

허혈과 재관류된 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 주령에 따라 나타나는 세포자멸사에 관한 연구

서윤경, 신채수, 김종현¹, 유영준², 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ¹한양대학교 의과대학 정형외과학교실

²인제대학교 의과대학 성형외과학교실

간추림 : 장기간의 허혈과 재관류는 뼈대근육에서 세포손상과 세포자멸사를 일으킬 수 있다. 이러한 허혈손상은 주로 재관류될 때 일어나며, 이때 여러 신호전달체계가 활성화되어 세포자멸사가 일어나게 된다.

이에 본 연구자들은 허혈과 재관류시킨 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 나타나는 세포자멸사를 주령에 따라 관찰하고자 이 실험을 실시하였다.

실험동물은 9주령, 30주령 및 65주령의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였고, 정상대조군과 허혈군으로 나누었다. 허혈은 왼은엉덩동맥을 혈관집게로 4시간 폐색하여 실행하였으며, 재관류 경과시간에 따라 0, 3 및 24시간 뒤에 실험동물을 희생시켰다. 왼앞정강근과 왼가자미근을 적출하여 6 μ m 두께의 파라핀절편을 제작하고 TUNEL 방법으로 세포자멸사를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군에서 관찰된 세포자멸사는 모든 주령에서 유사하였다.
2. 허혈군에서 관찰된 세포자멸사는 재관류 3시간 경과시 증가하였다가 24시간 경과시 감소하였다.
3. 허혈군의 앞정강근과 가자미근에서 관찰된 세포자멸사는 주령이 증가함에 따라 증가하였다.
4. 허혈군에서 관찰된 세포자멸사는 가자미근보다 앞정강근에서 더 많았다.

이상의 결과로 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 주령이 증가할수록 증가됨을 알 수 있었으며, 앞정강근이 가자미근보다 허혈손상에 더 민감한 것으로 결론 지을 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 허혈, 앞정강근, 가자미근, 세포자멸사

서 론

뼈대근육은 허혈에 대하여 비교적 내성이 있는 조직으로 알려져 있으나, 오랜 시간의 허혈에는 비가역적으로 손상될 수 있다(Idström 등 1990). 허혈과 재관류시 나타나는 자유산소기, 에너지 고갈현상, 백혈구 침윤, 칼슘 과축적 등에 의해서 근육세포와 모세혈관의 손상과 염증반응 등이 생기며(Pang 등 1993), 이러한 손상들은 주로 허혈뒤 재관류 초기에 발생하는 것으로 알려져 있다(Lipton 1999).

허혈뒤 재관류시에 생성된 자유산소기(oxygen

free radical)는 이온통로(ion channel) 이동과 막전위(membrane potential) 등에 영향을 주고, 세포의 신호전달체계(signal transduction)를 활성화시켜 여러 유전자의 발현을 유도하며, 세포자멸사(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)를 일으킨다(Baxter 등 1995, Piper 등 1996). 세포자멸사는 정상 발달과정이나 노화과정에서 염증반응 없이 세포를 제거하는 기전으로, 허혈 및 재관류시에 손상된 뼈대근육세포의 처리에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Cook 등 1999, Daugas 등 2000).

대부분의 뼈대근육은 백색근육섬유(white muscle fiber)와 적색근육섬유(red muscle fiber), 그리고 중간형근육섬유(intermediated muscle fiber)가 어우러

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

진 혼합섬유형태로 구성되어 있으며, 뼈대근육섬유는 종류에 따라 에너지를 얻는 방법과 혈관의 분포 등 생리적 특성에 차이가 있다(Lindsay 등 1990). 이러한 섬유의 특성 때문에 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 섬유의 종류에 따라 차이가 있다고 알려져 있다. 그러나 뼈대근육 종류에 따른 허혈손상은 연구자들에 따라 의견을 달리 하고 있다(Gardner 등 1984, Cavalho 등 1997).

허혈손상에 관한 연구는 주로 심장근육을 이용하여 진행되고 있으며, 이에 비해 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 최근에서야 관심의 대상이 되기 시작했다.

이에 저자들은 흰쥐에서 허혈 및 재관류시 백색 근육섬유가 85% 차지하는 앞정강근(tibialis anterior muscle)과 적색근육섬유로만 구성된 가자미근(soleus muscle)에서(Amstrong과 Phelps, 1984) 일어나는 세포자멸사를 주령에 따라 관찰하기 위하여 이 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 9주령과 30주령 그리고 65주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 아무런 처지를 하지 않은 정상대조군과 허혈군으로 나누었고, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다. 허혈군은 허혈후 재관류 경과시간에 따라 0시간, 3시간 및 24시간군으로 세분하였다.

2. 실험처치

생리식염수에 희석한 우레탄(urethane, 1.15 g/kg)을 2회 복강주사하여 실험동물을 마취시킨 후 시술하였다. 허혈은 흰쥐용 혈관집게를 사용하여 왼은영덩동맥(left common iliac artery)을 4시간 동안 폐색하였다. 허혈 후 혈관집게를 제거하여 재관류 0시간, 3시간과 24시간 경과후에 실험동물을 희생시켜 왼가자미근과 왼앞정강근을 적출하였다. 실험기간 동안 백열전등을 이용하여 실험동물의 체온을 유지시켰으며, 재관류 후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰다. 65주령의 경우 24시간 이상의 마취를 견디지 못하고 죽어서 재관류 후 18시간에 실험동물을 희생시켜 24시간군으로 대체하였다.

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

3. 세포자멸사 분석

세포자멸사는 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated nick labeling) 원리를 이용한 ApopTag kit (Intergen Co., USA)를 사용하여 관찰하였다. 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

Table 1. Number of apoptotic nuclei in the rat tibialis anterior (TA) and soleus muscles (Sol) of the control and ischemia groups (Mean \pm S.D.)

Age	Skeletal muscle	Normal control	Reperfusion time after 4 h ischemia		
			0h	3h	24 (18)h
9 weeks	TA	0.0 \pm 0.00	0.4 \pm 0.70	3.9 \pm 4.58	1.9 \pm 1.66
	Sol	0.3 \pm 0.48	0.3 \pm 0.48	3.5 \pm 3.60	1.5 \pm 2.22
30 weeks	TA	0.8 \pm 1.03	0.9 \pm 1.20	11.1 \pm 7.55	6.4 \pm 5.67
	Sol	0.8 \pm 0.92	1.3 \pm 1.25	6.0 \pm 3.65	5.5 \pm 3.69
65 weeks	TA	1.1 \pm 1.29	3.3 \pm 2.58	13.7 \pm 6.65	7.7 \pm 5.40
	Sol	0.9 \pm 1.10	2.4 \pm 2.50	7.4 \pm 2.55	6.5 \pm 2.95

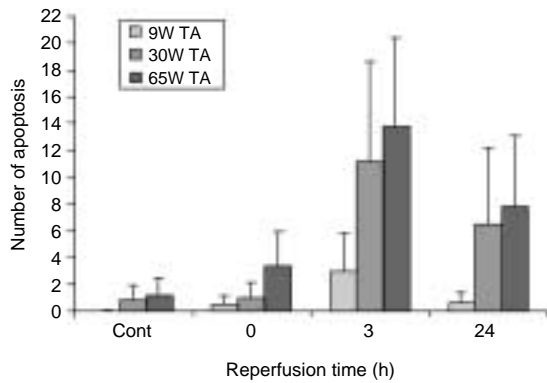


Fig. 1. Number of apoptotic nuclei in the rat tibialis anterior muscles (TA) of the control (Cont) and 4 hour ischemia groups.

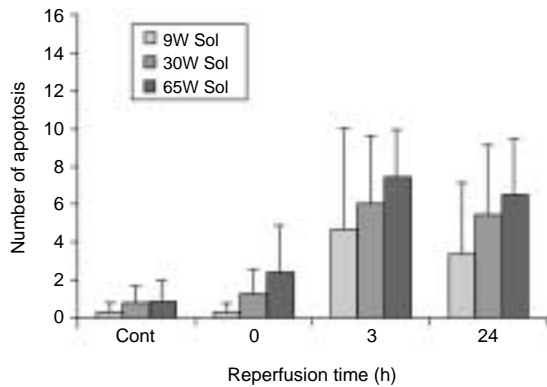


Fig. 2. Number of apoptotic nuclei in the rat soleus muscles (Sol) of the control (Cont) and 4 hour ischemia groups.

30분간 적용한 후에 DAB (Vector Lab., USA)를 이용하여 7분간 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색을 실시하였다. 광학현미경을 이용하여 핵이 갈색으로 염색된 세포자멸사 양성반응세포를 관찰하였다. TdT를 제외한 반응액을 이용하여 음성대조군의 염색을 시행하였고, 흰쥐의 작은창자 조직을 이용하여 양성대조군의 염색을 시행하여 세포자멸사 반응의 특이성을 확인하였다. 각 군에서 대표적인 사진 10장을 선택하여 세포자멸사 양성반응을 나타내는 핵의 수를 세어 평균과 표준편차를

구하여 그 결과를 Table 1과 Fig. 1 그리고 Fig. 2에 요약하였다.

결 과

1. 앞정강근

1) 9주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 관찰되지 않았다 (Fig. 3A). 재관류 직후에는 0.4 ± 0.70 개, 3시간 경과시 3.9 ± 4.58 개 (Fig. 3B), 24시간 경과시 1.9 ± 1.66 개가 관찰되었다.

2) 30주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 0.8 ± 1.03 개가 관찰되었다 (Fig. 3C). 재관류 직후에는 0.9 ± 1.20 개, 3시간 경과시 11.1 ± 7.55 개 (Fig. 3D), 24시간 경과시 6.4 ± 5.67 개의 세포자멸사 양성반응세포가 관찰되었다.

3) 65주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 1.1 ± 1.29 개가 관찰되었다 (Fig. 3E). 재관류 직후에 3.3 ± 2.58 개, 3시간 경과시 13.7 ± 6.65 개 (Fig. 3F), 18시간 경과시 7.7 ± 5.40 개의 세포자멸사 양성반응세포가 관찰되었다.

2. 가자미근

1) 9주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 0.3 ± 0.48 개가 관찰되었다 (Fig. 3G). 재관류 직후에는 0.3 ± 0.48 개, 3시간 경과시 3.5 ± 3.60 개가 관찰되었고 (Fig. 3H), 24시간 경과시 1.5 ± 2.22 개가 관찰되지 않았다.

2) 30주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 0.8 ± 0.92 개가 관찰되었다 (Fig. 3I). 재관류 직후에는 1.3 ± 1.25 개, 3시간 경과시 6.0 ± 3.65 개 (Fig. 3J), 24시간 경과시 5.5 ± 3.69 개의 세포자멸사 양성반응세포가 관찰되었다.

3) 65주군 정상대조군에서 세포자멸사 양성반응세포는 0.9 ± 1.10 개가 관찰되었다 (Fig. 3K). 재관류 직후에는 2.4 ± 2.50 개, 3시간 경과시 7.4 ± 2.55 개 (Fig. 3L), 18시간 경과시 6.5 ± 2.95 개의 세포자멸사 양성반응세포가 관찰되었다.

고 찰

Kerr와 그의 동료들은 1972년에 처음으로 세포자멸사(apoptosis)란 단어를 계획된 세포죽음(programmed cell death)이란 의미로 사용하였다. 세포막이 파괴되고 염증반응을 동반하는 세포괴사(necrosis)와는 달리, 세포자멸사는 세포막이 파괴되지 않고 염증반응을 동반하지 않는다. 세포자멸사에 빠진 세포에서는 핵의 응축(condensation)이 특징적으로 일어나며, 세포막이 함입(blebbing)되고 세포의 크기가 작아진다. 결국 세포는 막으로 싸인 작은 소포들(세포자멸체, apoptotic bodies)로 나뉘어 지고, 잘려진 세포자멸체는 주변의 이웃세포나 포식세포에 의해서 제거된다고 알려져 있다. 세포자멸사는 발생 중 필요 없는 세포와 해로운 작용을 할 수 있는 세포를 제거하며, 살아있는 모든 조직에서 세포의 교체(turnover)를 조절한다. 이러한 세포자멸사 과정에 문제가 생기면 과도한 세포 손실이나 축적이 일어날 수 있으며, 더 나아가 생명을 위협할 수도 있다(McCarthy 2002). 또한 Higami 등(1997)은 간이나 백혈구처럼 분열을 계속하는 조직(mitotic tissue)에서는 노화가 진행됨에 따라 세포자멸사가 증가한다고 하였다.

뼈대근육에서는 노화가 진행됨에 따라 근육섬유의 위축(atrophy)이 일어나고, 섬유의 수가 감소하여 근육의 양(mass)이 감소된다(Holloszy 등 1991). Roubenoff와 Hughes(2000)는 이러한 근육량의 감소가 운동신경(motor neuron)의 감소와 노화에 따른 호르몬의 변화 등에 의해 일어날 수 있다고 하였으며, 세포자멸사가 이러한 뼈대근육의 감소에 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 세포자멸사는 뼈대근육을 사용하지 않을 때 생길 수 있는 근육의 퇴행위축(dystrophy)(Allen 등 1997)과 갑작스런 운동에 의한 근육세포 손실에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Sandri 등 1995). 그러나 발생 후에는 분열이 일어나지 않는 것으로 알려진 심장이나 뇌, 그리고 뼈대근육 같은 조직(postmitotic tissue)에서 노화와 관련되어 일어나는 세포자멸사에 대한 의견은 아직 논쟁의 대상이 되고 있다(Morrison과 Hof 1997,

Higami와 Shimokawa 2000).

Cook 등(1999)과 Daugas 등(2000)은 근육세포의 세포자멸사는 세포내 칼슘 농도가 높아지거나 자유산소기 같은 세포내 자극이 있을 때 cytochrome c의존경로를 통해서 일어난다고 하였다. 허혈후 재관류시에는 형성되는 다량의 자유산소기는 허혈손상의 주된 원인이 되며, 싸이토카인(cytokine)과 전사인자(transcription factor), 유전자 등을 발현시켜 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다(Das 등 1999).

Azhar 등(1999a)은 22~24개월의 노화된 생쥐 심장과 6~8개월된 심장에서 관찰되는 세포자멸사는 차이는 없다고 하였으나, 허혈 및 재관류시에는 노화된 심장에서 세포자멸사가 증가된다고 하였다. Azhar 등(1999b)은 6~8개월과 22~24개월된 흰쥐의 심장과 뇌에서 관찰된 세포자멸사는 차이가 없다고 하였고, 허혈 및 재관류 후에는 심장에서 세포자멸사가 증가된다고 하였다. 이들은 노화된 흰쥐의 심장에서 세포자멸사가 더 많이 일어난다고 하였는데, 이는 젊은 흰쥐의 심장에 비해 자극에 대한 역치(threshold)가 낮기 때문이라고 하였다(Azhar 등 1999b, Liu 등 1998).

이 실험에서 정상대조군의 경우 주령이 증가함에 따라 세포자멸사는 증가되었으나 큰 차이는 없었다. 허혈군에서 관찰된 세포자멸사는 주령이 증가됨에 따라 증가하는 것을 알 수 있었는데, 이는 Azhar 등(1999a, b)의 보고와 유사하였다. 이는 주령이 증가함에 따라, 세포내 여러 효소의 양과 그 활성이 낮아지고(Bak 등 1998), 사립체 수가 감소하며(Conley 등 2000), 항상성 유지기전이 효과적이지 못하고, 자극에 쉽게 손상을 받는 상태가 되어(Azhar 등 1999b) 허혈시 더 많은 세포자멸사가 일어나는 것으로 생각할 수 있었다. 또한 Misao 등(1996)과 Murohara 등(1995)은 노화된 심장은 만성적으로 자극(stress)을 받고 있기 때문에 허혈후 젊은군 보다 세포자멸사가 빨리 시작된다고 하였다. 이 실험에서 허혈후 재관류 직후에 9주군에서는 세포자멸사가 거의 관찰되지 않았으나 30주군에서 앞정강근에서 0.9 ± 1.20 개, 가자미근에서 1.3 ± 1.25 개, 65주군 앞정강근에서 3.3 ± 2.58 개, 가자미근에서 2.4 ± 2.50 개

가 관찰된 것으로 보아 주령이 증가할수록 허혈 자극에 민감하게 반응한다고 생각할 수 있었다(Table 1, Figs. 1, 2).

한편, 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 근육섬유의 종류에 따라서 다르게 일어난다고 알려져 있으나 연구자들에 따라 의견의 차이를 보이고 있다. Hintz 등(1980)은 혐기성 상태에서 백색근육이 적색근육보다 ATP 항상성을 잘 유지할 수 있다고 하였고, Mattei 등(2000)도 빠른수축근육섬유(fast twitch fiber)로 이루어진 긴발가락편근(extensor digitorum longus muscle)이 느린수축근육(slow twitch fiber)으로 이루어진 가자미근보다 허혈에 내성이 있다고 하였다. 그러나 최근에 많은 연구자들은 백색근육섬유가 적색근육섬유보다 허혈손상에 더 민감하다고 주장하고 있다. Carvalho 등(1995)은 흰쥐의 뒷다리를 300 mmHg 압력으로 2시간 허혈시켰을 때, 가자미근보다는 장딴지근(gastrocnemius muscle)과 장딴지빗근(plantaris muscle)에서 근육량이 더 많이 감소된다고 하였다. Woitaske와 McCarter(1998)는 생쥐의 긴발가락편근이 가자미근보다 허혈손상에 민감하고, 손상에서 회복되는 속도도 느리다고 하였으며 근육섬유의 종류가 허혈손상과 허혈후 회복과정에 영향을 준다고 하였다. 또한, 안 등(1999)도 허혈시 단면적이 작은 적색근육섬유에서 단면적이 큰 백색근육섬유보다 세포자멸사가 적게 일어나며, 산화자극에서 세포를 보호하는 과산화소디스무타아제(superoxide dismutase, SOD)의 활성이 높다고 하였다. 이 실험에서는 가자미근보다 앞정강근에서 세포자멸사가 더 많이 관찰되었으며, Carvalho 등(1995)과 Woitaske와 McCarter(1998)의 실험 결과를 고려하여 앞정강근이 허혈에 더 민감하게 반응한다고 생각할 수 있었다. 이러한 허혈손상 차이는 사립체의 분포와 모세혈관의 분포 그리고 에너지를 얻는 방법 등이 근육섬유에 따라 다르기 때문이라고 생각할 수 있었으며(Lindsay 등 1990), 안 등(1999)이 주장한 것처럼 항산화효소의 보호효과도 영향을 줄 수 있을 것이라고 생각하였다.

또한 Blaisdell(2002)은 뼈대근육의 허혈손상은 재관류 3시간 경과시 시작되어 재관류 6시간에는 대부분 끝난다고 하였다. 이는 이 실험에서 세포자

멸사가 허혈후 재관류 3시간 경과시 많이 관찰되고, 24시간 경과시 감소하는 것을 설명해 줄 수 있다고 생각하였다.

이상의 결과에서, 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 주령이 증가할수록 증가됨을 알 수 있었으며, 앞정강근이 가자미근보다 허혈손상에 더 민감하다고 생각할 수 있었다.

참고 문헌

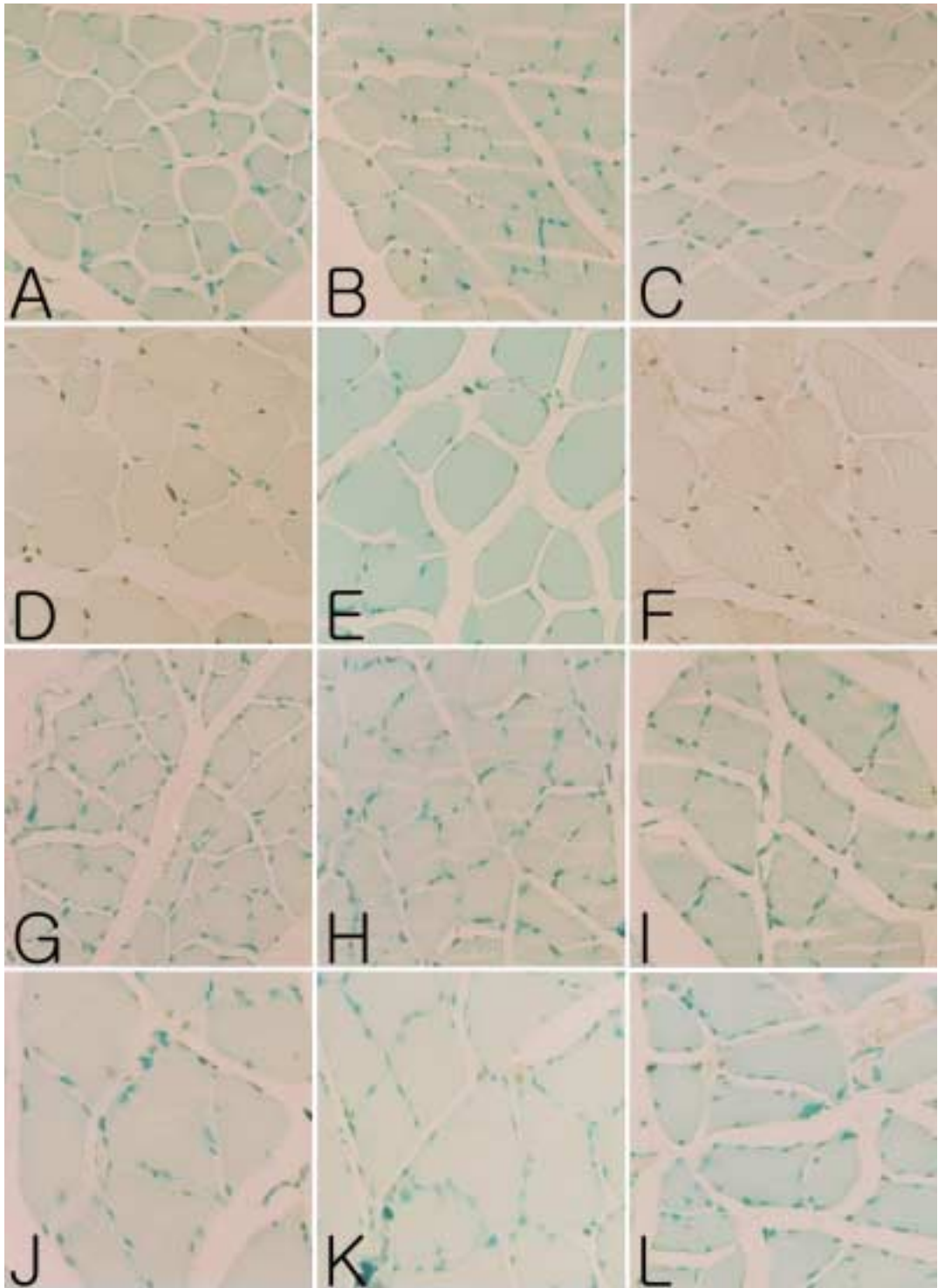
- 안동춘, 백두진, 양홍현 : 허혈양상화와 KATP 통로가 허혈 후 재관류된 흰쥐의 골격근육에서 SOD 활성 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한수의학회지 39 : 878-895, 1999.
- Amstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. Am J Anat 171 : 259-272, 1984.
- Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR : Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. Am J Physiol Cell Physiol 273 : C579-587, 1997.
- 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.
- Blaisdell FW : The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 10 : 620-630, 2002.
- Carvalho AJ, Hollett P, McKee NH : Recovery of synergistic skeletal muscle function following ischemia. J Surg Res 59 : 527-533, 1995.
- Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ : Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. Plast Reconstr Surg 99 : 163-

- 171, 1997.
- 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.
- Das DK, Engelman RM, Maulik N : Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 874 : 49-65, 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.
- Gardner VO, Caiozzo VJ, Long ST, Stoffel J, McMaster WC, Prietto CA : Contractile properties of slow and fast muscle following tourniquet ischemia. *Am J Sports Med* 12 : 417-423, 1984.
- Higami Y, Shimokawa I : Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 301 : 125-132, 2000.
- Higami Y, Shimokawa I, Okimoto T, Tomita M, You T, Ikeda T : Effect of aging and dietary restriction on hepatocyte proliferation and death in male F344 rats. *Cell Tissue Res* 288 : 67-77, 1997.
- Hintz CS, Lowry CV, Kaiser KK, McKee D, Lowry OH : Enzyme levels in individual rat muscle fibers. *Am J Physiol* 239 : C58-65, 1980.
- 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.
- Idström JP, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 258 : H1668-1678, 1990.
- Kerr JF, Wyllie H, Currie AR : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM : The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 12 : 8-15, 1990.
- Lipton P : Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 : 1431-1568, 1999.
- 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.
- McCarthy : Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death edited by Oxford University Press Inc., pp. 1-5, 2002.
- Mattei A, Sutter PM, Marx A, Stierli P, Heberer M, Gurke L : Preconditioning with short cycles improves ischemic tolerance in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Eur Surg Res* 32 : 297-304, 2000.
- 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.
- Morrison JH, Hof RR : Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278 : 412-419, 1997.
- Murohara T, Guo JP, Lefer A : 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.
- Roubenoff R, Hughes VA : Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55 : M716-724, 2000.
- Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C : Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 373 : 291-295, 1995.
- Woitasko MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 102 : 2052-2063, 1998.

Legends for Figures

- Fig. 3.** TUNEL staining for apoptotic nuclei in tibialis anterior and soleus muscle of the control and ischemia group ($\times 200$).
- A. In tibialis anterior muscle of 9 weeks old rat, the control group, number of apoptotic nuclei is not observed ($\times 200$).
 - B. In tibialis anterior muscle of 9 weeks old rat 3 hours reperfusion after ischemia, number of apoptotic nuclei is 3.9 ± 4.58 ($\times 200$).
 - C. In tibialis anterior muscle of 30 weeks old rat, control group, number of apoptotic nuclei is 0.8 ± 1.03 ($\times 200$).
 - D. In tibialis anterior muscle of 30 weeks old rat 3 hours reperfusion after ischemia, number of apoptotic nuclei is 11.1 ± 7.55 ($\times 200$).
 - E. In tibialis anterior muscle of 65 weeks old rat, control group, number of apoptotic nuclei is 1.1 ± 1.29 ($\times 200$).
 - F. In tibialis anterior muscle of 65 weeks old rat 3 hours reperfusion after ischemia, number of apoptotic nuclei is 13.7 ± 6.65 ($\times 200$).
 - G. In soleus muscle of 9 weeks old rat, control group, number of apoptotic nuclei is 0.3 ± 0.48 ($\times 200$).
 - H. In soleus muscle of 9 weeks old rat 3 hours after ischemia, number of apoptotic nuclei is 3.5 ± 3.60 ($\times 200$).
 - I. In soleus muscle of 30 weeks old rat, control group, number of apoptotic nuclei is 0.8 ± 0.92 ($\times 200$).
 - J. In soleus muscle of 30 weeks old rat 3 hours after ischemia, number of apoptotic nuclei is 6.0 ± 3.65 ($\times 200$).
 - K. In soleus muscle of 65 weeks old rat, control group, number of apoptotic nuclei is 0.9 ± 1.10 ($\times 200$).
 - L. In soleus muscle of 65 weeks old rat 3 hours after ischemia, number of apoptotic nuclei is 7.4 ± 2.55 ($\times 200$).

K C I



Abstract

Age-related Alterations of Apoptosis in Ischemic-reperfused Rat Tibialis Anterior and Soleus Muscles

**Youn-Kyoung Seo, Chae-Soo Shin, Jong-Heon Kim¹,
Young-June You², Doo-Jin Paik**

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

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

²*Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Inje University*

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.

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

9 weeks, 30 weeks, and 65 weeks old male Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups such as controls and ischemia. For ischemia, left common iliac artery was occluded for 4 hours using rodent vascular clamps. The tibialis anterior and soleus 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 apoptotic reactions were detected using TUNEL methods.

The results obtained were as follows;

1. In control groups, the number of apoptosis was increased with aging, but not significantly.
2. In ischemia groups, the number of apoptosis was increased at 3 hours after ischemia, and decreased at 24 hours after ischemia.
3. In ischemia groups, the number of apoptosis was increased with aging.
4. In ischemia groups, the number of apoptosis in the tibialis anterior muscle was higher than that in soleus muscle.

These results suggested that the ischemic injury of the rat skeletal muscle is increased with aging and that tibialis anterior muscle is more susceptible to ischemic injury than soleus muscle.

Key words : Ischemia, Tibialis Anterior, Soleus, Apoptosis