

허혈후 재관류된 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 주령에 따라 관찰되는 Bcl-2와 Bax의 면역조직화학적 연구

서윤경, 신채수, 김종현¹, 유영준², 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ¹한양대학교 의과대학 정형외과학교실

²인제대학교 의과대학 성형외과학교실

간추림 : 뼈대근육에서 일어나는 허혈은 세포손상과 세포자멸사를 일으킬 수 있다. 재관류시 생성되는 자유산소기는 여러 유전자를 발현시키고, 세포자멸사를 유도한다. Bcl-2와 Bax는 세포자멸사를 조절하는 주요한 단백질로 Bcl-2는 세포자멸사를 억제하고 Bax는 촉진하는 것으로 알려져 있다.

이에 연구자들은 흰쥐의 뼈대근육에서 허혈후 재관류시에 나타나는 Bcl-2와 Bax의 면역조직화학적반응을 주령에 따라 관찰하고자 이 실험을 실시하였다.

실험동물은 9주령, 30주령 및 65주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였고, 정상대조군과 허혈군으로 나누었으며 허혈군은 재관류 경과시간에 따라 0, 3 및 24시간 경과군으로 나누었다. 허혈은 흰쥐용 혈관집게를 사용하여 왼은엉덩동맥을 4시간 폐색하였고, 재관류 경과시간에 따라 실험동물을 희생시켜 왼앞정강근과 왼가자미근을 적출하였다. Bcl-2와 Bax의 면역조직화염색을 위해 6 μ m 두께의 파라핀절편 제작하고 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군에서 Bcl-2와 Bax 면역반응은 30주령에서 경도 또는 중등도로 관찰되었고, 9주와 65주령에서는 미약하게 관찰되었다.
2. 정상대조군에서 Bcl-2와 Bax 면역반응은 가자미근보다 앞정강근에서 약간 높게 관찰되었으나, 유의한 차이는 없었다.
3. 허혈군에서 Bax 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였다.
4. 허혈군에서 Bax 면역반응은 가자미근보다 앞정강근에서 더 높게 관찰되었다.

이상의 결과에서, 허혈후 재관류시 증가된 Bax가 허혈손상의 증가와 관련이 있을 것으로 생각되며, 노화된 근육과 앞정강근에서 Bax가 증가된 것으로 보아 허혈손상에 더 민감하다고 결론 지을 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 허혈, 앞정강근, 가자미근, Bcl-2, Bax

서 론

뼈대근육에서 일어나는 장시간의 허혈은 세포의 부종과 손상을 일으키고, 혈관손상 등 전신적인 반응을 일으킬 수도 있다. 이러한 손상의 원인으로는 허혈후 재관류시 생성되는 자유산소기의 과도한 발생, 에너지의 고갈, 백혈구의 침윤, 칼슘 과축적 등이

제기되고 있다(Pang 등 1993).

자유산소기(oxygen free radical)는 주로 재관류시 생성되어(Baxter 등 1995) 이온통로(ion channel) 이동과 막전위(membrane potential)에 영향을 주어 여러 신호전달체계(signal transduction)를 활성화시키고 세포괴사와 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다(Piper 등 1996).

세포자멸사(apoptosis)는 발생과정이나 노화과정 그리고 살아있는 모든 조직에서 필요없는 세포를

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

염증반응 없이 제거하는 기전으로, 자유산소기 같은 산화자극이 세포 안에 생성된 경우 cytochrome c의 존경로(cytochrome c-dependent pathway)를 통해 일어난다고 알려져 있다(Cook 등 1999, Daugas 등 2000). Cytochrome c는 사립체에 위치하는 단백질로 일단 cytochrome c가 세포질로 유리되면 세포자멸사가 시작된다. 세포자멸사의 중심이 되는 cytochrome c의 유리는 Bcl-2 계 단백질에 의해서 조절이 된다고 알려져 있다. Bcl-2 계 단백질은 세포자멸사 억제제인 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-x β , Bag-1 등과 세포자멸사 촉진자인 Bax, Bad, Bak, BID 등으로 구성되어 있다(Rossé 등 1998, Tsujimoto와 Shimizu 1999).

최근에 세포자멸사를 조절한다는 Bcl-2 계 단백질의 변화와 세포자멸사에 관한 연구가 많이 진행되고 있으나 아직까지 그 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있으며, 또한 대부분 심장근육에서 연구가 진행되어 오고 있어 뼈대근육을 이용한 연구는 적은 편이다.

또한 뼈대근육은 근육섬유의 종류에 따라서 에너지를 얻는 방법이 다르며, 사립체와 모세혈관의 분포 정도도 차이가 있는데(Lindsay 등 1990), 이러한 생리적인 차이로 인해서 허혈후 재관류시 관찰되는 여러 가지 변화가 다를 수 있다고 생각된다.

이에 저지는 허혈 및 재관류시 흰쥐에서 주로 백색근육섬유로 구성된 앞장근(tibialis anterior muscle)과 적색근육섬유로 구성된 가자미근(soleus muscle)에서(Amstrong과 Phelps 1984) 세포자멸사를 조절한다고 알려진 Bcl-2와 Bax의 면역반응을 관찰하기 위하여 이 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

실험동물은 9주령과 30주령 그리고 65주령의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 정상대조군과 허혈군으로 나누었다. 허혈군은 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. 흰쥐용 혈관집게를 사용하여 왼온영덩동맥을 4시간 동안 폐색 후 혈관집게를 제거하여 재관류시켰다. 재관류 경과 0시간, 3시간 그리고 24시간 뒤에 실험동물을 희생시켜 원가자미근과 앞장근을 적출하였다. 65주령의 경우 24시간 이상의 마취를 견디지 못하고 죽어서 재관류 후 18시간에 실험동물을 희생시켜 24시간군으로 대처하였다. 재관류 후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰으며, 마취된 동물은 실험기간동안 백열전등을 이용하여 체온을 유지시켰다.

3. Bcl-2와 Bax의 면역조직화학염색

적출한 근육은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액(pH 7.4)에 24시간 이내로 고정시킨 후 일상적인 방법으로 6 μ m두께의 파라핀절편 제작하였다. 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 반응시켰다. Blocking 용액을 37°C에서 1시간 처리한뒤, 일차 항체 rabbit anti-human Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1 : 200, rabbit anti-mouse Bax antibody (Santa Cruz)를 1 : 100으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 2차 항체 biotinylated goat anti-rabbit Ig G antibody (Vector lab., USA)를 실온에서 40분간 반응시킨 후 ABC (Vector) 혼합용액을 실온에서 30분간 적용하였다. 발색은 DAB (3, 3'-diaminobenzidine, Vector) 시료를 이용하였고, 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직반응이 확실한지 확인하기 위하여 일차 항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시

Table 1. Immunoreactivities of Bcl-2 in the ischemic-reper-fused rat tibialis anterior (TA) and soleus muscles (Sol)

Age	Skeletal muscle	Normal control	Ischemia for 4 h and reperfusion (h)		
			0	3	24 (18)
9 weeks	TA	+, ± (5)	+ (6)	+++ (12)	++, +++ (10)
	Sol	± (3)	± (3)	+, ++ (7)	±, + (4)
30 weeks	TA	+, ++ (7)	+ (6)	++, +++ (10)	±, + (4)
	Sol	+ (6)	+, ± (5)	±, + (4)	++ (9)
65 weeks	TA	± (3)	++, +++ (10)	++, + (8)	±, + (4)
	Sol	± (3)	+++, ++ (11)	+, ± (5)	±, + (4)

Abbreviations

± : trace, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong
number in () : a grade of immunoreactivity

Table 2. Immunoreactivities of Bax in the ischemic-reper-fused rat tibialis anterior (TA) and soleus muscles (Sol)

Age	Skeletal muscle	Normal control	Ischemia for 4 h and reperfusion (h)		
			0	3	24 (18)
9 weeks	TA	+, ± (5)	++, + (8)	++ (9)	++, + (8)
	Sol	± (3)	+, ± (5)	++, + (8)	±, + (4)
30 weeks	TA	+, ++ (7)	+, ++ (7)	++, + (8)	±, + (4)
	Sol	+ (6)	+, ++ (7)	+, ++ (7)	+ (6)
65 weeks	TA	±, + (4)	+++ (12)	+++, ++ (11)	+, ± (5)
	Sol	+, ± (5)	++, + (8)	++, +++ (10)	± (3)

Abbreviations

± : trace, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong
number in () : a grade of immunoreactivity

행하였다. 각 근 근육을 사진촬영하고 분석하였으며, 면역반응의 크기와 정도를 음성반응(-), 미약한 양성반응(±), 정도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++)과 강한 양성반응(+++)으로 구분하였으며, Table 1과 2에 요약하였다.

결 과

1. Bcl-2의 면역조직화학염색 (Figs. 1-3)

1) 앞정강근

(1) 9주군 정상대조군에서는 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며 (Fig. 4A), 재관류 직후에는 경도의(+) 양성반응, 3시간 경과시 강한(+++) 양성반응, 24시간 경과시 중등도(++) 또는 강한(+++) 양성반응으로 관찰되었다.

(2) 30주군 정상대조군에서는 경도(+) 또는 중등도의(++) 양성반응으로 관찰되었으며 (Fig. 4B), 재관류 직후에는 경도의(+) 양성반응, 3시간 경과시 경도(+) 또는 중등도의(++) 양성반응, 24시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

(3) 65주군 정상대조군에서는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재관류 직후에는 중등도(++) 또는 강한(+++) 양성반응 (Fig. 4C), 3시간 경과시 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응, 24시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

2) 가자미근

(1) 9주군 정상대조군에서는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재관류 직후에는 미약한(±) 양성반응, 3시간 경과시 경도(+) 또는 중등도의(++)

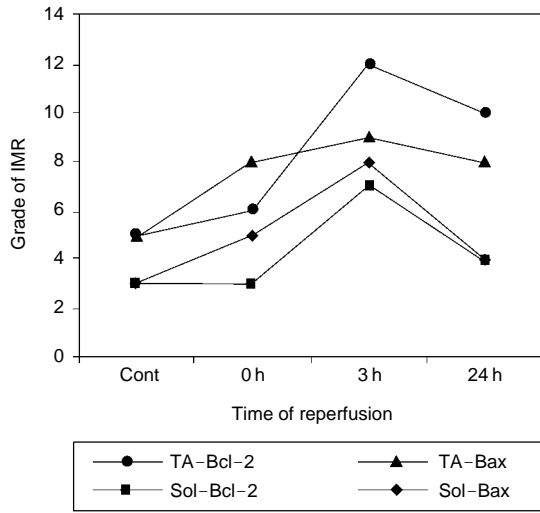


Fig. 1. Immunoreactivities of Bcl-2 and Bax in tibialis anterior (TA) and soleus (Sol) muscle of the 9 weeks old rat, control (cont) and ischemia groups (IMR : immunoreactivity).

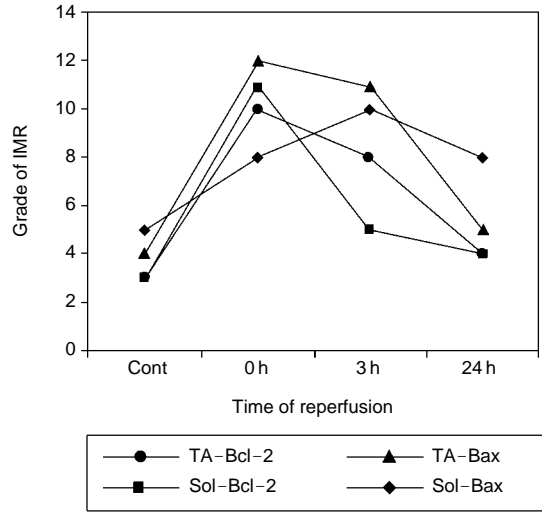


Fig. 3. Immunoreactivities of Bcl-2 and Bax in tibialis anterior and soleus muscle of the 65 weeks old rat, control and ischemia groups (IMR : immunoreactivity).

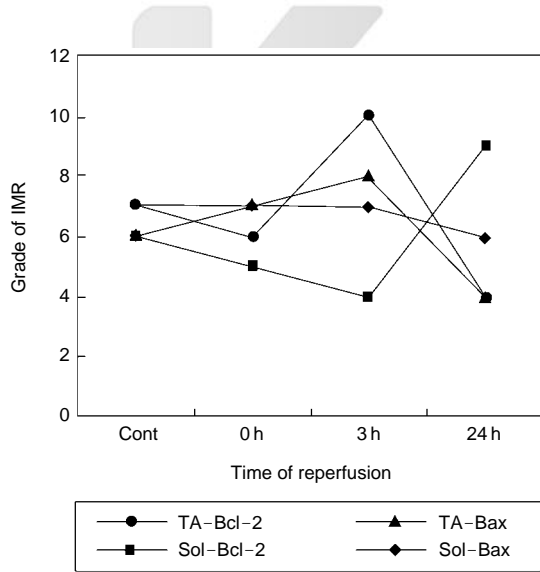


Fig. 2. Immunoreactivities of Bcl-2 and Bax in tibialis anterior (TA) and soleus (Sol) muscle of the 30 weeks old rat, control (cont) and ischemia groups (IMR : immunoreactivity).

양성반응(Fig. 4D), 24시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

(2) 30주군 정상대조군에서는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었으며, 재관류 직후에는 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응, 3시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응, 24시간 경과시 중등도의(++) 양성반응으로 관찰되었다(Fig. 4E).

(3) 65주군 정상대조군에서는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재관류 직후에는 강한(+++) 또는 중등도의(++) 양성반응(Fig. 4F), 3시간 경과시 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응, 24시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

2. Bax의 면역조직화학염색(Figs. 1-3)

1) 앞정강근

(1) 9주군 정상대조군에서는 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재관류 직후에는 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응, 3시간 경과시 중등도의(++) 양성반응, 24시간 경과시 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다(Fig. 4G).

(2) 30주군 정상대조군에서는 경도(+) 또는 중등

도의(++) 양성반응으로 관찰되었으며, 재판류 직후에는 경도(+) 또는 중등도의(++) 양성반응, 3시간 경과시 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응(Fig. 4H), 24시간 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

(3) 65주군 정상대조군에서는 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었으며, 재판류 직후에는 강한(+++) 양성반응, 3시간 경과시 강한(+++) 또는 중등도의(++) 양성반응(Fig. 4I), 24시간 경과시 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었다.

2) 가지미근

(1) 9주군 정상대조군에서는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재판류 직후에는 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응(Fig. 4J), 3시간 경과시 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응, 24시간 경과시 미약한(±) 또는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

(2) 30주군 정상대조군에서는 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었으며, 재판류 직후에는 경도(+) 또는 중등도(++) 양성반응, 3시간 경과시 경도(+) 또는 중등도(++) 양성반응(Fig. 4K), 24시간 경과시 경도의(+) 양성반응으로 관찰되었다.

(3) 65주군 정상대조군에서는 경도(+) 또는 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었으며, 재판류 직후에는 중등도(++) 또는 경도의(+) 양성반응, 3시간 경과시 중등도(++) 또는 강한(+++) 양성반응(Fig. 4L), 24시간 경과시 미약한(±) 양성반응으로 관찰되었다.

고 찰

Cook 등(1999)과 Daugas 등(2000)은 근육세포 내에 칼슘농도가 높아지거나 활성산소기 같은 자극이 있을 때 cytochrome c 의존경로를 통해서 세포자멸사가 일어난다고 하였으며, Dirks 및 Leeuwenburgh (2001)는 나이가 들에 따라 흰쥐의 뼈대근육에서 근육의 건조무게가 감소하고 세포자멸사가 증가한다고 하였으나, 이러한 세포자멸사가 사립체의존경로를 통해서 일어나는지는 명확하지 않다고 하였다.

세포자멸사는 각각의 자극에 특이적인 신호전달 경로를 통해 활성화되지만, 이는 결국 death protein 이라 불리는 caspase를 활성화시키는 단계로 집중된다. caspase 활성을 조절하는 몇가지 유전자중 가장 특징적인 것은 Bcl-2 계 단백질(Bcl-2 family protein)이다(Alnemri 등 1996).

Bcl-2 계 단백질에는 세포자멸사 억제인자(anti-apoptotic member)와 촉진인자(pro-apoptotic member)가 있다(Tsujimoto 1998). 살아있는 세포에서는 주로 억제인자가 사립체에서 cytochrome c 유리를 막고 있으며, 세포자멸사가 일어나는 동안에는 세포자멸사 촉진인자가 활성화 된다(Zha 등 1996).

Bcl-2는 세포자멸사 억제인자로 주로 사립체 바깥쪽에 위치하고, cytochrome c의 유리를 방해한다. Bax는 세포자멸사 촉진인자로 세포질에 위치하고 있다가 활성화되면 사립체로 이동한다(Adams와 Cory 1998). 일단 Bax가 사립체로 이동하면, 사립체에서 세포질로 cytochrome c를 유리시키고, 유리된 cytochrome c는 Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1)과 procaspase-9과 결합하여 apoptosome을 형성하게 된다. 이러한 apoptosome 형성은 procaspase-9을 자가분해시켜 caspase-9로 활성화시키고, caspase-9은 procaspase-3을 caspase-3로 활성화시킨다. 이러한 과정을 겪은 세포는 결국 세포자멸사를 일으키게 된다(Srinivasula 등 1998, Li 등 1997).

Bcl-2 계 단백질의 세포자멸사 억제인자와 촉진인자는 이형이합체(heterodimer)를 형성하여 서로의 활성을 억제시키고, 다른 사립체 단백질과 상호작용하여 사립체의 변화를 조절한다고 생각되어지고 있다(Tsujimoto와 Shimizu 2000).

Hockenbery 등(1993)은 세포자멸사 촉진인자인 Bad가 Bcl-2와 결합을 하면, Bax는 동형이합체(homodimer)를 형성하게 되어 세포자멸사를 촉진시키고, Bad와 Bcl-2의 결합이 일어나지 않으면, Bcl-2와 Bax의 결합이 일어나 세포자멸사가 억제된다고 하였다. Bcl-2와 Bax의 이형이합체형성(heterodimerization)은 DNA 분절을 감소시킬 수 있다고 하였으며, 이러한 이형이합체형성은 Bcl-2와 Bax의 비율 의존 방식에 의해서 일어난다고 하였다. Misao 등(1996)도 Bcl-2 계 단백질의 세포자멸사 촉진인자

와 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, Bad 등 다른 Bcl-2 계 단백질의 발현도 영향을 줄 수 있다고 하였다.

한편 Pourzand 등(1997)은 Bcl-2가 직접적으로 활성산소기를 제거한다고 하였으며, Shimizu 등(1996)은 Bcl-2가 사립체의 막전위 감소를 방어함으로써 세포자멸사를 억제한다고 하였다. Rosse 등(1998)은 Bcl-2가 Bax와 함께 사립체에 존재하여도 cytochrome c의 유리를 막지는 못한다고 하였으나 Bcl-2와 Bax 그리고 유리된 cytochrome c가 모두 많은 경우에는 cytochrome c의 활성화가 일어나지 않는다고 하였고, 이는 Bcl-2가 Bax의 아래경로(downstream)를 차단치거나 cytochrome c 유리와는 독립적인 다른 경로를 차단하기 때문이라고 하였다. Zou 등(1997)은 Bcl-2가 최근에 밝혀진 cytochrome c receptor Apaf-1/CED-4 (caspase-3 activation mediator)와 상호작용하여 caspase-3의 활성화를 억제하는 것 같다고 하였다.

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

Liu 등(1998)은 흰쥐의 심장에서 관상동맥 폐색 후 Bax가 증가되는 것을 관찰하였고, Fortuno 등(1998)은 원발성 고혈압 흰쥐의 심장에서 Bax가 증가되는 것을 관찰하였으며, 이들은 정상보다 증가된 Bax의 발현이 세포자멸사와 관련이 있다고 하였다.

Centurione 등(2002)은 24개월과 4개월된 흰쥐의 심장에서 일어나는 세포자멸사는 차이가 없으나 Bcl-2와 Bax는 24개월군에서 증가되어 있다고 하였다. Azhar 등(1999b)은 세포자멸사 억제자인 Bcl-2와 Bcl-xL는 6~8개월과 22~24개월된 흰쥐의 심장과 뇌에서 비슷하나, 허혈후 재관류시 증가된다고 하였다. Bax는 22~24개월군에서 더 높았고 허혈후 재관류시 6~8개월된 심장과 뇌에서는 증가

하나 22~24개월군 심장에서는 변화가 없고 뇌에서는 감소한다고 하였다. 22~24개월군에서는 비록 Bcl-2 발현이 높게 나타나지만 세포자멸사가 많이 일어난다고 하였으며, 이는 Bax의 발현이 나이가 들에 따라 증가되며, 젊은군에 비해서 자극에 대한 역치가 낮아 쉽게 손상받기 때문이라고 하였다(Azhar 등 1999b, Liu 등 1998).

Azhar 등(1999a)은 노화된 22~24개월의 생쥐 심장이나 6~8개월된 심장에서 관찰된 세포자멸사는 차이가 없다고 하였으나, 허혈후 재관류시에는 노화된 심장에서 세포자멸사가 증가된다고 하였다. Misao 등(1996)과 Murohara 등(1995)은 허혈후 심장에서 일어나는 세포자멸사는 노화군에서 더 빨리 시작되며, Bcl-2와 Bax 비율도 노화군에서 더 높다고 하였다. Bax가 노화군에서 더 많이 나타나는 것은, 노화군의 경우 만성적으로 자극을 받고 있기 때문이라고 하였으며, 이러한 이유때문에 허혈후 3시간 경과시 젊은군 보다 세포자멸사가 빨리 시작된다고 하였다.

이 실험에서 정상대조군의 Bcl-2와 Bax의 면역반응은 다른 주령군보다 30주군에서 높게 관찰되었으나 큰 차이는 없었다. 허혈시 9주군과 30주군에서 관찰된 Bcl-2와 Bax의 면역반응은 허혈후 재관류 3시간에 가장 높게 관찰되었다 24시간에 감소하였고, 65주군에서는 재관류 직후에 가장 높게 관찰되어 3시간까지 유지되다 24시간에 감소하였다. 이는 나이가 들에 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) 허혈후 65주군에서 Bcl-2와 Bax의 면역반응이 빠르게 증가된 것이라고 생각할 수 있었으며, 노화된 군에서 허혈시 세포자멸사가 빨리 시작된다는 Misao 등(1996)과 Murohara 등(1995)의 실험 결과도 본 실험의 결과와 관련이 있다고 생각되었다.

또한 Bax 면역반응은 허혈후 재관류 직후와 3시간 경과시 모두 65주군에서 가장 높게 관찰되었는데, Bax의 증가가 세포자멸사와 관련이 있다는 Liu 등(1998)과 Fortuno 등(1998)의 결과와 노화가 필수적 허혈시 세포자멸사와 Bax가 증가된다는 Murohara

등(1995)의 결과를 고려해 보면, 이러한 허혈후 주령에 따른 Bax의 증가가 세포손상과 관련이 있을 수 있다고 생각할 수 있었다.

한편, 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상은 근육섬유의 종류에 따라서 다르게 일어난다고 알려져 있다. Hintz 등(1980)은 혐기성 상태에서 백색근육이 적색근육보다 ATP 항상성을 잘 유지할 수 있다고 하였으며, Mattei 등(2000) 역시 빠른수축근육섬유로 이루어진 긴발가락편근이 느린수축근육으로 이루어진 가자미근보다 허혈에 대한 내성이 있다고 하였다. 그러나 Petrsek (1994)과 Carvalho 등(1995)은 적색근육이 백색근육보다 허혈에 더 내성이 있다고 주장하였다.

이 실험에서 Bcl-2와 Bax의 면역반응은 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었는데, 허혈시 Bax와 세포자멸사가 증가한다는 여러 연구자들의 실험결과를 고려해 볼 때, 이는 앞정강근이 허혈 자극에 대해 더 민감하게 반응한다고 생각할 수 있었다.

또한 Bcl-2의 면역반응은 허혈 직후에만 65주군에서 가장 높게 관찰되었고, 재관류 3시간과 24시간에는 9주와 30주군에서 높게 관찰되었다. 그리고 앞정강근과 가자미근에서 관찰된 Bcl-2 면역반응은 주령에 따라서 그리고 허혈후 재관류 경과시간에 따라서 나타나는 이러한 차이는 근육섬유의 종류와 주령에 따라 에너지를 이용하고 방법과 생리적인 상태가 다르기 때문(Lindsay 등 1990, Holloszy 등 1991)이라고 생각되었다. Honma 등(2002)은 12주와 50주된 흰쥐 심장의 허혈양상화과정은 heat shock protein 발현을 유도하지만, 50주된 흰쥐의 경우 heat shock protein이 세포보호 효과를 나타내지 못한다고 하였으며, 나이가 들어서 증가되는 효소활성은 세포보호에 직접적인 효과를 주지 않는다고 하였다. 그러나 이 실험에서 Bcl-2의 증가가 세포자멸사 또는 허혈손상과 관련이 있는지는 결론을 내릴 수 없었다. 앞으로 Bcl-2와 관련된 세포보호단백질에 대한 연구가 더 진행된다면 이에 대한 해답을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과에서, 허혈후 재관류시 증가된 Bax가 허혈손상의 증가와 관련이 있을 것이라 생각되었으며, 노화된 근육과 앞정강근에서 Bax가 증가된 것으

로 보아 허혈손상에 더 민감하다고 결론지을 수 있었다.

참고 문헌

- 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.
- Amstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171 : 259-272, 1984.
- 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.
- 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.
- 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* 2002 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,

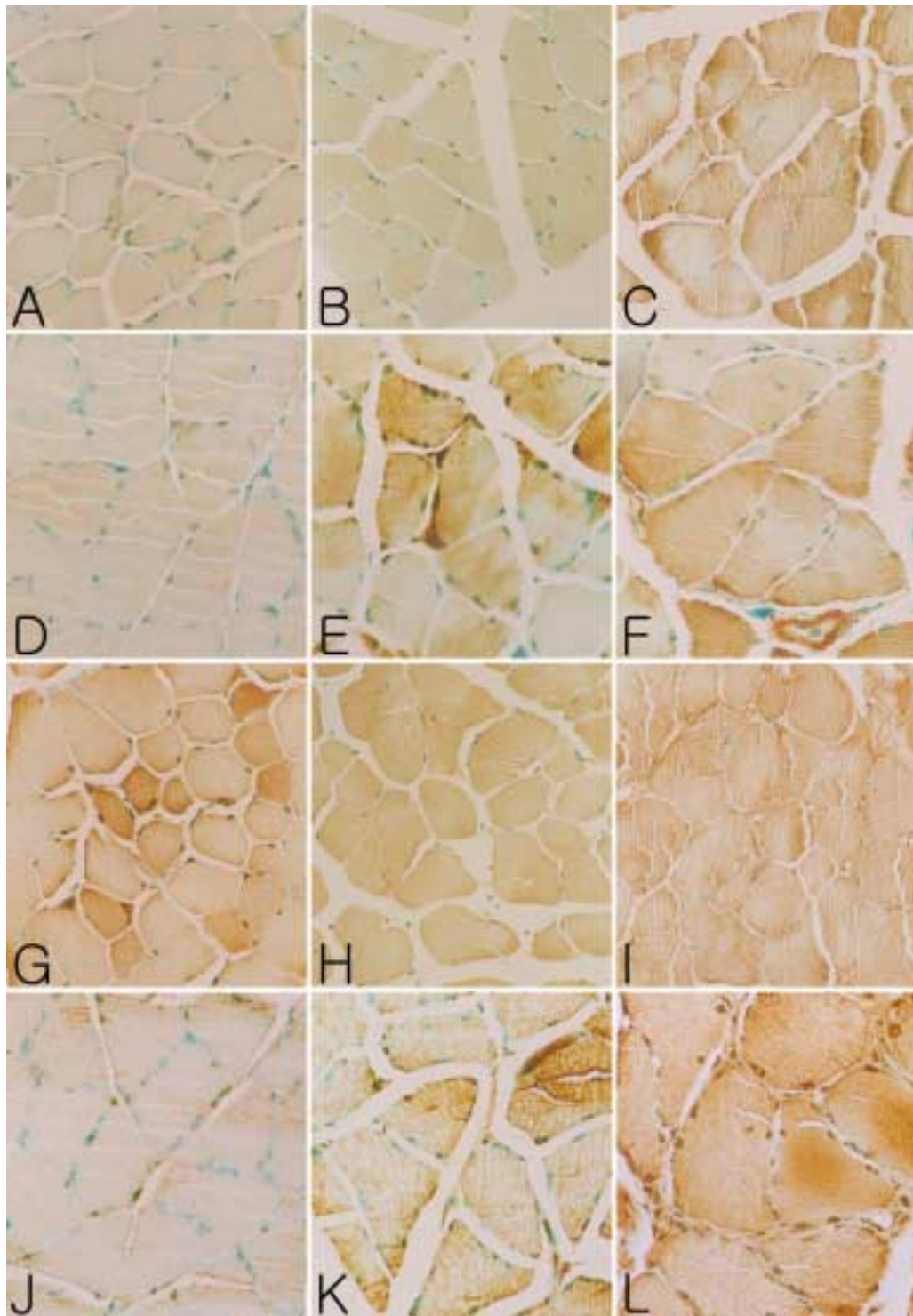
- Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G : Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14 : 729-739, 2000.
- Dirks A, Leeuwenburgh C : Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282 : R519-527, 2002.
- 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.
- Hintz CS, Lowry CV, Kaiser KK, McKee D, Lowry OH : Enzyme levels in individual rat muscle fibers. *Am J Physiol* 239 : C58-65, 1980.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman 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.
- Honma Y, Tani M, Takayama M, Yamamura K, Hasegawa H. Aging abolishes the cardioprotective effect of combination heat shock and hypoxic preconditioning in reperfused rat hearts. *Basic Res Cardiol* 97 : 489-495, 2002.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X : Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 : 479-489, 1997.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Petrsek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM : Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 19 : 623-631, 1994.
- 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.
- Pourzand C, Rossier G, Reelfs O, Borner C, Tyrrell RM : Overexpression of Bcl-2 inhibits UVA-mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblasts: evidence for the involvement of Bcl-2 as an antioxidant. *Cancer Res* 57 : 1405-1411, 1997.
- 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* 29 : 496-499, 1998.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y : Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 13 : 21-29, 1996.
- 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.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X : Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 : 405-413, 1997.

Legends for Figures

Fig. 4. Immunoreactivities (IMRs) of Bcl-2 and Bax in rat skeletal muscle of the control and ischemia groups ($\times 200$).

- A. Bcl-2 IMR in tibialis anterior muscle of 9 weeks old rat, control group. Weak or trace IMRs are observed ($\times 200$).
- B. Bcl-2 IMR in tibialis anterior muscle of 30 weeks old rat, control group. Weak or moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- C. Bcl-2 IMR in tibialis anterior muscle of 65 weeks old rat, after ischemia. Moderate or strong IMRs are observed ($\times 200$).
- D. Bcl-2 IMR in soleus muscle of 9 weeks old rat, 3 hours after reperfusion. Weak or moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- E. Bcl-2 IMR in soleus muscle of 30 weeks old rat, 24 hours after reperfusion. Moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- F. Bcl-2 IMR in soleus muscle of 65 weeks old rat, after ischemia. Strong or moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- G. Bax IMR in tibialis anterior muscle of 9 weeks old rat, 24 hours after reperfusion. Moderate or weak IMRs are observed ($\times 200$).
- H. Bax IMR in tibialis anterior muscle of 30 weeks old rat, 3 hours after reperfusion. Moderate or weak IMRs are observed ($\times 200$).
- I. Bax IMR in tibialis anterior muscle of 65 weeks old rat, 3 hours after reperfusion. Strong or moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- J. Bax IMR in soleus muscle of 9 weeks old rat, after ischemia. Weak or trace IMRs are observed ($\times 200$).
- K. Bax IMR in soleus muscle of 30 weeks old rat, 3 hours after reperfusion. Weak or moderate IMRs are observed ($\times 200$).
- L. Bax IMR in soleus muscle of 65 weeks old rat, 3 hours after reperfusion. Moderate or strong IMRs are observed ($\times 200$).

K C I



Abstract

Age-related Alterations of Bcl-2 and Bax Immunoreactivities in the Ischemic-reperfused Tibialis Anterior and Soleus Muscles of the Rats

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. Reactive oxygen species generated during reperfusion time induce expression of various genes and apoptosis. Among apoptosis-related gene products, Bcl-2 and Bax regulate the apoptotic response by inhibiting and promoting cell death, respectively.

The purpose of this study was to observe the age-related alteration of expression profile of Bcl-2 and Bax in rat tibialis anterior muscle and soleus muscle following ischemia-reperfusion.

9 weeks, 30 weeks, and 65 weeks old male Sprague-Dawley rats were divided into control and ischemia groups. Ischemia group was divided into 3 subgroups based on reperfusion time. For ischemia, left common iliac artery was occluded for 4 hours using rodent vascular clamps. The animals were sacrificed at hours 0, 3 and 24 after onset of reperfusion and tibialis anterior and soleus muscles were removed. Muscle tissues were embedded in paraffin and 6 μ m sections were made. The expression level of Bcl-2 and Bax were examined using immunohistochemical methods.

The results obtained were as follows;

1. In control group, immunoreactivities (IMRs) of Bcl-2 and Bax were weak or moderate in 30 weeks old rats and were trace in 9 and 65 weeks old rat.
2. In control group, IMRs of Bcl-2 and Bax in tibialis anterior muscle were more higher than those in soleus muscle, but not significantly.
3. In ischemia group, IMRs of Bax were increased with aging.
4. In ischemia group, IMR of Bax in tibialis anterior muscle was higher than that in soleus muscle.

These results suggested that the increased IMR of Bax may be related to increasing of ischemic injury, and both old skeletal muscle and tibialis anterior muscle are susceptible to ischemic injury of rat skeletal muscle.

Key words : Ischemia, Tibialis Anterior, Soleus, Bcl-2, Bax