apoptotic reactions on 30 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no apoptotic nuclei.
- Fig. 30.** Apoptotic reactions on 30 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. An apoptotic nucleus is observed.
- Fig. 31.** Apoptotic reactions on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Seven apoptotic nuclei are observed.

- Fig. 32.** Apoptotic reactions on 30 wks old rat tibialis anterior muscle 24 hours reperfusion after ischemia. Four apoptotic nuclei are observed.
- Fig. 33.** Apoptotic reactions on 65 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no apoptotic nuclei.
- Fig. 34.** Apoptotic reactions on 65 wks old rat tibialis anterior muscle after ischemia. Three apoptotic nuclei are observed.
- Fig. 35.** Apoptotic reactions on 65 wks old rat tibialis anterior muscle 3 hours reperfusion after ischemia. Eleven apoptotic nuclei are observed.
- Fig. 36.** Apoptotic reactions on 65 wks old rat tibialis anterior muscle 18 hours reperfusion after ischemia. Four apoptotic nuclei are observed.
- Fig. 37.** Bcl-2 immunoreactivities on cross section of 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no reactivities on the muscle fiber in negative stain.
- Fig. 38.** Bax immunoreactivities on cross section of 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no reactivities on the muscle fiber in negative stain.
- Fig. 39.** Apoptotic reactions on cross section of 9 wks old rat tibialis anterior muscle in the control group. There are no apoptotic nuclei in negative stain.

K C I

— 허혈 및 재관류 후 주령에 따른 앞정강근의 변화 —





Abstract

Age-related Alterations of Bcl-2, Bax and Apoptosis in Ischemic-reperfused Rat Tibialis Anterior Muscles

Youn-Kyoung Seo, Jong-Heon Kim¹, Hyun-Sung Leem,
Chae-Soo Shin, Doo-Jin Paik

Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University

¹*Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea*

Prolonged ischemic-reperfusion induces cellular damages and apoptosis in rat skeletal muscle. Such injury takes place in the phase of reperfusion following ischemia induction in part via regulating of apoptosis-related gene inductions.

Among apoptosis-related gene products, Bcl-2 and Bax regulate the apoptotic response by inhibiting and promoting cell death, respectively.

The present study was performed to examine the age-related alteration of expression of Bcl-2 and Bax along with apoptosis in rat tibialis anterior muscles following ischemia-reperfusion.

9 weeks, 30 weeks and more than 65 weeks old male Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups such as controls, 4 hour ischemia. 4 hour ischemia group was divided into 3 subgroups based on reperfusion time. For ischemia, left common iliac artery was occluded for 4 hours. The tibialis anterior muscles were removed 0, 3, and 24 hours after onset of reperfusion. Muscle samples were embedded in paraffin and 6 μm sections were made. The expression level of Bcl-2 and Bax were examined using immunohistochemical methods and apoptotic reactions was detected using TUNEL methods.

The results obtained were as follows;

1. In control group, Bcl-2 and Bax were weakly immunostained in 9 weeks old rat tibialis anterior muscles. In 30 and 65 weeks old rat tibialis anterior muscles, Bcl-2 immunostaining was minimal. The level of Bax staining was increased in 30 and 65 weeks old rat tibialis anterior muscles, compared with those of 9 weeks old rats. The level of apoptosis among different age groups were not altered.
2. In the 4 hour ischemia group, the level of Bax staining was correlated with the level of apoptosis in 9 weeks, 30 weeks and 65 weeks old rat tibialis anterior muscles.
3. The level of apoptosis was increased in older groups relative to younger groups in 4 hour ischemia.

These results suggested that the level of apoptosis induced by ischemic-reperfusion in tibialis anterior muscle increase with ageing in rat tibialis anterior muscles, and that a increase of Bax expression is related to increased apoptosis.

Key words : Ischemia, Tibialis anterior muscle, Bcl-2, Bax, Apoptosis