

허혈 및 재관류된 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 나타나는 NF- κ B의 변동

서 윤 경, 백 두 진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 뼈대근육에서 허혈 및 재관류시 생성된 자유산소기는 세포손상과 세포자연사를 일으키는 주요한 인자로서 재관류손상에 관여하며, 2시간 허혈 및 재관류시에는 가역적인 변화가 일어나지만 장기간의 허혈 및 재관류시에는 손상이 심하게 일어나는 것으로 알려져 있다. 허혈 및 재관류시 세포손상과 방어에 관련된 여러 유전자가 발현되어 신호전달체계를 활성화시킨다. 허혈양상화는 짧은 허혈과 재관류가 반복되는 과정으로 장기간의 허혈로 인한 세포손상을 막아준다. NF- κ B는 허혈양상화 또는 허혈 및 재관류시 활성화되는 주된 전사인자로 전염증성, 전혈액응고성, 혈관활성화 유전자의 발현을 촉진시켜 염증반응을 유도하는 반면, 세포보호단백질 발현을 유도하여 세포자연사 및 염증반응을 억제하기도 한다.

이에 허혈 및 재관류시와 허혈양상화 후 허혈 및 재관류시 앞정강근과 가자미근에서 일어나는 NF- κ B 면역반응의 변화양상을 관찰하고, 허혈양상화가 NF- κ B 면역반응 변화에 주는 영향을 관찰하고자 본 실험을 실시하였다.

실험동물은 250~300 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하였고, 정상대조군, 허혈양상화대조군, 2시간 허혈군, 4시간 허혈군, 허혈양상화 및 2시간 허혈군, 허혈양상화 및 4시간 허혈군으로 나누고 각 군은 재관류 경과시간에 따라 0, 1, 3, 6 및 24시간 경과군으로 세분하였다. 허혈양상화조작은 흰쥐용 혈관집게를 사용하여 왼쪽 온영덩동맥을 5분 폐색-5분 재관류 과정을 3회 반복하여 처리하였고, 허혈은 왼쪽 온영덩동맥을 2시간 또는 4시간 혈관집게로 폐색하였다. 각 실험군은 재관류 경과시간에 따라 희생시켜 앞정강근과 가자미근을 얻었다. NF- κ B 면역염색을 위해 6 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 염색을 시행하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군의 앞정강근에서 NF- κ B의 면역반응은 중등도 내지 강하게 나타났고, 가자미근에서는 약하게 나타났다.
2. 앞정강근의 근육섬유에서는 2시간과 4시간 허혈 후 NF- κ B의 면역반응이 감소되었고, 가자미근에서는 2시간 허혈 후 감소되었으나 4시간 허혈 후에는 정상대조군과 유사하였다.
3. 4시간 허혈 및 재관류시 나타나는 NF- κ B의 면역반응은 2시간 허혈 및 재관류시보다 강한 것으로 관찰되었다.
4. 허혈양상화로 2시간과 4시간 허혈 및 재관류시 나타나는 NF- κ B 면역반응 변화의 크기는 감소하였다.
5. 2시간과 4시간 허혈 및 재관류시 나타나는 NF- κ B 면역반응 변화는 가자미근보다 앞정강근에서 크게 나타났다.

이상을 종합하면, 뼈대근육에서 NF- κ B의 면역반응은 2시간 허혈 및 재관류시보다 4시간 허혈 및 재관류시, 또 가자미근보다 앞정강근에서 변화정도가 크게 나타났다. 허혈양상화로 허혈 및 재관류시 나타나는 근육섬유의 NF- κ B 면역반응의 변화가 감소되는 것으로 결론 지을 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 허혈 및 재관류, 흰쥐, 앞정강근, 가자미근, NF- κ B

서 론

조직에 대한 혈액공급의 차단은 세포의 미세구조와 분자구조 변화를 유발하고, 장기간 계속되면 세포손상은 비가역적인 세포괴사로 이어진다(Lipton 1999). 뼈대근육의 손상은 허혈된 조직에 혈액이 재관류된 뒤 처음 몇시간 사이에 발생한다(Gute 등 1998, Lipton 1999).

허혈 및 재관류시 형성되는 자유산소기는 세포손상(Becker와 Ambrosio 1987)과 세포자연사(Cheng 등, 1995)를 일으키는 주요한 인자로 알려져 있다. 허혈 및 재관류는 tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)- 1β , IL-6 같은 cytokine 유전자발현을 유도하며(Herskowitz 등 1995, Kubota 등 1997, Kukielka 등 1995), 염증세포의 과도한 침착과 체액성매개체(humoral mediator)의 방출은 세포손상을 가중시키며(Sullivan 등 2000), 재관류기간동안 일어나는 세포자연사는 신호전달체계의 활성화에 의해서 유도된다고 하였다(Gottlieb 등 1999).

허혈양상화는 짧은 시간의 허혈과 재관류를 반복적으로 경험시키는 과정으로 장기간의 허혈 및 재관류에 의해 일어나는 손상을 약화시킨다. 허혈양상화는 심장근육에서 재관류로 유도되는 부정맥(Das 등, 1999)과, 허혈 후 수축기능회복의 증가(Kimura 등, 1992)에 영향을 준다.

Nuclear factor kappa-B (NF- κ B)는 허혈 및 재관류시 활성화되는 주된 전사인자(transcription factor)로 여겨지고 있으며(May와 Ghosh, 1998), 재관류시 cytokine과 자유산소기의존성기전에 의해서 활성화된다고 알려져 있다. NF- κ B는 전염증성, 전혈액응고성, 혈관활성화 유전자의 전사를 촉진시켜 염증반응을 유도(Brown 등 1995)하는 반면, 세포의 종류에 따라서는 세포보호단백질 발현을 유도하여 세포자연사 및 염증반응을 억제하기도 한다(Cooper 등 1996).

Brennan 및 O'Neill(1998)은 NF- κ B 억제가 산화 자극(oxidative stress)에 대한 방어기전을 갖는다고 하였으며, Ho 등(1999)은 NF- κ B 억제가 허혈 및 재관류 손상에 대한 방어기전을 갖는다고 하였다. Maulik 등(1998)은 NF- κ B가 심장의 허혈양상화에

관여하며, 허혈 및 재관류시에도 활성화되어 핵으로 이동하여 세포자연사를 유도한다고 하였다. 허혈양상화는 NF- κ B 발현정도를 허혈 및 재관류시보다 더 증가시키며 이는 재관류시 일어나는 세포자연사를 감소시킨다고 하였다(Maulik 등 1999).

한편, Gardner 등(1984)과 Petrasek 등(1994)은 뼈대근육의 허혈 및 재관류 손상이 백색근육섬유에서 심하게 나타난다고 하였으나, Carvalho 등(1997)은 적색근육섬유에서 손상이 심하게 나타난다고 하였으며, Sternbengh와 Adelman(1992)은 두 섬유에서 손상의 차이가 없다고 하였다.

이에 뼈대근육에서 내성을 나타내는 것으로 알려진 2시간 허혈(Kuzon 등 1986, Harris 등 1986)과 비교적 장시간인 4시간 허혈 및 재관류시, 주로 적색근육섬유로 구성되어 있는 가자미근(soleus)과 주로 백색근육섬유로 구성되어 있는 앞정강근(tibialis anterior)에서 NF- κ B 발현양상을 관찰하고 허혈양상화가 NF- κ B 발현에 어떤 영향을 주는가를 연구하기 위하여 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 체중 250~300 g 내외의 건강한 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다.

실험동물은 대조군과 실험군으로 나누고, 대조군은 1) 정상대조군, 2) 허혈양상화군으로, 실험군은 3) 2시간 허혈군, 4) 4시간 허혈군, 5) 허혈양상화 및 2시간 허혈군, 6) 허혈양상화 및 4시간 허혈군으로 나누었다. 각 실험군은 재관류 경과시간에 따라서 0, 1, 3, 6 및 24시간 경과군으로 세분하였으며, 각 군당 5마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험처치

실험동물은 urethane (1.15 g/kg)을 생리식염수에 희석하여 2회로 나누어 복강주사하여 마취시킨 후 허혈을 실시하였다. 허혈양상화조작은 개복후 흰쥐용 혈관집게를 사용하여 왼쪽 온엉덩동맥(common

iliac artery)을 5분 폐색-5분 재관류 과정을 3회 반복하여 처리하였다. 허혈은 왼쪽 온엉덩동맥을 2시간 내지 4시간 혈관집게로 폐색하였고, 혈관집게를 제거하여 재관류시켰다. 허혈양상화 및 허혈근은 허혈양상화조작 후 곧바로 2시간 내지 4시간 허혈을 시행한 후 혈관집게를 제거하여 재관류시켰다. 마취된 실험동물은 처치 후 내지 허혈기간 및 재관류시 백열전등을 이용하여 체온을 유지시켰다. 허혈 또는 허혈양상화 및 허혈 후 재관류 경과시간에 따라 0, 1, 3, 6 및 24시간 뒤에 실험동물을 희생시켜 왼쪽 가자미근과 앞정강근을 적출하였다. 재관류 후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰다.

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

3. NF- κ B 면역조직화학 염색

NF- κ B의 면역반응을 관찰하기 위하여 제작한 파라핀절편을 탈파라핀 및 함수과정을 거친 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 세척하고 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액에 5분간 반응시킨 다음 0.4% pepsin 용액으로 37°C에서 30분간 반응시켰다. Blocking reagent를 37°C에서 40분간 적용 후 일차항체 mouse anti-NF- κ B (SantaCruz Biotechnology, USA)를 1:20으로 희석하여 37°C에서 90분 동안 반응시켰으며, 2차항체 biotinylated goat anti-mouse IgG (SantaCruz)를 실온에서 40분간 반응시킨 후 HRP streptavidin complex (SantaCruz) 용액으로 실온에서 30분간 적용하였다. DAB (3, 3'-diaminobenzidine, SantaCruz)로 7분간 발색시킨 다음 methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

일차항체의 최적농도를 알아보기 위하여 1:300, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40 및 1:20으로 희석하여 염색을 시행한 결과 1:20에서 최적의 반응을 나타내었다. 면역조직반응의 특이성을 확인하기 위하여 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색

Table 1. Immunoreactivities of NF- κ B in the ischemic reperfused tibialis anterior muscle of rat

| Reperfusion time (hour) | 0 | 1 | 3 | 6 | 24 |
|-------------------------|--------|--------|------|----|--------|
| Control | ++,+++ | | | | |
| IP | ++,+ | +,++ | +,++ | ++ | ++,+++ |
| 2H | ±,+ | + | ± | + | ±,+ |
| IP 2H | ++,+++ | + | ±,+ | ++ | + |
| 4H | +,++ | ++,+++ | +++ | ++ | ++,++ |
| IP 4H | ±,+ | + | ++ | + | + |

Abbreviations

IP : ischemic preconditioning

2H : ischemia for 2 hours

IP 2H : ischemia for 2 hours after ischemic preconditioning

4H : ischemia for 4 hours

IP 4H : ischemia for 2 hours after ischemic preconditioning

± : trace immunoreactivity, + : weak immunoreactivity,

++ : moderate immunoreactivity, +++ : strong immunoreactivity

Table 2. Immunoreactivities of NF- κ B in the ischemic reperfused soleus muscle of rat

| Reperfusion time (hour) | 0 | 1 | 3 | 6 | 24 |
|-------------------------|-----|------|--------|------|------|
| Control | + | | | | |
| IP | ±,+ | +,++ | +,++ | +,++ | + |
| 2H | ±,+ | + | ±,± | ±,+ | +,++ |
| IP 2H | + | ±,± | ±,+ | + | +,++ |
| 4H | + | ++ | ++,+++ | + | + |
| IP 4H | + | ±,+ | +,+ | +,++ | + |

Abbreviations

IP : ischemic preconditioning

2H : ischemia for 2 hours

IP 2H : ischemia for 2 hours after ischemic preconditioning

4H : ischemia for 4 hours

IP 4H : ischemia for 2 hours after ischemic preconditioning

± : trace immunoreactivity, + : weak immunoreactivity,

++ : moderate immunoreactivity, +++ : strong immunoreactivity

을 시행하였다.

각 군 근육의 중심부를 사진촬영하고 분석하였으며, 면역반응의 크기와 정도를 중심으로 음성반응(-), 미약한 양성반응(±), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++)과 강한 양성반응(+++)으로 구분하였으며, 각 군 및 각 군간의 변화는 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

결 과

1. NF- κ B 면역염색 소견

1) 대조군

(1) 정상대조군

① 앞정강근

일차항체를 적용하지 않고 반응을 한 정상대조군의 경우 음성반응이 나타났으며 (Figs. 1, 2) 일차항체를 적용한 정상대조군에서는 중등도 내지 강한 양성반응을 나타내었다 (Fig. 4).

② 가자미근

일차항체를 적용하지 않고 반응을 한 정상대조군의 경우 음성반응이 나타났으며 (Fig. 3), 일차항체를 적용한 정상대조군에서는 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 10).

(2) 허혈양상화 대조군

① 앞정강근

허혈양상화 후 0시간 경과군에서는 중등도의 양성반응이 나타났고, 일부에서 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 5). 허혈양상화 후 1시간 및 3시간 경과군에서는 경도 내지 중등도의 양성반응을 나타내었고 (Figs. 6, 7), 6시간 경과군에서는 중등도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 8). 24시간 경과군에서는 중등도 내지 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9).

② 가자미근

허혈양상화 후 0시간 경과군에서는 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 11), 1시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 나타내었으며 극히 일부에서 중등도의 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 12). 3시간 및 6시간 경과군에서는 경도 내지 중등도의 양성반응을 나타내었다 (Figs. 13, 14). 24시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 15).

2) 실험군

(1) 2시간 허혈군

① 앞정강근

2시간 허혈 후 재판류 0시간 경과군은 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 16), 재판

류 1시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 20). 재판류 3시간 경과시에는 미약한 반응을 나타내었다 (Fig. 24). 6시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 28), 24시간 경과시에는 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 32).

② 가자미근

2시간 허혈 후 재판류 0시간 경과군은 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 36), 1시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 40). 재판류 3시간 경과시에는 경도 내지 미약한 양성반응을 나타내었고 (Fig. 44), 6시간 경과시에는 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었으며 (Fig. 48), 24시간 경과시에는 경도 내지 중등도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 52).

(2) 허혈양상화 및 2시간 허혈군

① 앞정강근

허혈양상화 및 2시간 허혈군에서는 재판류 0시간 경과시 중등도 내지 강한 양성반응을 나타내었으나 정상대조군 (Fig. 4)보다는 약간 감소함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 17). 재판류 1시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 21), 3시간 경과시 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 25). 6시간 경과시에는 중등도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 29), 24시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 33).

② 가자미근

허혈양상화 및 2시간 허혈군에서는 재판류 0시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 37). 재판류 1시간 경과시에는 경도의 내지 미약한 양성반응을 나타내었고 (Fig. 41), 3시간 경과시에는 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 45). 6시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었고 (Fig. 49), 24시간 경과시에는 경도 내지 중등도의 양성반응을 보였다 (Fig. 53).

(3) 4시간 허혈군

① 앞정강근

4시간 허혈 후 재판류 0시간 경과시에는 경도 내지 중등도의 양성반응을 나타내었다 (Fig. 18). 1시간 경과시에는 중등도 내지 강한 양성반응을 나

타내었고(Fig. 22), 3시간 경과시에는 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 26). 6시간 경과군에서는 중등도의 양성반응을(Fig. 30), 24시간 경과군에서는 강한 양성반응을 보이는 곳이 다수 관찰되었으며, 일부에서 중등도의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 34).

② 가지미근

4시간 허혈 후 재관류 0시간 경과군은 경도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 38). 재관류 1시간 경과군에서는 중등도의 양성반응을 나타내었고(Fig. 42), 3시간 경과시에는 중등도 내지 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 46). 6시간 및 24시간 경과시에는 경도의 양성반응을 나타내었다(Figs. 50, 54).

(4) 허혈양상화 및 4시간 허혈군

① 앞정강근

허혈양상화 및 4시간 허혈군에서는 재관류 0시간 경과시 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 19). 재관류 1시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 나타내었고(Fig. 23), 3시간 경과군에서는 중등도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 27). 6시간 및 24시간 경과시에는 경도의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Figs. 31, 35).

② 가지미근

허혈양상화 및 4시간 허혈군에서는 재관류 0시간 경과시 경도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 39). 재관류 후 1시간 경과시에 미약한 내지 경도의 양성반응을 나타내었으며(Fig. 43), 3시간 경과시 중등도 내지 경도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 47). 6시간 경과군에서는 정도 내지 중등도의 양성반응을 나타내었고(Fig. 51), 24시간 경과군에서는 경도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 55).

고 찰

뼈대근육은 허혈에 대하여 비교적 내성이 있는 조직이나 장기간의 허혈 및 재관류시에는 손상을 받는다고 알려져 있다(Idström 등 1990). 근육에서는 허혈 및 재관류 후 adenosine, 산화질소(nitric oxide), 자유산소기 같은 혈관활성화 물질이 빠르게

생성된다(Baxter 등 1995).

Boyle 등(1999)은 허혈 및 재관류 손상을 일으키는 염증성 유전자의 유도는 전사인자(transcription factor)의 활성화와 관련이 있다고 하였고, May 및 Ghosh(1998)는 NF- κ B가 허혈 및 재관류시 활성화되는 주된 전사인자라고 하였으며, Brennan과 O'Neil(1998) 및 Ho 등(1999)은 NF- κ B 억제제가 *in vitro*에서 산화자극과 *in vivo*에서 허혈 및 재관류 손상에 대해 보호효과를 유도한다고 하였다. Das 등(1999)은 허혈 및 재관류로 유도되는 산화자극과 자유기(free radical)는 NF- κ B 활성화를 유도하며, 이는 항산화제에 의해서 차단된다고 하였고, Bowie와 O'Neil(2000)과 Mercurio와 Manning(1999)은 심장에서 허혈 및 재관류시 형성되는 자유기가 심장근육손상과 세포죽음을 유도하며, NF- κ B를 비롯한 IL-1 β , TNF- α , 염증성 매개체의 발현을 촉진시킨다고 하였다.

Boyle 등(1999)은 심장에서 일어나는 허혈 및 재관류 손상은 급성염증반응에 의해 일어나며, 내피세포의 활성화는 전염증성, 전혈액응고성, 혈관활성화 유전자 발현을 유도하므로, 이러한 유전자 발현을 억제시키면 심장근육의 허혈 및 재관류 손상을 약화시킬 수 있다고 하였고, Read 등(1994)은 이러한 유전자가 NF- κ B에 의해 부분적으로 조절된다고 하였다.

Murry 등(1986)은 짧은 허혈과 재관류의 반복이 장기간의 허혈로부터 세포손상을 막아준다고 하였고, 이러한 과정을 허혈양상화라 하였다. Das 등(1999)은 허혈양상화가 장기간의 허혈 및 재관류에 의해 생겨나는 여러 유해한 손상으로부터 세포를 보호하며 허혈양상화가 허혈 및 재관류 동안 생성되는 산화자극을 감소시켜서 세포자연사와 DNA 분절을 감소시킨다고 하였으며, 이러한 허혈양상화 효과가 NF- κ B 차단제나 DMTU 같은 반응성 수산화기 대사제(hydroxyl radical scavenger)에 의해서 파괴되는 것으로 보아 ROS(reactive oxygen species)와 NF- κ B가 허혈양상화에 중요한 역할을 하는 것 같다고 하였다.

전사인자 NF- κ B는 생리적 및 병리적 과정에 광범위하게 관여하는 Rel family에 속해 있으며, 일반

적으로 50 kDa (p50)과 65 kDa (p65)의 두 subunit으로 구성되어 있다. 대부분의 세포에서 억제단백질인 IκB와 결합된 비활성화 상태로 세포질 안에 존재하며 (O'Neil과 Kaltschmidt 1997), 산화자극 같은 자극에 의해서 IκB가 인산화되어 분해되면 NF-κB는 핵으로 이동하여 여러 가지 유전자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Brown 등 1993, Sun 등 1993).

NF-κB 활성화는 세포자연사를 억제 또는 촉진시킨다. 이러한 anti-apoptotic과 pro-apoptotic 성향은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있으며 NF-κB 활성화로 세포에서 일어나는 반응은 자극의 종류와 강도, 같이 유도되는 다른 전사인자의 활성화에 따라서 달라지는 것으로 생각되고 있다 (Grilli 등 1995, Lin 등 1999). Grilli와 Memo (1999)는 NF-κB가 pro-apoptotic 기능을 갖는 p53, bax 등의 유전자를 조절하기도 하며, bcl-2, bcl-xL 같은 anti-apoptotic 기능을 갖는 유전자를 조절한다고 하였다.

Morgan 등 (1999)은 NF-κB는 redox-sensitive 전사인자로 허혈양상화에 관여하며, 허혈양상화나 허혈 및 재판류 동안에 일어나는 NF-κB의 활성화가 Bcl-2, Bcl-xL 같은 anti-apoptotic 유전자 발현을 매개하는 것 같다고 하였고, 허혈양상화 없이 허혈 및 재판류만 시행한 경우에 NF-κB 활성화는 주로 전염증성 유전자를 발현시키고, 허혈양상화 기간 동안의 NF-κB 활성화는 세포보호 유전자 발현을 유도한다고 하였으며, 허혈양상화 기간 동안의 NF-κB활성화로 유도된 세포보호 단백질이 허혈 및 재판류 동안 활성화되는 NF-κB 활성화를 억제하여 세포를 보호한다고 하였다.

한편, 뼈대근육세포는 수축능력과 효소분포에 따라 빠른속도로 수축하는 해당근육섬유 (fast-twitch glycolytic fiber), 빠른속도로 수축하는 산화해당근육섬유 (fast-twitch oxidative-glycolytic fiber) 및 느린속도로 수축하는 산화섬유 (slow-twitch oxidative fiber)로 분류할 수 있다. 근육섬유종류에 따른 허혈내성에 관한 의견은 연구자에 따라서 다른 의견을 보이고 있다. Hintz 등 (1980)은 백색근육이 적색근육에 비해 혐기성상태에서 ATP 항상성을 장기간 유지시킬 수 있다고 하였으며, Hochachka (1985)는

혐기성상태에서 백색근육이 허혈에 대한 내성이 있어야 한다고 하였고, Jennische 등 (1979)과 Jennische (1982)는 빠른수축근육이 허혈에 더 내성을 갖는다고 한 반면, Petrasek (1994)은 느린수축근육이 허혈에 더 내성이 있다고 하였다. Idström 등 (1990)은 근육섬유종류에 따른 허혈손상의 차이가 없다고 하였으나, Carvalho 등 (1997)은 긴발가락편근과 가자미근에서의 2시간 허혈로 ATP가 감소하며 2시간 재판류후 가자미근에서는 정상의 70%, 긴발가락편근에서는 정상의 60%까지 ATP 양이 회복된다고 하였으며, 3시간 허혈시 ATP 감소는 긴발가락편근에서 미약하게 나타나며 근육의 대사 및 기능 유지에 근육섬유의 종류와 허혈시간이 중요한 요소로 작용한다고 하였다. Mattei 등 (2000)은 빠른수축근육섬유로 이루어진 긴발가락편근과 느린수축근육섬유로 이루어진 가자미근 모두에서 허혈양상화가 허혈 후 근육기능을 향상시킨다고 하였으며, 허혈양상화 효과차이는 주로 해당근육섬유로 이루어진 긴발가락편근이 산화근육섬유로 이루어진 가자미근보다 허혈내성을 더 갖는다고 하였으며, 이러한 차이는 두 근육섬유 종류에 따른 에너지대사의 차이에서 유래되는 것 같다고 하였다.

조근열 (1998)은 백색근육섬유가 전체 부피의 85%를 차지하는 앞정강근과 적색근육섬유가 89%를 차지하는 가자미근 (Amstrong과 Phelps 1984)의 허혈 및 재판류 손상은 허혈시간과 재판류 경과시간에 따라 손상이 심하게 나타나고 가자미근보다 앞정강근에서 손상이 심하게 나타난다고 하였으며, 이러한 손상의 차이는 SOD (superoxide dismutase) 활성변동과 관련이 있다고 하였다. 안동춘 (1999)은 허혈양상화는 단면적이 적은 적색근육세포와 단면적이 큰 백색근육섬유에서 SOD 활성을 증가시키며 허혈양상화 후 허혈 및 재판류에 따르는 SOD 활성은 단면적이 적은 적색근육섬유에서 두드러진다고 하였으며 이러한 SOD 활성이 세포자연사를 감소시킨다고 하였다.

본 실험에서는 허혈 및 재판류시 NF-κB 면역반응과 허혈양상화가 어떤 영향을 주는가를 백색근육섬유로 이루어진 앞정강근과 적색근육섬유로 이루어진 가자미근에서 관찰하였다.

허혈양상화만을 시행한 경우, 앞정강근에서 NF- κ B는 0, 1, 3 및 6시간 경과시에는 정상대조군보다 감소하나 24시간 경과시에는 정상대조군과 비슷한 수준으로 증가함을 관찰할 수 있었다. 가자미근의 경우 0, 1, 3, 6 및 24시간 경과군 모두에서 약간 증가하는 경향을 보이기는 하나 정상대조군과 비슷한 면역반응 수준을 유지함을 관찰할 수 있었다.

2시간 허혈시 앞정강근, 가자미근 모두에서 정상대조군보다 NF- κ B는 감소하였으며, 재관류 24시간 경과시 앞정강근에서는 NF- κ B가 정상대조군 수준으로 회복되지 못하였으나, 가자미근의 경우 24시간 경과시 NF- κ B가 정상대조군 수준으로 회복됨을 관찰할 수 있었다.

4시간 허혈시 앞정강근에서는 0시간 및 1시간 경과시 NF- κ B가 감소하였으며 3, 6 및 24시간 경과시 정상대조군 수준으로 회복되었다. 가자미근에서는 0, 1 및 3시간 경과시까지의 증가하였다가 6시간 및 24시간 경과시 정상대조군 수준으로 회복됨을 관찰할 수 있었고, 변화의 폭은 앞정강근에서 컸다. 두 근육에서 2시간 보다 4시간 허혈시 NF- κ B의 면역반응이 높게 나타나는 것은 허혈 자극으로 발현되는 NF- κ B가 4시간까지 지속되어 점점 증가된것이거나 심한 손상을 유발할 수 있는 4시간 허혈시의 자극이 NF- κ B의 발현을 증가시켜 보호작용을 유도하기 때문인 것으로 생각되었다. 재관류시간 경과에 따라 나타나는 NF- κ B의 면역반응도 4시간 허혈후가 더욱 크게 나타났다. 2시간 허혈시가 가역적인 변화이고 4시간 허혈시 심한 손상이 나타나는 것을 고려할 때 증가정도의 차이가 세포손상을 유도하는 NF- κ B의 활성화와 연관있는 것으로 생각되었다. 2시간 내지 4시간 허혈 및 재관류시 나타나는 NF- κ B 면역반응의 증가와 감소는 가자미근보다 앞정강근에서 더욱 심하게 나타났다.

허혈양상화 및 2시간 또는 4시간 허혈을 실시한 경우, 앞정강근에서는 허혈만을 실시했을 때보다 재관류 경과시간에 따른 NF- κ B 변동의 폭이 작아졌으나 24시간 경과시에도 정상대조군 수준으로 회복되지는 못하였다. 가자미근의 경우 허혈만을 시행한 군보다 재관류 경과시간에 따른 NF- κ B 변

동의 폭이 감소하였으며, 24시간 경과시 NF- κ B 면역반응은 정상대조군 수준으로 회복됨을 관찰할 수 있었다.

허혈양상화군과 허혈 및 재관류군 모두에서 NF- κ B의 분포 변화는 앞정강근보다 가자미근에서 작았으며, 허혈 및 재관류시 NF- κ B 변화의 양상은 두 근육에서 비슷하였으나, 변화의 폭은 앞정강근이 가자미근보다 큼을 알 수 있었다.

NF- κ B는 허혈양상화과정과 허혈 및 재관류로 유도되는 전사인자로 세포자연사를 촉진 또는 억제시켜 준다고 알려져 있다. 허혈양상화가 허혈 및 재관류 손상을 막아주며 (Murry 등 1986), 허혈양상화 동안 유도되는 NF- κ B 활성화가 세포보호단백질 생성을 유도하며, 재관류 동안 유도되는 NF- κ B 활성화를 억제한다는 점 (Morgan 등 1999)을 고려할 때, 본 실험에서 허혈양상화 또는 허혈 및 재관류 동안의 NF- κ B 면역반응의 변화는 세포손상과 세포보호에 작용한다고 생각할 수 있었고 2시간 허혈이 가역적인 손상을 주며, 4시간 허혈은 심한 손상을 준다는 점 (Jennische와 Hansson 1986, Idström 등 1990)과 2시간 허혈군에서 재관류 경과시간에 따른 NF- κ B 변화의 폭이 4시간 허혈군보다 적은 점을 고려하였을 때 NF- κ B 변화의 폭이 적은 것이 세포보호기전에 관여하며, 변화의 폭이 큰 경우는 세포손상에 관여하는 것으로 생각할 수 있었고, 또한 허혈양상화는 2시간 허혈시에는 NF- κ B가 심하게 감소되는 것을, 4시간 허혈군에서는 NF- κ B 심하게 증가하는 것을 막아준다고 생각할 수 있었다. 즉 허혈양상화가 허혈 및 재관류시 변하는 세포질내의 NF- κ B를 일정수준으로 유지시켜 재관류 손상에 대한 보호기전을 유도하는 것으로 생각할 수 있었다.

NF- κ B 변화의 양상은 앞정강근과 가자미근에서 비슷하였으나 허혈양상화나 허혈 및 재관류군 모두에서 NF- κ B 변화의 폭이 앞정강근에서 컸다는 점과 가자미근보다 앞정강근에서 허혈 및 재관류 손상이 크다는 점 (조근열 1999, 안동춘 1999)을 고려할 때 NF- κ B 변화의 폭이 적은 것이 세포손상을 감소시켜 주는 기전과 관련이 있을 것으로 생각되었다.

본 실험에서는 NF- κ B의 활성화 형태나 비활성화 상태를 확인하지는 못하였으며, 다만 세포질에서의 NF- κ B 번역반응의 변화양상만을 관찰할 수 있었다. 앞으로 활성화된 NF- κ B의 번역반응과 그에 따른 TUNEL 방법을 통한 세포자연사를 규명하는 연구가 계속되어야 하겠다.

이상의 결과에서 뼈대근육에서 NF- κ B의 번역반응은 2시간 허혈 및 재관류시보다 4시간 허혈 및 재관류시, 또 가자미근보다 앞정강근에서 변화가 심하게 나타났다. 허혈양상화로 허혈 및 재관류시 나타나는 근육섬유의 NF- κ B 번역반응의 변화는 약하게 나타나는 것으로 결론 지을 수 있었다.

참고 문헌

- 안동춘 : 허혈양상화와 KATP 통로가 허혈 후 재관류된 흰쥐의 골격근육에서 SOD활성 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한수의학회지 39 : 878-895, 1999.
- 조근열 : 허혈 및 재관류후 흰쥐 앞정강근과 가자미근에서 나타나는 미세구조의 변화. 대한체질인류학회지 12 : 257-276, 1999.
- Armstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. Am J Anat 171 : 259-272, 1984.
- 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.
- Becker LC, Ambrosio G : Myocardial consequences of reperfusion. Prog Cardiovasc Dis 30 : 23-44, 1987.
- Bowie A, O'Neill LA : Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Pharmacol 59 : 13-23, 2000.
- Boyle EM Jr, Canty TG Jr, Morgan EN, Yun W, Pohlman TH, Verrier ED : Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. Ann Thorac Surg 68 : 1949-1953, 1999.
- Brennan P, O'Neill LA : Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells-mechanism of action of nordihydroguaiartic acid, curcumin and thiol modifiers. Biochem Pharmacol 55 : 965-973, 1998.
- Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U : Control of IkBa proteolysis by site specific, signal induced phosphorylation. Science 267 : 1485-1488, 1995.
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U : Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I kappa B-alpha. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 2532-2536, 1993.
- 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.
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P : Stretch-induced programmed myocyte cell death. J Clin Invest 96 : 2247-2259, 1995.
- Cooper JT, Stroka DM, Brostjan C, Palmetshofer A, Bach FH, Ferran C : A20 blocks endothelial cell activation through a NF- κ B dependent mechanism. J Biol Chem 271 : 18068-18073, 1996.
- Das DK, Engelman RM, Maulik N : Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. Ann N Y Acad Sci 874 : 49-65, 1999.
- Gardner VO, Caiozzo J, Long S, Stoffel J, McMaster WC, Prietto CA : Contractile properties of slow and fast muscle following tourniquet ischemia. Am J Sports Med 22 : 417-423, 1984.
- Gottlieb TA, Engler RL : Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. Ann NY Acad Sci 874 : 412-426, 1999.
- Grilli M, Memo M : Nuclear factor- κ B/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. Biochem Pharmacol 57 : 1-7, 1999.
- Grilli M, Ribola M, Alberici A, Valerio A, Memo M, Spano P : Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. J Biol Chem 270 : 26774-26777, 1995.
- Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ : Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Mol Cell Biochem 179 : 169-187, 1998.
- Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N : Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. Am J Physiol 250 : H213-H220, 1986.

- Herskowitz A, S Choi, AA Ansari, Wesselingh : Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfusion myocardium. *Am J Pathol* 146 : 419-429, 1995.
- Hintz CS, Lowry CV, Kaiser KK, McKee D, Lowry OH : Enzyme levels in individual rat muscle fibers. *Am J Physiol* 239 : C58-65, 1980.
- Ho E, Chen G, Bray TM : Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FABSB J* 13 : 1845-1854, 1999.
- Hochachka PW : Fuels and pathways as designed systems for support of muscle work. *J Exp Biol* 115 : 149-164, 1985.
- 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 : H1668-1673, 1990.
- Jennische E, Amundson B, Haljamae H : Metabolic responses in feline "red" and "white" skeletal muscle to shock and ischemia. *Acta Physiol Scand* 106 : 39-45, 1979.
- Jennische E, Hansson HA : Postischemic skeletal muscle injury: patterns of injury in relation to adequacy of reperfusion. *Exp Mol Pathol* 44 : 272-280, 1986.
- Jennische E : Relation between membrane potential and lactate in gastrocnemius and soleus muscle of the cat during tourniquet ischemia and postischemic reflow. *Pflugers Arch* 394 : 329-332, 1982.
- Kimura Y, Lyengar J, Subramanian R, Cordis GA, Das DK : Myocardial adaptation by repeated short term ischemia reduces post-ischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol* 87 : 128-138, 1992.
- Kubota T, CF McTiernan, CS Frye, SE Slawson, BH Lemster, AP Koretsky, AM Feldman : Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 81 : 627-635, 1997.
- Kukielka GL, CW Smith, GJ LaRosa, AM Manning, LH Mendoza, TJ Daly, BJ Hughes, KA Youker, HK Hawkins, LH Michael : Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion *in vivo*. *J Clin Invest* 95 : 89-103, 1995.
- Kuzon Jr WM, Walker PM, Mickle DAG, Harris KA, Pynn BR and McKee NH : An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies. *J Surg Res* 41 : 24-32, 1986.
- Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, Scheinman RI : NF- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ* 6 : 570-582, 1999.
- Lipton P : Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 : 1431-1568, 1999.
- 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.
- Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Joseph E Flack III, David Deaton, Dipak K Das : Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 100[suppl II] : 369-375, 1999.
- Maulik N, S Motoaki, BD Price, DK Das : An essential role of NF B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett* 429 : 365-369, 1998.
- May MJ, Ghosh S : Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 19 : 80-88, 1998.
- Mercurio F, Manning AM : NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18 : 6163-6171, 1999.
- Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG Jr, Pohlman TH, Verrier ED : An essential role for NF- κ B in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg* 68 : 377-382, 1999.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124-1136, 1986.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C : NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20 : 252-258, 1997.
- Petrasek PT, Homer-Vanniasin Kam S, Walker PM : Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 19 : 623-631, 1994.
- Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T : NF- κ B and I κ B: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 179 : 503-512, 1994.
- Sternbergh WC 3rd, Adelman B : Skeletal muscle fiber type does not predict sensitivity to postischemic damage. *J Surg Res* 53 : 535-541, 1992.
- Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J : The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 67 : 591-602,

2000.
Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC : NF-kappa B
controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence

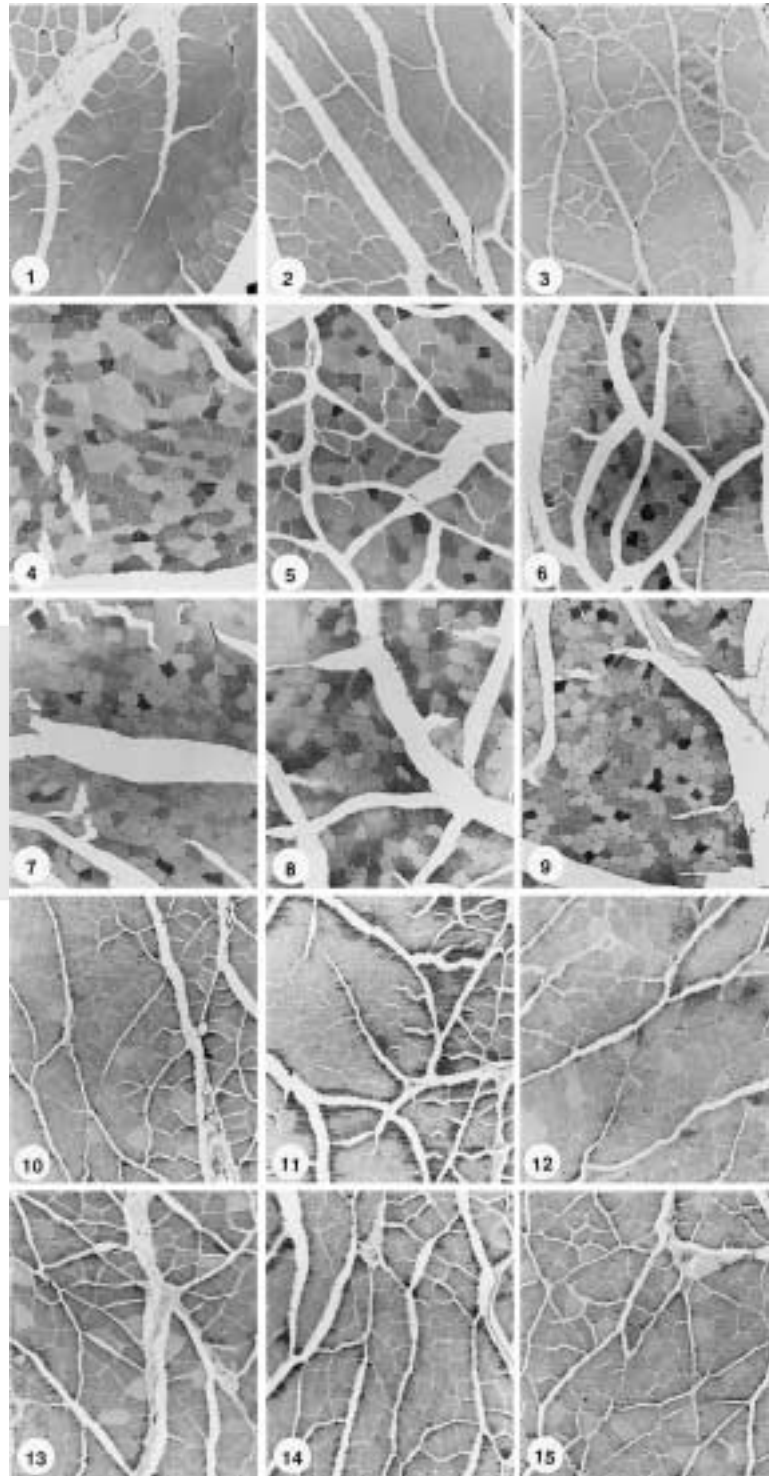
for an inducible autoregulatory pathway. Science 259 :
1912-1915, 1993.

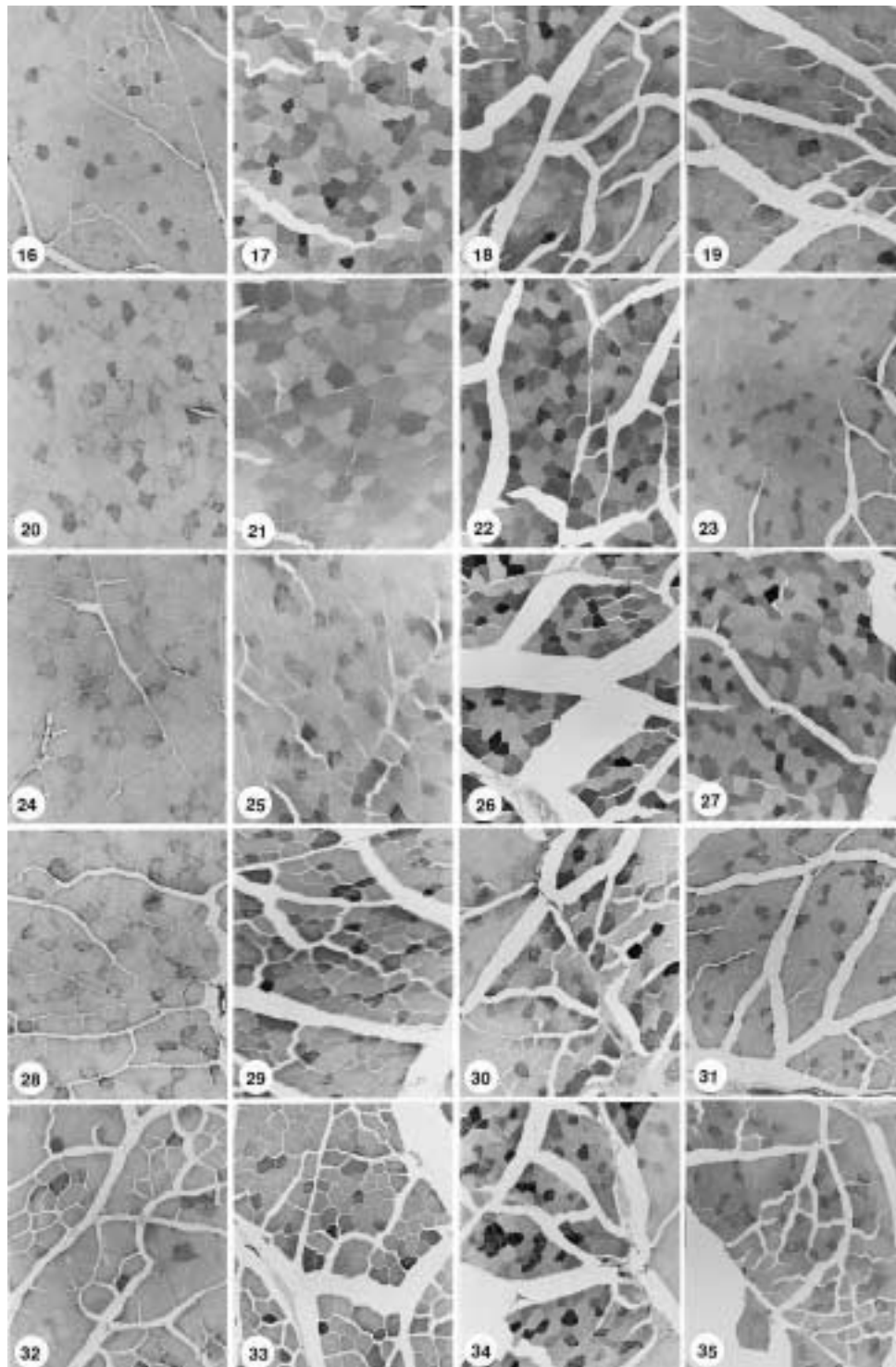
K C I

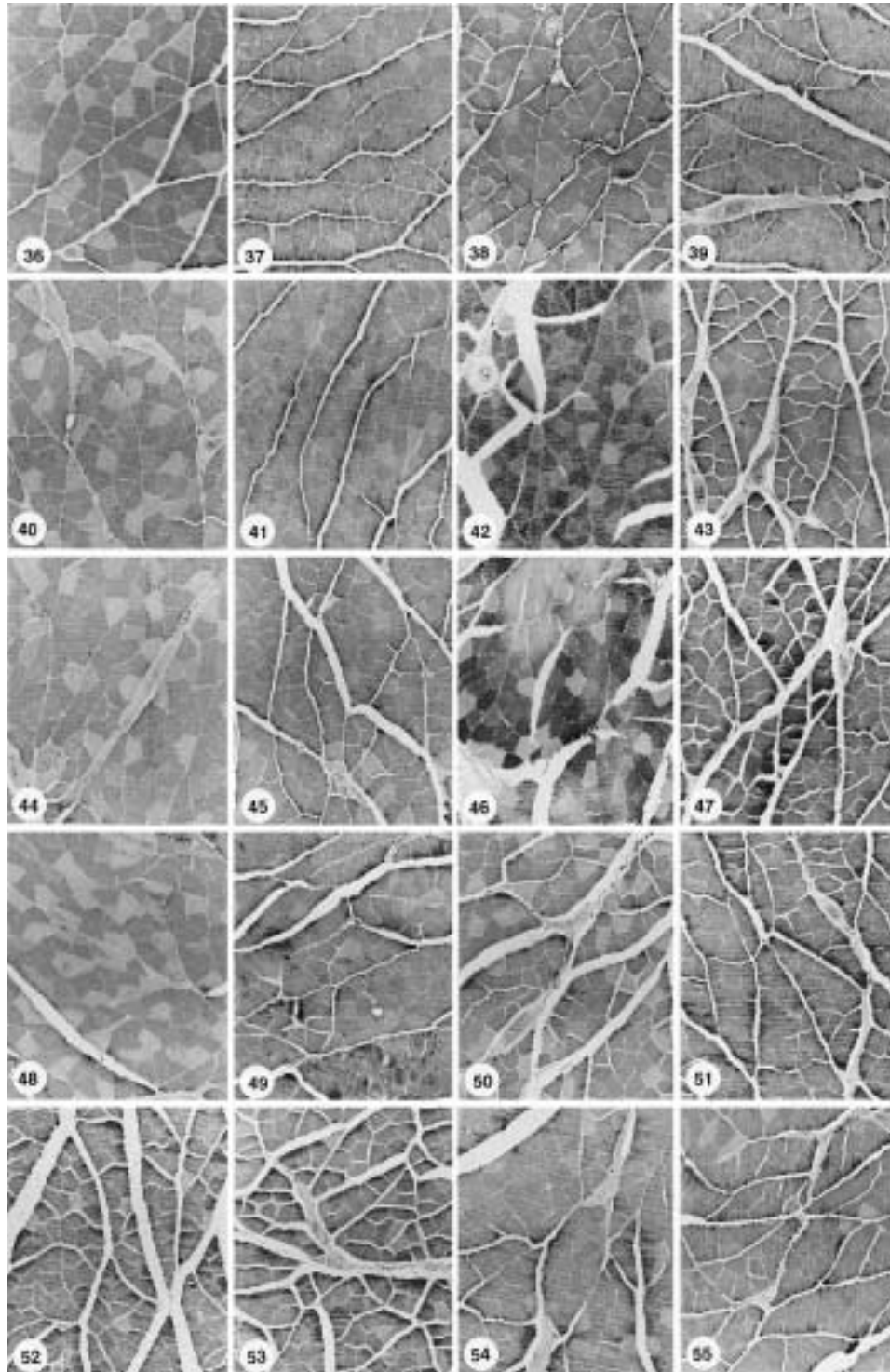
Legends for Figures

- Fig. 1, 2.** NF- κ B immunoreactivities on cross section of tibialis anterior m. in the control rat. There are no activities on the muscle fiber in negative staining.
- Fig. 3.** NF- κ B immunoreactivities on cross section of soleus m. in the control rat. There are no activities on the muscle fiber in negative staining.
- Fig. 4.** NF- κ B immunoreactivities on cross section of tibialis anterior m. in the control rat. Moderate or strong activities are seen.
- Fig. 5.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m. after ischemic preconditioning. Moderate or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 6.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 1 hour after ischemic preconditioning. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 7.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 3 hours after ischemic preconditioning. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 8.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 6 hours after ischemic preconditioning. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 9.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 24 hours after ischemic preconditioning. Moderate or strong immunoreactivities are observed.
- Fig. 10.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. of the control rat. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 11.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. after ischemic preconditioning. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 12.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 1 hour after ischemic preconditioning. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 13.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 3 hours after ischemic preconditioning. Weak or moderate activities are seen.
- Fig. 14.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 6 hours after ischemic preconditioning. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 15.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 24 hours after ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 16.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m. after 2 hours ischemia. Trace or Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 17.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m. after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Moderate or strong immunoreactivities are observed but immunoreactivities are lower than that of control.
- Fig. 18.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m. after 4 hours ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 19.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m. after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 20.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 21.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 22.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 1 hour reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate or strong immunoreactivities are observed.
- Fig. 23.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 1 hour reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 24.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 25.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Trace or weak activities are seen.
- Fig. 26.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 3 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Strong immunoreactivities are observed.
- Fig. 27.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 3 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 28.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 6 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 29.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 6 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 30.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 6 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.

- Fig. 31.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 6 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 32.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 24 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 33.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 24 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 34.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 24 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Strong or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 35.** NF- κ B immunoreactivities on tibialis anterior m., 24 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 36.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. after 2 hours ischemia. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 37.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 38.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. after 4 hours ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 39.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m. after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 40.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 41.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak or trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 42.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 1 hour reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 43.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 1 hour reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 44.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Weak or trace immunoreactivities are observed.
- Fig. 45.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 46.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 3 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate or strong immunoreactivities are observed.
- Fig. 47.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 3 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Moderate or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 48.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 6 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Trace or weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 49.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 6 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.
- Fig. 50.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 6 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 51.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 6 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak or Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 52.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 24 hours reperfusion after 2 hours ischemia. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 53.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 24 hours reperfusion after 2 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak or moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 54.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 24 hours reperfusion after 4 hours ischemia. Moderate immunoreactivities are observed.
- Fig. 55.** NF- κ B immunoreactivities on soleus m., 24 hours reperfusion after 4 hours ischemia with ischemic preconditioning. Weak immunoreactivities are observed.







Abstract

Alteration of NF- κ B in Ischemic-reperfused Anterior Tibialis and Soleus Muscles of Rats

Youn Kyoung Seo, Doo Jin Paik

Department of Anatomy and cell biology, College of medicine, Hanyang University.

In skeletal muscles, oxygen free radicals generated during ischemia-reperfusion are known as inducers that cause cellular injury and apoptosis and contribute to the pathogenesis of reperfusion injury. Ischemia-reperfusion for 2 hours may cause reversible changes, while prolonged ischemia-reperfusion causes irreversible changes.

Following ischemia-reperfusion, diverse signals are transduced to induce a variety of gene expression. Ischemic preconditioning, defined as brief episodes of ischemia and reperfusion, is known to provide protection from the consequences of prolonged ischemia followed by reperfusion.

NF- κ B is a transcription factor that activated during ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion. It initiates inflammation through inducing transcription of proinflammatory, procoagulant and vasoactive gene, while mediates the expression of cytoprotective proteins that block apoptosis or inhibit inflammation.

The present study was performed to study the change of NF- κ B immunoreactivity in rat anterior tibialis and soleus muscles in response to ischemia-reperfusion and preconditioning.

Experimental animals, Sprague-Dawley rats (250~300 g), were divided into 6 groups; 1) control, 2) ischemic preconditioning, 3) 2 hours of ischemia, 4) 4 hours of ischemia, 5) 2 hours of ischemia after ischemic preconditioning, 6) 4 hours ischemia after ischemic preconditioning. For ischemic preconditioning, left common iliac artery was occluded three times for 5 minutes followed by 5 minutes of reperfusion using vascular clamp. Ischemia was done by occlusion of the same artery for 2 or 4 hours. The specimens of tibialis anterior and soleus muscles were obtained 0, 1, 3, 6, and 24 hours after onset of reperfusion. The specimens were paraffin sectioned at 6 μ m and NF- κ B expression was examined using immunohistochemical methods.

The results obtained were as follows :

1. In normal control group, immunoreactivity of NF- κ B was moderate to strong in tibialis anterior muscles and weak in soleus muscles.
2. In tibialis anterior, immunoreactivity of NF- κ B was decreased in 2 and 4 hours of ischemia compared with normal control group. In soleus muscle, immunoreactivity of NF- κ B was decreased in 2 hours of ischemia but it was comparable to that of normal control group in 4 hours of ischemia.
3. Ischemia for 4 hours induced more remarkable change in NF- κ B immunoreactivity than that for 2 hours.
4. After ischemic preconditioning, changes in NF- κ B immunoreactivity after 2 and 4 hours of ischemia were decreased compared with normal control group.
5. In ischemia for 2 and 4 hours, changes in NF- κ B immunoreactivity of tibialis anterior muscles were more severe than that of soleus muscles.

These results suggest that in the skeletal muscle, changes in NF- κ B immunoreactivity of 4 hours of ischemia were more remarkable than that of 2 hours ischemia, and changes in NF- κ B of tibialis anterior muscles were more remarkable than that of soleus muscles. Ischemic preconditioning attenuated the alteration of the NF- κ B immunoreactivity induced by ischemia-reperfusion in the muscles.

Key words : Ischemia and reperfusion, Rat, Tibialis anterior, Soleus, NF- κ B