

반복적인 허혈양상화가 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 Akt 인산화와 HSP72, HSP90의 발현에 미치는 영향

서윤경, 서대용, 전수경, 박현주, 백두진
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 허혈양상화 횟수가 증가함에 따라 세포를 보호하는 것으로 알려진 Akt의 인산화와 heat shock protein (HSP72) 72, HSP90의 발현의 변화를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 대조군과 허혈양상화군으로 나누었고, 허혈양상화군은 원온영덩동맥을 5분 허혈과 5분 재관류하는 과정을 3회, 6회, 10회 반복하여 실시하였다. 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 경과 후에 원앞정강근과 원가자미근을 적출한 뒤, phospho-Akt와 HSP72, HSP90의 면역조직화학염색과 Western blot 분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Akt 인산화는 허혈양상화 3회군과 6회군에서는 재관류 직후와 3시간에 대조군보다 증가하였고, 10회군에서는 3회와 6회군보다 낮게 관찰되었다. 재관류 72시간에는 3회와 6회, 10회군 사이의 차이가 없었다. Akt 인산화는 앞정강근보다 가자미근에서 많이 관찰되었다. HSP72는 재관류 직후와 3시간에 허혈양상화 3회군에서 가장 많이 증가하였고, 10회군에서 가장 낮게 관찰되었다. 재관류 72시간에 3회와 6회, 10회군 사이의 차이가 없었다. HSP72는 앞정강근보다 가자미근에서 많이 관찰되었다. HSP90은 허혈양상화 3회군과 6회군에서는 재관류 직후와 3시간에 대조군보다 증가하였고, 10회군에서는 3회와 6회군보다 낮게 관찰되었다. 재관류 24시간에 3회와 6회, 10회군 사이의 차이는 크지 않았다. HSP90은 앞정강근보다 가자미근에서 많이 관찰되었다.

이상의 결과로, 허혈양상화는 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 재관류 초기에 Akt 인산화와 HSP72, HSP90의 발현을 증가시키고, 허혈양상화 횟수를 증가시키는 것은 재관류 초기에 이들의 발현을 효과적으로 유도하지 못하는 것으로 생각되었다.

찾아보기 낱말 : 허혈양상화, 횟수, 앞정강근, 가자미근, Akt, HSP72, HSP90

서 론

허혈양상화 (ischemic preconditioning)는 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 과정으로 (Murry 등 1986), 허혈자극에 대한 내성을 길러준다고 알려져 있다. 짧은 허혈과 재관류의 반복 횟수는 연구자마다 차이가 있으나, 5분 허혈시키고 5분 재관류하는 과정

을 3회하는 방법이 많이 사용되고 있다 (Mattei 등 2000, Seo 등 2003, Muscari 등 2004).

허혈양상화로 유도되는 허혈내성의 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, 짧은 허혈과 재관류의 반복은 세포생존에 중요한 역할을 하는 Akt와 heat shock proteins (HSPs)의 발현을 증가시키는데 관여하며 (Bijur와 Jope 2000), 세포내에서 Akt와 결합하여 복합체를 형성하는 HSP90은, Akt의 활성화와 세포자멸사를 조절한다고 알려져 있다 (Zhang 등 2005).

허혈과 재관류시 생성되는 활성산소기는 Akt의

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

serine 473을 인산화시키며, 활성화된 Akt는 허혈손상을 감소시킨다 (Matsui 등 2001, Toth 등 2003). Kis 등 (2003)은 허혈양상화를 실시하면 Akt 인산화가 증가하여 심장의 허혈손상을 감소시킨다고 하였고, Zhou 등 (2000)은 Akt가 대뇌 허혈시 세포자멸사를 감소시킨다고 하였다.

HSPs은 단백질의 변성과 응집을 방지하고 단백질의 접힘 (folding)과 재접힘 (refolding)을 조절하고 손상된 단백질을 파괴하는 과정을 조절하여 열이나 에탄올, 산화 자극, 허혈같은 상황에 세포가 적응하도록 도와준다 (Bakau와 Horwich 1998).

HSP72는 열이나 허혈 자극에 노출되었을 때 증가하여 세포자멸사를 억제하고 세포의 생존률을 증가시키는 것으로 알려져 있다. Marber 등 (1995)은 HSP72 유전자가 과발현되는 생쥐의 심장을 허혈시키면 심장근육의 회복이 빨라지고, 경색 크기도 감소한다고 하였다. HSP90은 단백질의 활성화와 대체를 조절한다고 알려져 있으며 (Pratt와 Toft 2003), Nayeem 등 (1997)은 열 자극으로 증가된 HSP90이 심장의 허혈손상을 감소시킨다고 하였고, Bartling 등 (2003)은 허혈양상화가 심장에서 HSP90을 증가시킨다고 하였다.

뼈대근육은 수축과 이완이 계속 일어나는 조직으로, 이러한 작용은 세포내 에너지 변화와 산화적 자극을 유발한다. 이러한 환경변화는 HSP72의 발현을 유도하여 뼈대근육세포의 항상성을 유지시키며 (Locke 등 1991), 활성산소기에 의해 유도된 Akt는 세포손상을 감소시킨다고 알려져 있다 (Noshita 등 2003). 뼈대근육은 백색근육섬유와 적색근육섬유가 혼합된 조직으로, 근육마다 섬유의 조성비율과 에너지를 이용하는 방법, 사립체의 양, 피로도와 회복도에 차이가 있다고 알려져 있다 (Lindsay 등 1990).

이에 저자들은 흰쥐의 뼈대근육 중, 섬유의 85%가 백색근육섬유로 구성된 앞정강근과 섬유의 89%가 적색근육섬유로 구성된 가자미근 (Amstrong과 Phelps 1984)에서 허혈양상화 횟수를 증가시키는 것이 Akt 인산화와 HSP72, HSP90의 발현에 미치는 영향의 차이를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (Daehan Biolink, Korea)를 사용하여 정상대조군과 허혈양상화군으로 나누었다. 허혈양상화군은 짧은 허혈과 재판류의 반복 횟수에 따라 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 각 실험군은 마지막 처치 후 재판류 0시간, 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 각 군당 6마리씩 모두 96마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험처치

우레탄을 생리식염수에 희석하여 15분 간격으로 2회 복강내 주사하여 (1.15 g/kg) 실험동물을 마취시킨 후 실험을 실시하였다. 허혈양상화는 실험동물의 배 안을 연 후, 왼은덩동맥을 흰쥐용 혈관집게로 5분 동안 묶은 뒤 5분 동안 풀어주는 과정을 3회, 6회, 10회 반복하여 실시하였다. 정상대조군의 실험동물은 배안을 연 후 아무런 처치를 하지 않았다.

실험처치가 끝난 뒤에 혈관집게를 제거하여 재판류시켰으며, 재판류 직후 (0시간)와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 뒤에 실험동물을 경추탈골로 희생시켜 원상정강근과 원가자미근을 얻었다. 전기담요를 이용하여 실험기간 동안 실험동물의 체온을 유지시켜 주었다.

앞정강근과 가자미근의 몸쪽부위는 액화질소를 이용하여 곧바로 얼린 후 Western blot analysis를 하기 전까지 -70°C 에 보관하였다. 근육의 먼쪽 부위는 면역조직화학염색을 시행하기 위해 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 18시간 동안 고정시킨 후 일상적인 방법으로 $6\mu\text{m}$ 의 파라핀절편을 만들었다.

3. 면역조직화학염색

크실렌 (xylene)으로 파라핀절편의 파라핀을 제거하고 함수시킨 뒤, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 증류수로 세척하였다. 3% 과산화수소-메

탄을 혼합용액으로 5분 동안 처리한 후, 0.4% pepsin 용액 (Sigma, USA)으로 실온에서 8분 동안 반응시켰다.

phospho-Akt 면역조직화학염색을 위해 rabbit blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 산양의 정상혈청 15 μ L/mL)으로 37°C에서 1시간, rabbit anti-phospho-Akt 항체 (Ser 473, 1 : 50, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 blocking 용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. HSP72와 HSP90 면역조직화학염색을 위해 goat blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 토끼의 정상혈청 15 μ L/mL)으로 37°C에서 1시간, goat anti-HSP72 항체 (1 : 40, Santa Cruz Biotechnology)와 goat anti-HSP90 항체 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology)를 blocking 용액에 각각 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 2차 항체, goat anti-rabbit IgG 항체와 rabbit anti-goat IgG 항체 (Vector Laboratory, USA)를 PBS에 1 : 1000 비율로 희석하여 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory)으로 실온에서 30분 동안 처리하였다. DAB kit (Vector Laboratory)를 이용하여 발색시켰으며, 1% 메칠그린용액으로 대조염색 후 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다.

근육의 중심부를 사진촬영하여 면역염색반응 정도에 따라, 음성반응 (-), 미약한 양성반응 (\pm), 경도의 양성반응 (+), 중등도 양성반응 (++) , 강한 양성반응 (+++)으로 정하여 Table 1과 2, 3에 정리하였다.

4. Western blot analysis

막자사발을 이용하여 근육조직을 잘게 부순 뒤, 단백질을 분해효소 억제제 (PMSF 1.0 mM, EDTA 1.0 mM, pepstatin A 1 μ M, leupeptin 1 μ M, aprotinin 0.1 μ M)가 포함된 단백질 추출 용액 (iNtRON Biotechnology, Korea)을 근육조직 0.05 g당 1 mL씩 첨가한 뒤 homogenizer (Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 13,500 rpm에서 10초씩 2회, 얼음 위에서 균질화시켰다. 20분 동안 얼음 위에 보관한 균질액을 4°C에서 12,000 rpm 속도로 10분 동

안 원심분리한 뒤 상층액을 얻었다.

각 조직에서 50 μ g의 단백질을 취하여 8% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond™-P membrane (Amersham Biosciences, England)에 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액 (TBST; 25 mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20, 3% non-fat dry milk)으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, 1차 항체 anti-mouse phospho-Akt 항체 (Ser 473, 1 : 1000, Cell signaling Technology, USA)와 anti-mouse HSP72 항체 (1 : 1000, Stressgen, Canada), anti-rat HSP90 항체 (1 : 600, Stressgen)를 blocking 용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. TBST로 5분씩 3회 세척한 뒤 2차 항체 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 항체와 horseradish peroxidase-conjugated anti-rat IgG 항체 (Amersham Biosciences)를 각각 1 : 1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 세척한 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence) 용액 (Amersham Biosciences)을 1분 동안 처리하여 x-ray 필름에 노출시켰다. Quantity one® 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 관찰된 band의 농도 (density)를 측정하였고, Student t-test를 실시하였다.

결 과

1. 허혈양상화가 Akt 인산화(p-Akt)에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

p-Akt는 주로 근육섬유의 근육형질막과 근육형질막 주변의 세포질에서 관찰되었고, 혈관의 내피세포와 민무늬근육섬유에서도 관찰되었다. 대조군과 실험군 모두 앞정강근과 가자미근에서 관찰된 p-Akt는 큰 차이가 없었다 (Table 1, Fig. 1).

2) Western blot analysis

p-Akt 인산화는 3회군과 6회군보다 10회군에서 낮게 관찰되었다. 앞정강근에서 p-Akt는 재관류시간 경과에 따른 차이가 크지 않았으나, 가자미근에서 p-Akt는 허혈양상화 3회와 6회를 실시한 직후 증가

하여 재관류 6시간 또는 3시간까지 증가하나, 허혈양상화 10회를 실시하면 재관류 직후에 p-Akt가 증

가되나 이후에는 감소되었다(Fig. 2).

Table 1. Immunoreactivities of phospho-Akt in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	+				
	3IP	+	±	±	±	+
	6IP	±	+	±	±	+
	10IP	±	±	±	+	±
Sol	cont	+				
	3IP	+	+	+	+	±
	6IP	+	±	±	±	+
	10IP	±	+	+	±	+

Abbreviations

TA : tibialis anterior muscle

Sol : soleus muscle

cont : control

3IP : 3 times of ischemic preconditioning

6IP : 6 times of ischemic preconditioning

10IP : 10 times of ischemic preconditioning

± : trace immunoreactivity

+: weak immunoreactivity

++ : moderate immunoreactivity

+++ : strong immunoreactivity

2. 허혈양상화가 HSP72에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

앞정강근에서 HSP72는 재관류 6시간과 24시간 이후에 대조군보다 증가되었고, 6회군(Fig. 3D)이 3회군(Fig. 3B)과 10회군(Fig. 3D)보다 높게 관찰되었다. 가자미근에서 HSP72는 재관류 초기와 3시간 이후에 대조군(Fig. 3E)보다 증가되었고, 6회군(Fig. 3G)에서 가장 높게 관찰되었다. HSP72는 앞정강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었다(Table 2, Fig. 3).

2) Western blot analysis

앞정강근에서 HSP72는 3회의 허혈양상화 직후 증가한 뒤, 재관류 6시간 이후에 다시 대조군보다 증가하였고, 6회와 10회의 허혈양상화는 재관류 24시간까지 HSP72를 대조군보다 증가시켰다. 가자미근에서 HSP72는 3회의 허혈양상화 직후 증가하여 재관류 24시간까지 대조군보다 높게 관찰되었고, 6회의 허혈양상화는 HSP72를 재관류 72시간에 대조

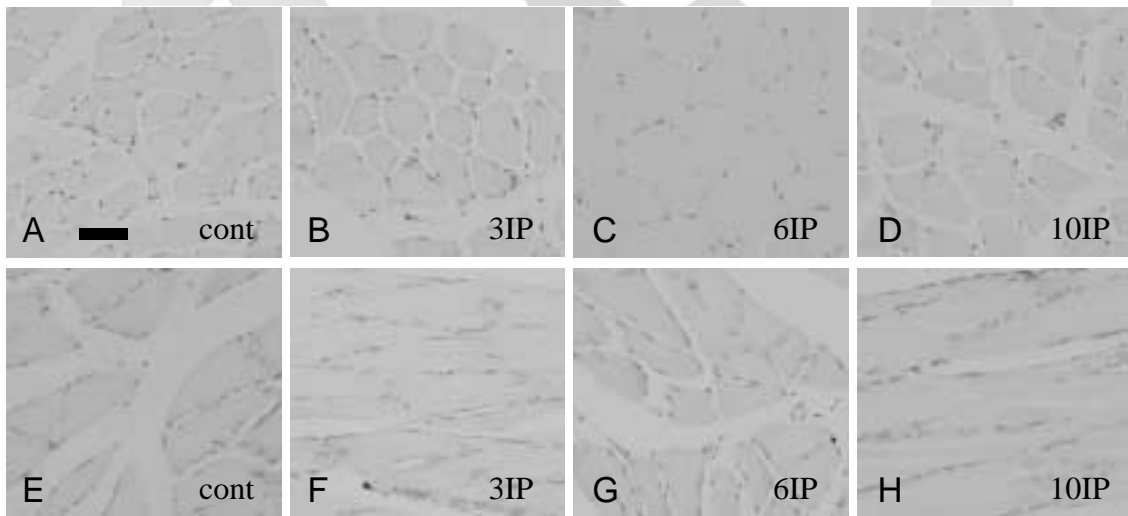


Fig. 1. Immunohistochemical staining of phospho-Akt (Ser 473, p-Akt), 3 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of immunoreactivities (IR) were presented in Table 1. IR of p-Akt were trace or weak, and showed no differences between control (A, E) and IP groups (B~D, F~H). A~D: Tibialis anterior, E~H: Soleus, cont; control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP. Scale bar=50 μm, ×200 magnification.

— 허혈양상화 횟수에 따른 Akt 인산화, HSPs의 변화 —

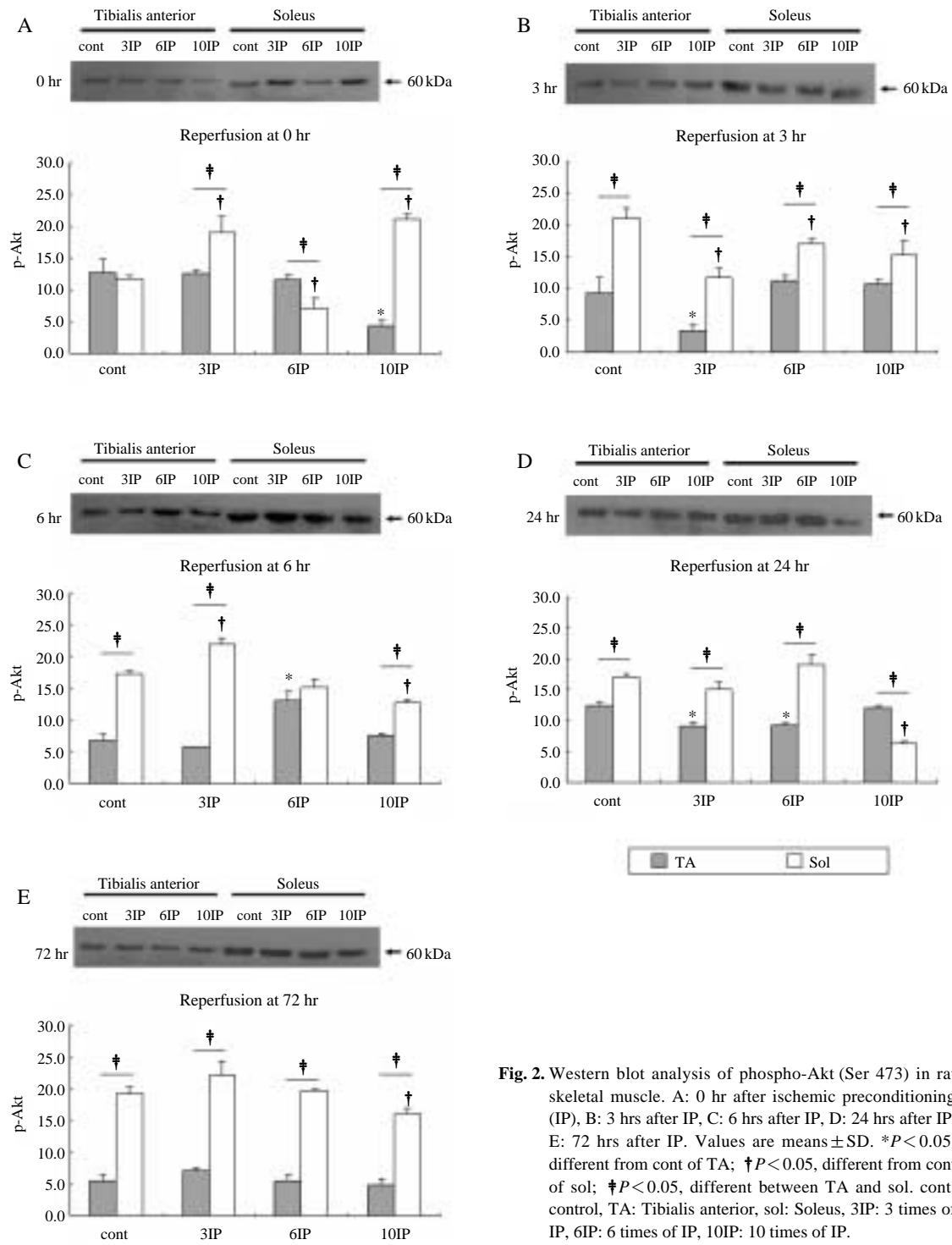


Fig. 2. Western blot analysis of phospho-Akt (Ser 473) in rat skeletal muscle. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 6 hrs after IP, D: 24 hrs after IP, E: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. * $P < 0.05$, different from cont of TA; † $P < 0.05$, different from cont of sol; ‡ $P < 0.05$, different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

군보다 증가시켰으며, 10회의 허혈양상화는 재관류 기간 동안 HSP72를 대조군보다 증가시켰다(Fig. 4).

Table 2. Immunoreactivities of HSP72 in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	±				
	3IP	+	±	+	+	+
	6IP	+	+	±	++	++
	10IP	++	+	+++	±	±
Sol	cont	++				
	3IP	±	+	+	+	+
	6IP	++	++	+++	++	+
	10IP	+++	+	+	±	±

Abbreviations

TA : tibialis anterior muscle Sol : soleus muscle cont : control
 3IP : 3 times of ischemic preconditioning
 6IP : 6 times of ischemic preconditioning
 10IP : 10 times of ischemic preconditioning
 ± : trace immunoreactivity
 + : weak immunoreactivity
 ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

3. 허혈양상화가 HSP90에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

앞정강근에서 허혈양상화 처치로 HSP90은 재관류 3시간 이후 (Fig. 5B-D)에 대조군 (Fig. 5A)보다 증가되었다. 가자미근에서 HSP90은 재관류 3시간과 6시간에 대조군 (Fig. 5E)보다 증가하였고, 3회군 (Fig. 5F)과 6회군 (Fig. 5G)에서 10회군 (Fig. 5H)보다 높게 관찰되었다. HSP90은 앞정강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었다 (Table 3, Fig. 5).

2) Western blot analysis

HSP90은 허혈양상화 후 재관류 6시간까지는 3회군과 6회군에서 10회군보다 높게 관찰되었고, 재관류 24시간과 72시간에는 허혈양상화 횟수에 따른 차이가 크지 않았다. 앞정강근에서 HSP90은 허혈양상화 3회군에서 재관류 직후 증가하였으나, 6회군에서는 재관류 6시간까지 대조군과 비슷하게 관찰되었고, 10회군에서는 재관류 6시간과 24시간에 증가하였다. 가자미근에서 HSP90은 허혈양상화 3회군에서 재관류 3시간에 증가하였고, 6회군에서는 재관류

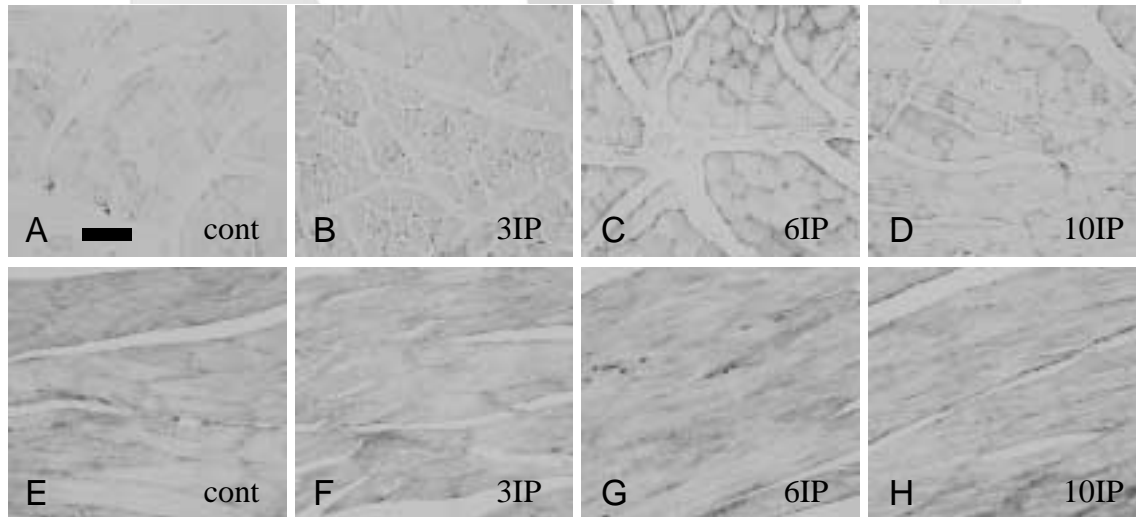


Fig. 3. Immunohistochemical staining of HSP72, 3 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of immunoreactivities (IR) were presented in Table 2. In Tibialis anterior, IR of HSP72 were increased in IP groups (B~D), compared with control group (A). In Soleus, IR of HSP72 in 6IP groups (G) were more strong than those in 3IP (F) and 10IP (H) groups. IR of HSP72 were higher in Soleus muscle (E~H) than that in Tibialis anterior (A~D). A~D: Tibialis anterior, E~H: Soleus, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP. Scale bar=50 μm, ×200 magnification.

— 허혈양상화 횟수에 따른 Akt 인산화, HSPs의 변화 —

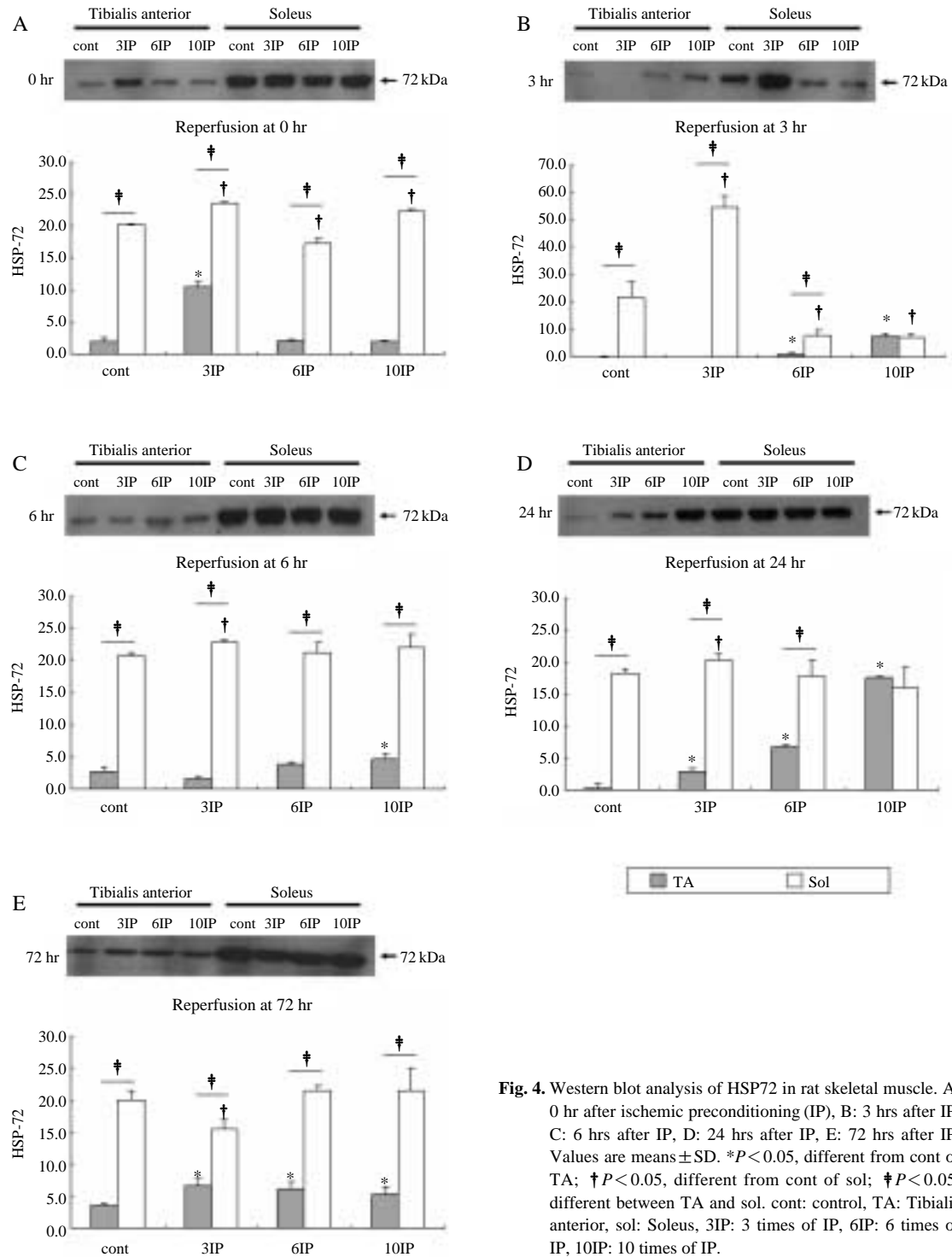


Fig. 4. Western blot analysis of HSP72 in rat skeletal muscle. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 6 hrs after IP, D: 24 hrs after IP, E: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. * $P < 0.05$, different from cont of TA; † $P < 0.05$, different from cont of sol; ‡ $P < 0.05$, different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

6시간에 증가, 10회군에서는 재관류 직후 증가한 뒤 감소하였다(Fig. 6).

고 찰

뼈대근육은 허혈에 내성이 있는 조직이나 오랜 시간의 허혈은 근육손상을 일으킬 수 있고, 다른 장기의 기능부전을 유도할 수도 있다. 허혈양상화는 허혈손상을 감소시킬 수 있는 방법으로, 짧은 허혈과 재관류를 통해 세포를 보호하는 단백질 합성이 유도된다고 알려져 있다.

본 연구에서는 허혈내성을 유도하는 허혈양상화 횟수를 증가시켰을 때, 흰쥐의 뼈대근육에서 Akt와 HSP72, HSP90이 어떻게 변화되는지 관찰하였다.

Noshita 등(2003)은 생쥐의 대뇌 허혈 중심부에서 Akt 인산화가 증가하지 않으나, 허혈 주변부에서는 재관류 4시간에 허혈 후 감소한 Akt 인산화와 세포 생존률이 증가되는 것을 관찰하였다. 이들은 허혈 자극의 강도와 조직의 손상 정도에 따라 Akt 인산화는 다르게 나타난다고 하였다. Mocanu 등(2002)은 허혈양상화 전에 Akt 억제제를 처리하면 흰쥐의 심장에서 유도되는 보호기전이 차단된다고 하였다. 한편, Ushino-Fukai 등(1999)은 흰쥐의 대동맥 민무늬근

Table 3. Immunoreactivities of HSP90 in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	±				
	3IP	+	++	+	++	±
	6IP	+	++	++	++	+++
	10IP	+	+++	++	++	++
Sol	cont	+				
	3IP	+	+++	++	±	++
	6IP	±	++	+++	++	+++
	10IP	++	±	+	+++	++

Abbreviations

TA : tibialis anterior muscle Sol : soleus muscle cont : control
 3IP : 3 times of ischemic preconditioning
 6IP : 6 times of ischemic preconditioning
 10IP : 10 times of ischemic preconditioning
 ± : trace immunoreactivity
 + : weak immunoreactivity
 ++ : moderate immunoreactivity
 +++ : strong immunoreactivity

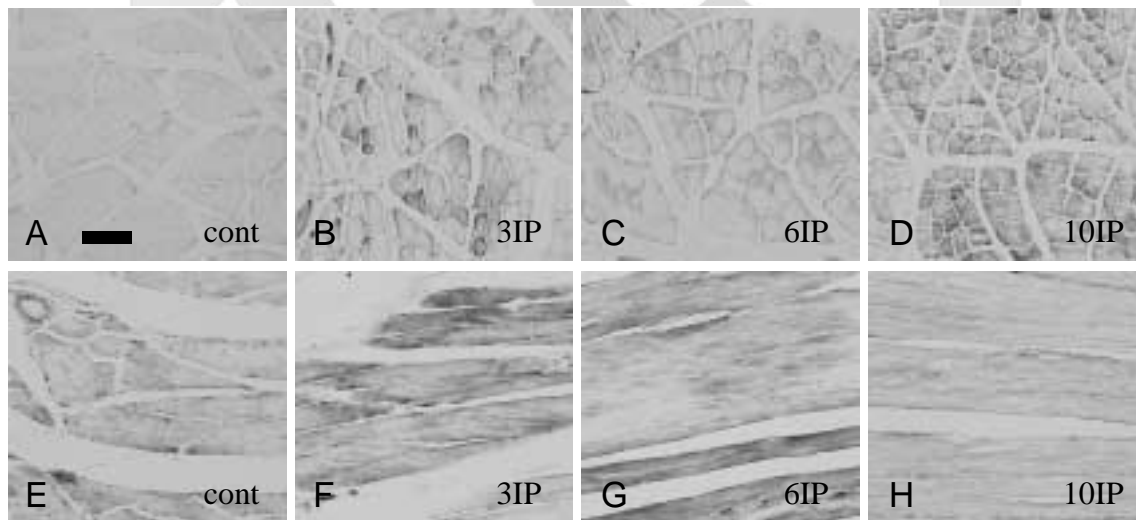


Fig. 5. Immunohistochemical staining of HSP90, 3 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of immunoreactivities (IR) were presented in Table 3. After IP, IR of HSP90 were increased (B~D, F~H), compared with control group (A, E). IR of HSP90 were higher in Soleus (E~H) than that in Tibialis anterior (A~D). A~D: Tibialis anterior, E~H: Soleus, cont; control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP. Scale bar=50 µm, ×200 magnification.

— 허혈양상화 횟수에 따른 Akt 인산화, HSPs의 변화 —

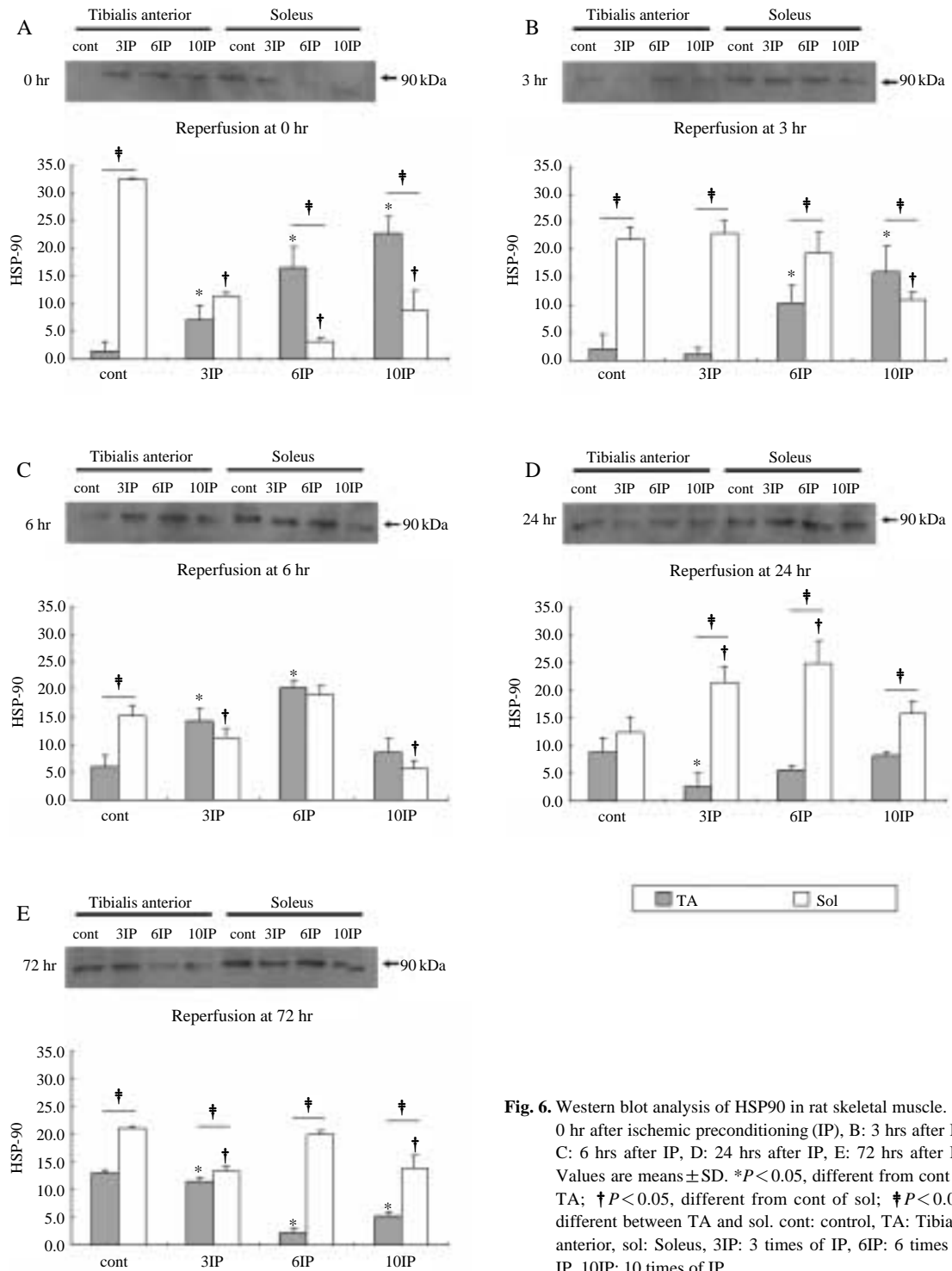


Fig. 6. Western blot analysis of HSP90 in rat skeletal muscle. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 6 hrs after IP, D: 24 hrs after IP, E: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. * P < 0.05, different from cont of TA; † P < 0.05, different from cont of sol; ‡ P < 0.05, different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

육세포에 과산화수소를 처리하면 Akt 인산화가 증가하고, 과산화수소의 농도가 높아질수록 Akt 인산화가 증가한다고 하였다. 그러나 Kelly 등 (1994)은 과도한 활성산소기는 Akt 활성을 억제한다고 하였다.

이들의 실험결과를 고려하면, 본 실험에서 3회와 6회의 허혈양상화는 Akt 인산화를 증가시킴으로 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상을 감소시킬 수 있다고 생각하였다. 그러나, 10회군의 경우 Akt 인산화가 감소되는 것은 10회의 허혈양상화로 과도한 활성산소기가 생성된 결과로 생각되었고, 감소된 Akt 인산화는 허혈양상화 보호기전을 효과적으로 유도하지 못하여 뼈대근육세포를 보호할 수 없을 것으로 생각되었다.

McArdle 등 (2004)은 HSP72를 과발현시킨 생쥐의 긴발가락뽀름근에 전기자극을 주면, 정상대조군의 근육보다 수축력 회복이 빠르고 근육괴사도 적다고 하였으며, 감소된 HSP72가 뼈대근육의 재생을 느리게 하고 기능적 변화에 영향을 준다고 하였다. 한편, Lille 등 (1999)은 4시간 허혈 뒤 재관류 3시간에 흰쥐의 두덩정강근에서 HSP72를 관찰한 경우, 열전처리가 HSP72를 증가시키나, 근육의 부종과 손상을 감소시키지는 않는다고 하였다. 이들은 오랜 시간의 허혈은 과도한 스트레스를 유발하고 조직을 손상시킨다고 하였고, 뼈대근육에서 HSP72으로 유도되는 보호효과는 허혈 기간에 따라 다르게 나타난다고 하였다.

이들의 의견을 고려하면, 3회와 6회의 허혈양상화로 인해 증가된 HSP72는 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상을 감소시킬 수 있다고 생각하였다. 또한, 10회 이상의 과도한 허혈양상화는 재관류 초기에 HSP72가 발현되지 못하여 허혈손상을 효과적으로 감소시키지 못할 것으로 생각되었으며, 10회의 허혈양상화가 HSP72의 발현을 유도하더라도 허혈손상에서 근육세포를 보호하는데 기여하지 못할 것으로 생각되었다.

Sato 등 (2000)과 Lewis 등 (2000)은 HSP90과 Akt를 과발현시킨 태생기 생쥐의 섬유모세포에 과산화수소를 처리하면, apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)의 활성이 억제되고 세포자멸사가 감소된다

고 하였고, HSP90 억제제나 Akt 억제제를 처리하면 ASK1과 c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 활성화되어 세포자멸사가 증가한다고 하였다. Brouet 등 (2001)은 HSP90의 증가가 Akt 인산화를 증가시킨다고 하였으며, Gabai와 Sherman (2002)은 HSPs이 JNK와 직접 결합함으로써 JNK 활성을 억제하여 세포자멸사를 차단한다고 하였다.

이들의 의견을 고려하면 3회와 6회의 허혈양상화로 재관류 초기에 증가된 HSP90은 허혈에서 근육세포를 보호할 수 있으며, HSP90이 Akt의 활성화를 유도하거나, ASK1과 JNK를 억제함으로써 세포손상을 감소시킬 것으로 생각되었다. 또한, Akt 인산화와 HSP72, HSP90은 가자미근보다 앞정강근에서 적게 관찰되었는데, 같은 횡수의 허혈양상화를 실시했을 때, 가자미근보다 앞정강근에서 더 많은 활성산소기가 생성되어 Akt 인산화와 HSP72, HSP90 발현이 감소되었을 것으로 생각되었다.

백색근육섬유가 많이 포함된 앞정강근은 혐기성 근육으로 당원의 분포가 많고, 해당작용에 관여하는 효소의 활성이 높으나, 산소를 대사하는 효소는 적고, 피로를 쉽게 느끼는 것으로 알려져 있다. 이와 반대로 주로 적색근육섬유로 이루어져 있는 가자미근은 당원이 적게 분포하며 산화활성반응이 높은 편으로, 산화적 인산화반응에 관여하는 효소의 활성이 높음으로 알려져 있다 (Cooper 등 1970, Peter 등 1972).

Woitasko와 McCarter (1998)는 생쥐의 뼈대근육을 3시간 허혈하였을 때 일어나는 사립체와 근유세포질세망, 근육원섬유의 손상은 긴발가락뽀름근에서 가자미근보다 심하게 나타나며, 회복되는 속도도 느리다고 하였다. Carvalho 등 (1997)도 흰쥐의 긴발가락뽀름근과 가자미근을 2시간 허혈시킨 후 관찰한 ATP 회복은 가자미근에서 더 빨리 일어난다고 하였다.

Akt와 HSP72, HSP90이 세포를 보호한다는 의견과 백색근육이 적색근육보다 허혈자극에 쉽게 손상 받는 점을 고려하면, 짧은 허혈과 재관류의 반복으로 Akt와 HSP72, HSP90이 적게 관찰된 앞정강근이 가자미근보다 허혈자극에서 효과적으로 보호받을 수 없을 것으로 생각되었다.

본 실험에서 HSP72 또는 HSP90이 Akt의 합성과 인산화를 조절하는지는 직접 확인하지는 못하였으나 허혈자극에 대해 내성이 있다고 알려진 가자미근에서 (Cavalho 등 1997, Woitaske와 McCarter 1998) HSP72, HSP90 발현과 Akt 인산화가 증가된 것과 허혈양상화 10회군에서 이들의 감소된 것으로 보아 이들의 상호작용을 미루어 짐작할 수 있었다.

앞으로, Akt 억제제나, HSPs 억제제를 이용하여 뼈대근육에서도 HSPs과 Akt가 상호작용을 하는지 확인하는 과정이 이루어져야 할 것이다. 또한 본 실험에서 Akt 인산화 면역조직화학염색 결과는 실험군간 차이가 크지 않았으나, Western blot 분석 결과는 실험군간 차이가 있었다. 이는 1차 항체의 친화성 정도의 차이일 수도 있으나, Akt가 근육세포형질막 부근에서 주로 관찰된 것으로 보아, 조직절편의 한 면만을 관찰하는 면역조직화학염색과 조직 전체를 같이 정량하는 방법의 차이 때문이라 생각되었다.

이상의 실험결과로 허혈양상화는 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 재관류 초기에 Akt 인산화와 HSP72, HSP90의 발현을 증가시킴으로 허혈손상을 감소시킬 수 있는 것으로 보인다. 그러나 허혈양상화 횡수를 과도하게 증가시키는 것은 재관류 초기에 이들의 발현을 효과적으로 유도하지 못하므로 세포손상을 감소시키지 못할 것으로 생각되었다. 또한 Akt 인산화와 HSP72, HSP90이 높게 관찰된 가자미근이 앞정강근보다 허혈손상에 더 저항력이 있는 것으로 생각할 수 있다.

참 고 문 헌

- Amstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171: 259-272, 1984.
- Bakau B, Horwich AL : The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines? *Cell* 92: 351-366, 1998.
- Bartling B, Hilgefort C, Friedrich I, Silber RE, Simm A : Cardio-protective determinants are conserved in aged human myocardium after ischemic preconditioning. *FEBS Letters* 555: 539-544, 2003.
- Bijur GN, Jope RS : Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75: 2401-2408, 2000.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O : Hsp90 and caveolin are key targets for the pro-angiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res* 89: 866-873, 2001.
- Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ : Metabolic and contractile response of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 99: 163-171, 1997.
- Cooper CC, Cassens RG, Kastenschmidt LL, Briskey EJ : Histochemical characterization of muscle differentiation. *Dev Biol* 23: 169-184, 1970.
- Gabai VL, Sherman MY : Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* 92: 1743-1748, 2002.
- Kelly KA, Hill MR, Youkhana K, Wanker F, Gimble JM : Dimethyl sulfoxide modulates NF-kappa B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. *Infect Immun* 62: 3122-3128, 1994.
- Kis A, Yellon DM, Baxter GF : Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1063-1071, 2003.
- Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG : Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappaB activation. *J Biol Chem* 275: 10519-10526, 2000.
- Lille S, Su CY, Schoeller T, Suchy H, Lyons S, Russell RC, Neumeister M, Lai CC : Induction of heat-shock protein 72 in rat skeletal muscle does not increase tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Muscle Nerve* 22: 390-393, 1999.
- 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.
- Locke M, Noble EG, Atkinson BG : Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *AM J Physiol* 261: C774-C779, 1991.
- Marber MS, Mestral R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH : Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95:

- 1446-1456, 1995.
- Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A : Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104: 330-335, 2001.
- 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.
- McArdle A, Dillmann WH, Mestrlil R, Faulkner AJ, Jackson MJ : Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J* 18: 355-357, 2004.
- Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM : PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34: 661-668, 2002.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986.
- Muscari C, Bonafe' F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, Guarnieri C, Caldarera CM : Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart. *Life Sci* 74: 1127-1137, 2004.
- Nayeem MA, Hess ML, Qain YZ, Loesser KE, Kukreja RC : Delayed preconditioning of cultured adult rat cardiac myocytes: role of 70- and 90-kDa heat stress proteins. *Am J Physiol* 273: 861-868, 1997.
- Noshita N, Sugawara T, Lewen A, Hayashi T, Chan PH : Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34: 1513-1518, 2003.
- Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE : Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2672-2633, 1972.
- Pratt WB, Toft DO : Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 228: 111-133, 2003.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T : Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10832-10837, 2000.
- Seo YK, Kim JH, Leem HS, Shin CS, Paik DJ : Age-related alterations of Bcl-2, Bax and apoptosis in ischemic-reperfused rat tibialis anterior muscles. *Korean J Phys Anthropol* 16: 97-107, 2003. (in Korean)
- Toth A, Halmosi R, Kovacs K, Deres P, Kalai T, Hideg K, Toth K, Sumegi B : Akt activation induced by an antioxidant compound during ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 35: 1051-1063, 2003.
- Ushino-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK : Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274: 22699-22704, 1999.
- Woitasko MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 102: 2052-2063, 1998.
- Zhang R, Luo D, Miao R, Bai L, Ge Q, Sessa WC, Min W : Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 24: 3954-3962, 2005.
- Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN : Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151: 483-494, 2000.

Abstract

Effects of Repetitive Ischemic Preconditioning on the Phosphorylation of Akt and Expression of HSP72 and HSP90 in the Rat Tibialis Anterior and Soleus Muscles

Youn-Kyoung Seo, Dae-Yong Seo, Su-Kyoung Jeon, Hyun-Joo Park, Doo-Jin Paik

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

Akt, heat shock protein (HSP72)72, and HSP90 induced by ischemic preconditioning protect cells from the ischemic injury. The purpose of this study was to examine the alterations of the level of phospho-Akt, HSP72, and HSP90 in the rat tibialis anterior and soleus muscles after cyclic episodes of ischemic preconditioning.

Sprague-Dawley rats aged 35 weeks were divided into control and ischemic preconditioning (IP) groups. The IP group was divided into 3 subgroups based on cycles of IP. Left common iliac artery was occluded 3, 6, and 10 times for 5 minutes, followed by 5 minutes reperfusion. The experimental animals were sacrificed at 0, 3, 6, 24, and 72 hours after reperfusion, and left tibialis anterior and soleus muscles were removed. The expression of phospho-Akt, HSP72, and HSP90 were examined with immunohistochemical methods and Western blot analysis.

The results were as follows;

1. In the 3 and 6 times of IP groups, the expression of phospho-Akt (p-Akt) was increased at 0 and 3 hours after reperfusion, compared with control group. The expression of p-Akt in the 10 times of IP group was lower than that in 3 and 6 times of IP groups. At 72 hours after reperfusion, the expression of p-Akt showed no difference among the IP groups. The expression of p-Akt was higher in Soleus than that in Tibialis anterior.

2. The expression of HSP72 in 3 times of IP group increased at 0 and 3 hours after reperfusion, compared with 6 and 10 times of IP groups. The expression of HSP72 in the 10 times of IP group was lower than that in 3 and 6 times of IP groups. At 72 hours after reperfusion, the expression of HSP72 showed no difference among the IP groups. The expression of HSP72 was higher in Soleus than that in Tibialis anterior.

3. In the 3 and 6 times of IP groups, the expression of HSP90 increased at 0 and 3 hours after reperfusion, compared with control group. The expression of HSP90 in the 10 times of IP group was lower than that in 3 and 6 times of IP groups. At 24 hours after reperfusion, the expression of HSP90 showed no difference with increasing episode of IP. The expression level of HSP90 was higher in Soleus than that in Tibialis anterior.

These findings suggest that ischemic preconditioning increases the expression of p-Akt, HSP72 and HSP90 at early phase after reperfusion in the rat tibialis anterior and soleus muscles. However, increased cycles of ischemic preconditioning may not induce the expression of them.

Key words : Ischemic preconditioning, Cycle, Tibialis anterior, Soleus, Akt, HSP72, HSP90