

## 흰쥐의 원뿔다리골은근에서 반복적인 허혈양상화가 Cu,ZnSOD와 MnSOD의 발현에 미치는 영향

전수경, 서윤경, 장남진, 박현주, 이상완, 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 세포에서 항산화계를 활성화시켜 산화적 손상을 감소시키는 것으로 알려진 허혈양상화가 반복되면서 흰쥐 원뿔다리골은근에서 나타나는 Cu,ZnSOD와 MnSOD의 변화양상을 알아보기 위하여 본실험을 실시하였다.

9주령과 35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하여 원은영당동맥에 5분의 허혈과 5분의 재관류를 3회, 6회, 10회 반복하여 허혈양상화시켰다. 허혈양상화 처치 직후, 3시간, 6시간, 24시간과 72시간 동안 재관류 후 원뿔다리골은근을 적출하여, 파라핀 절편을 만들고 Cu,ZnSOD와 MnSOD에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Cu,ZnSOD의 면역반응은 정상대조군의 9주령에서 중등도 이었고, 35주령에서는 매우 강하게 나타났으며, 3회와 6회 허혈양상화시 9주령과 35주령에서 재관류 3시간과 24시간 경과시 감소하였고, 10회 허혈양상화시 9주령은 감소하였으나 35주령은 증가하였다. MnSOD의 면역반응은 정상대조군의 9주령과 35주령에서 중등도이었고 3회와 6회 허혈양상화시 재관류 24시간 경과후 감소하였으며 10회 허혈양상화시 9주령은 증가하였으나 35주령은 감소하였다. Cu,ZnSOD의 변동폭은 3회 허혈양상화시킨 9주령과 10회 처치한 35주령에서 가장 컸고, MnSOD의 변동폭은 6회 허혈양상화시킨 9주령군에서 가장 컸다.

이상의 실험결과에서 허혈양상화의 허혈손상 감소효과를 모두 설명할 수 없으나 10회 허혈양상화시킨 흰쥐의 경우 9주령에서는 Cu,ZnSOD의 발현이, 35주령에서 MnSOD의 발현이 감소하여 손상이 일어나는 것으로 생각되었다.

**찾아보기낱말** : 반복허혈양상화, Cu,ZnSOD, MnSOD, 뿔다리골은근, 흰쥐

### 서 론

과도한 산소가 공급되어 흰쥐의 뼈대근육 미세섬유가 파괴되는 손상은 재관류시 혈액공급이 지연되는 “no reflow” 지역보다는 혈액이 공급되는 지역에서 더 심하다(Jennische와 Hansson 1986)고 하였고, Paik 등(1997)은 재관류시 산소공급이 지연되는 먼 쪽이 몸쪽의 뼈대근육보다 손상이 더 적다고 하였다. 이는 재관류시 혈류가 증가할수록 자유산소기(oxygen free radical)의 발생이 증가(Noshita 등 2003) 하기 때문에 Ikebe 등(2001)은 재관류 직후 혈관이완제(vasodilator)의 사용을 피해야한다고 제

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

안하였다.

치명적이지 않은 짧은 허혈과 재관류의 반복은 허혈 후 재관류 손상으로부터 조직을 보호하는 것으로 알려져 있다. 이를 허혈양상화 효과(ischemic preconditioning effect)라고 한다. Badhwar 등(2003)은 각각 10분씩 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 허혈양상화를 5회 실시한 후 2시간 허혈과 90분 재관류시 흰쥐의 가자미근(soleus muscle)과 긴발가락편근(extensor digitorum longus muscle)에서 손상이 감소된다고 하였으며, Csonka 등(2001)은 흰쥐의 심장에서 허혈양상화의 횡수가 증가할 수록 보호효과가 증가한다고 하였다. Yamashita 등(1994)은 24시간에 나타나는 2차적인 보호효과는 새로운 superoxide dismutase(SOD)의 합성과 관련 있다고 하였다.

SOD는 내인성 항산화효소 (endogenous antioxidant enzyme)로서 세포질에 존재하는 Cu,ZnSOD와 사립체에 존재하는 MnSOD가 있다 (Weisiger와 Fridovich 1973). Cu,ZnSOD를 과발현시킨 형질전환 생쥐에서는 허혈과 재관류시 심장근육 세포의 생존율이 증가(Karliner 등 2000)하고, 손상부위가 1/2로 감소 (Wang 등 1998)한다고 하였으며, 허혈과 재관류 시킨 생쥐의 뇌에서 Cu,ZnSOD가 Akt의 활성화를 증가시켜 자유산소기의 발생을 억제하고(Noshita 등 2003), 사립체로부터 시토크롬c (cytochrome c)의 방출을 억제하여 caspase-9에 의한 DNA의 분절 (fragmentation)을 억제 (Fujimura 등 2000)한다고 하였고, MnSOD를 과발현시킨 형질전환 생쥐에서는 초산소기 (superoxide radical)의 축적을 억제하여 재관류 손상에서 조직을 보호 (Chen 등 1998)하는 것으로 알려져 있다.

흰쥐의 뼈대근육에서 허혈 후 재관류시 Cu,ZnSOD의 발현이 증가하였으며 (Paik 등 1997), 사람의 뼈대근육에서는 허혈 후 재관류시 MnSOD의 발현은 증가하였으나 Cu,ZnSOD 발현에는 변화가 없다 (Huda 등 2004)고 하였다. Park 등 (1997)과 Puisieux 등 (2004)은 허혈양상화 후에 허혈과 재관류시킨 경우 항산화효소의 활성이 정상대조군과 차이가 없다고 하였다. Yamashita 등 (1998)은 허혈양상화가 재관류 24시간에 MnSOD를 증가시켜 허혈손상을 감소시켰으며, Yuan 등 (2005)은 허혈양상화가 SOD나 catalase의 활성을 증가시켜 활성산소기를 감소시킨다고 하였다.

이에 본 저자는 흰쥐의 원뿔다리곧은근에서 짧은 허혈과 재관류의 반복 횟수에 따라 Cu,ZnSOD와 MnSOD가 어떻게 변화되는지를 알아보고자 본 실험을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물과 실험군

9주령과 35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였고, 다음과 같이 정상대조군과 실험군으로 나누었다.

실험군은 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 횟수에 따라 3회, 6회, 10회군으로 나누었으며, 허혈양상화 처치 후 재관류 경과시간에 따라 재관류 직후(0시간), 3, 6, 24, 72시간으로 세분하였다. 각 군의 실험 동물은 6 마리씩 사용하였다.

### 2. 실험처치

실험동물은 urethane (1.15 g/kg)을 15분 간격으로 2회 복강 내로 주사하여 마취시켰다. 흰쥐의 왼은영덩동맥 (left common iliac artery)을 노출시키기 위해 복강을 연 후, 큰허리근 (psoas major muscle) 안쪽으로 주행하는 왼은영덩동맥과 왼은영덩정맥을 싸고 있는 혈관집 (sheath)을 제거하였다. 허혈시키기 위하여 흰쥐용 혈관집계 (rodent vascular clamp)로 동맥을 5분간 묶고 5분간 혈관집계를 제거시키는 과정을 3회, 6회, 10회 반복하여 처치하였다. 처치 후 재관류 직후를 제외한 모든 실험군의 복강은 봉합하였다. 재관류 0, 3, 6, 24, 72시간 경과 후에 실험동물은 경추탈골로 희생시켜 원뿔다리곧은근을 적출하였다. 실험동물의 체온유지를 위해 전기담요를 사용하였으며, 허혈과 재관류 동안 발의 피부색을 관찰하여 부적절한 실험동물은 제외시켰다. 정상대조군은 경추탈골로 희생시키고 복강을 연 다음 원뿔다리곧은근을 적출하였다.

### 3. 면역조직화학염색

적출한 근육은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 6시간 간격으로 2차례 고정시킨 후 6 $\mu$ m 두께의 파라핀 절편으로 제작하였다.

파라핀 절편은 xylene으로 파라핀을 제거하고 xylene과 ethyl alcohol 1 : 1 혼합용액으로 alcohol을 조직으로 침투시킨 후 80% ethyl alcohol까지 단계별 ethyl alcohol에서 흡수 과정을 거친 뒤 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 3% 과산화수소 (hydrogen peroxide)를 5분간 반응시킨 후 0.4% pepsin 용액을 8분간 적용시켰다. 조직에서 Cu,ZnSOD와 MnSOD의 비특이적 반응을 억제하기 위해 blocking 용액 (rabbit normal serum 15  $\mu$ L/

mL, 2% bovine serum albumin을 함유한 PBS)으로 37°C에서 1시간 반응시킨 후 일차항체 goat anti-human Cu,ZnSOD antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), goat anti-human MnSOD antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 각각 1:20으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 항원에 부착시켰다. 이차항체 rabbit anti-goat IgG antibody (Vector Laboratory, Burlingame, CA)를 실온에서 40분간 일차항체와 결합시킨 후, ABC (Vector Laboratory) 혼합용액을 실온에서 30분간 반응시켰다. 항원 표지를 확인하기 위해 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratory)으로 7분간 발색하였다. 1% methyl green 용액을 사용하여 대조염색을 하였다.

#### 4. 평가

광학현미경 (Olympus DP70)으로 원뿔다리곧은근의 중심부위를 100배율로 촬영하고, 조직 내에서 갈색으로 염색된 면역반응의 크기와 정도에 따라 4등급으로 나누고 다시 강약을 분류하여 1~2등급은 약한 양성반응 (weak), 3~4등급은 중등도의 양성반응 (moderate), 5~6등급은 강한 양성반응 (strong), 7~8등급은 매우 강한 양성반응 (very strong)으로 분류하였다.

## 결 과

### 1. 정상대조군

1) Cu,ZnSOD는 9주령에서 중등도의 양성반응 (Fig. 3)을 나타내었고, 35주령에서는 매우 강한 양성반응 (Fig. 8)을 나타내었다 (Fig. 1, Table 1).

2) MnSOD는 9주령에서 중등도의 양성반응 (Fig. 10)을 나타내었고, 35주령에서 중등도의 양성반응 (Fig. 13)을 나타내었다 (Fig. 2, Table 2).

### 2. 허혈양상화군

#### 1) Cu,ZnSOD의 면역조직화학적 연구

##### (1) 9주령 흰쥐의 넵다리곧은근 소견

허혈양상화 3회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 중

등도의 양성반응을, 3시간 후에 약한 양성반응 (Fig. 4)을, 6시간 후에 매우 강한 양성반응 (Fig. 5)을, 24시간 후에 강한 양성반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응을 나타내었다.

허혈양상화 6회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 강한 양성반응을, 3시간 후에 강한 양성반응을, 6시간 후에 매우 강한 양성반응을, 24시간 후에 중등도의 양성반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응 (Fig. 6)을 나타내었다.

허혈양상화 10회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 중등도의 양성반응을, 3시간 후에 매우 강한 양성반응을, 6시간 후에 중등도의 양성반응 (Fig. 7)을, 24시간 후에 매우 강한 양성반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응을 나타내었다 (Fig. 1, Table 1).

##### (2) 35주령 흰쥐의 넵다리곧은근 소견

허혈양상화 3회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 강한 양성반응을, 3시간 후에 중등도의 양성반응을, 6시간 후에 강한 양성반응을, 24시간 후에 약한 양성반응을, 72시간 후에 강한 양성반응을 나타내었다.

허혈양상화 6회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 매우 강한 양성반응을, 3시간 후에 매우 강한 양성반응을, 6시간 후에 매우 강한 양성반응을, 24시간 후에 강한 양성반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응을 나타내었다.

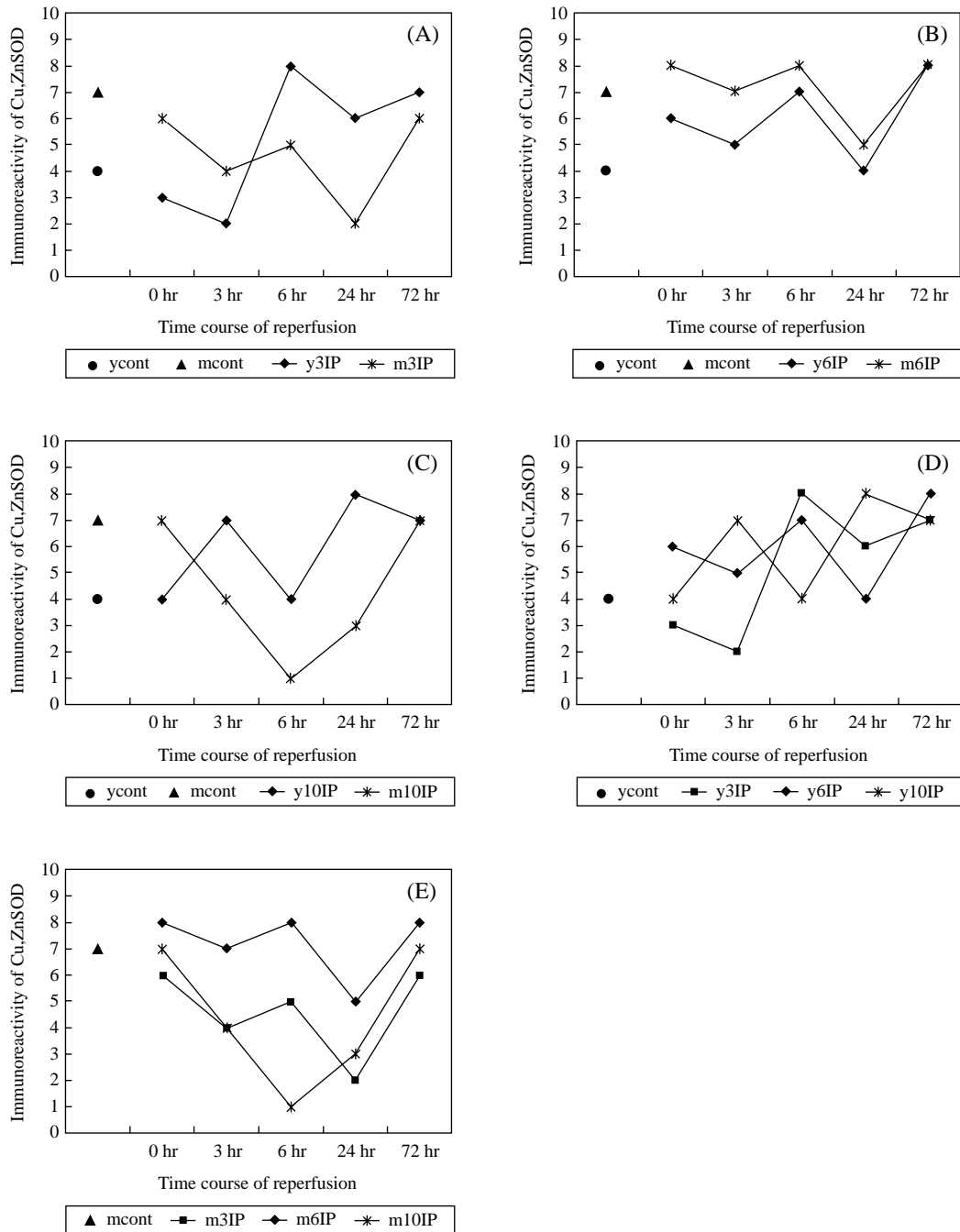
허혈양상화 10회시 Cu,ZnSOD는 재판류 직후 매우 강한 양성반응을, 3시간 후에 중등도의 양성반응을, 6시간 후에 약한 양성반응 (Fig. 9)을, 24시간 후에 중등도의 양성반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응을 나타내었다 (Fig. 1, Table 1).

#### 2) MnSOD의 면역조직화학적 연구

##### (1) 9주령 흰쥐의 넵다리곧은근 소견

허혈양상화 3회시 MnSOD는 재판류 직후 약한 양성반응을, 3시간 후에 강한 양성반응을, 6시간 후에 중등도의 양성반응 (Fig. 11)을, 24시간 후에 약한 양성반응을, 72시간 후에 중등도의 양성반응을 나타내었다.

허혈양상화 6회시 MnSOD는 재판류 직후 강한 양성반응을, 3시간 후에 중등도의 양성반응을, 6시간 후에 중등도의 양성반응을, 24시간 후에 약한 양성



**Fig. 1.** Immunoreactivities of Cu,ZnSOD on the rectus femoris muscle in the nine and thirty-five week-old rats followed repetitive cycles of brief ischemia and reperfusion. ycont: normal control group in the nine week-old rats, mcont: normal control group in the thirty-five week-old rats, IP: 5 min ischemia and 5 min reperfusion at the left common iliac artery, 3IP: three cycles of ischemia and reperfusion, 6IP: six cycles of ischemia and reperfusion, 10IP: ten cycles of ischemia and reperfusion.

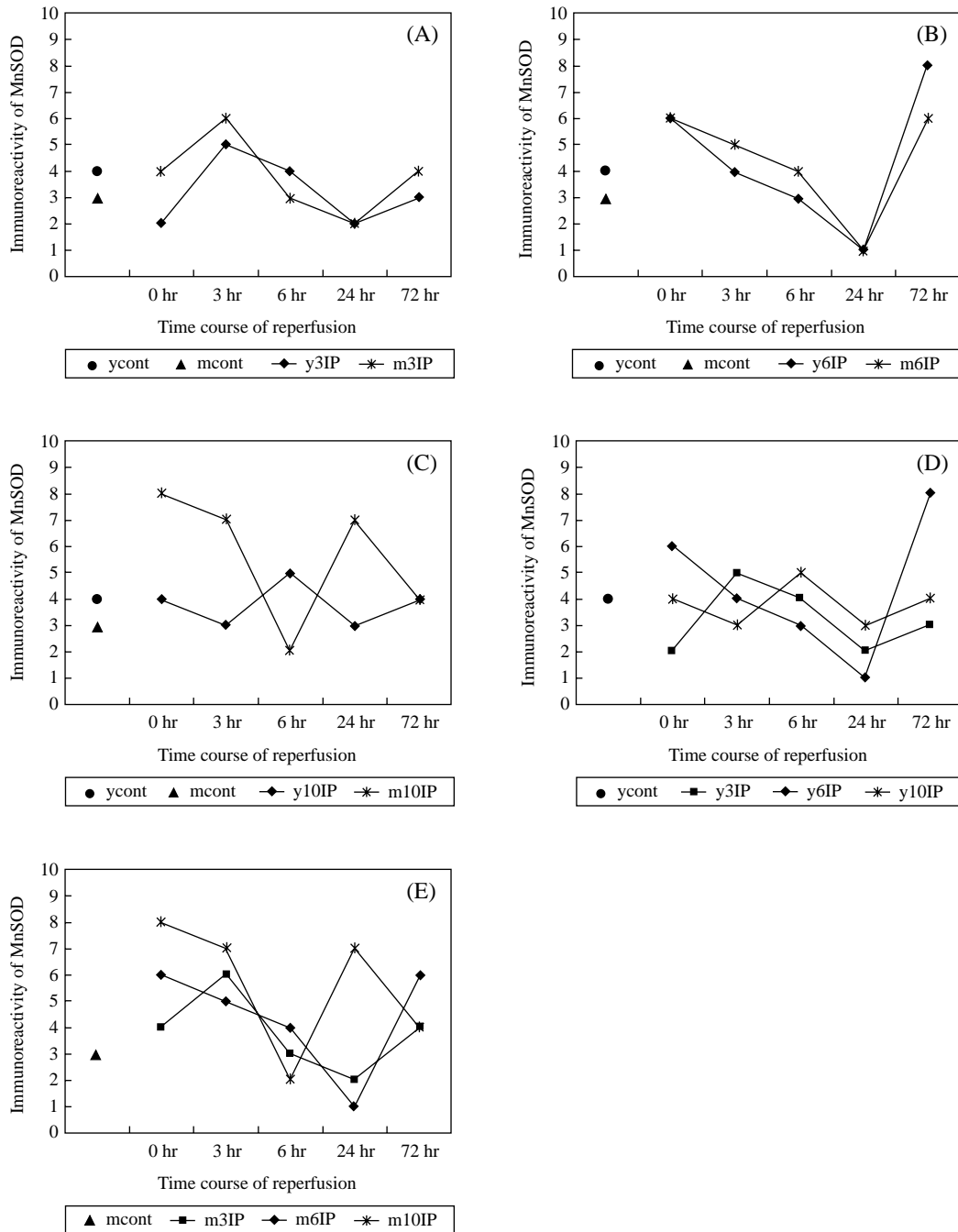
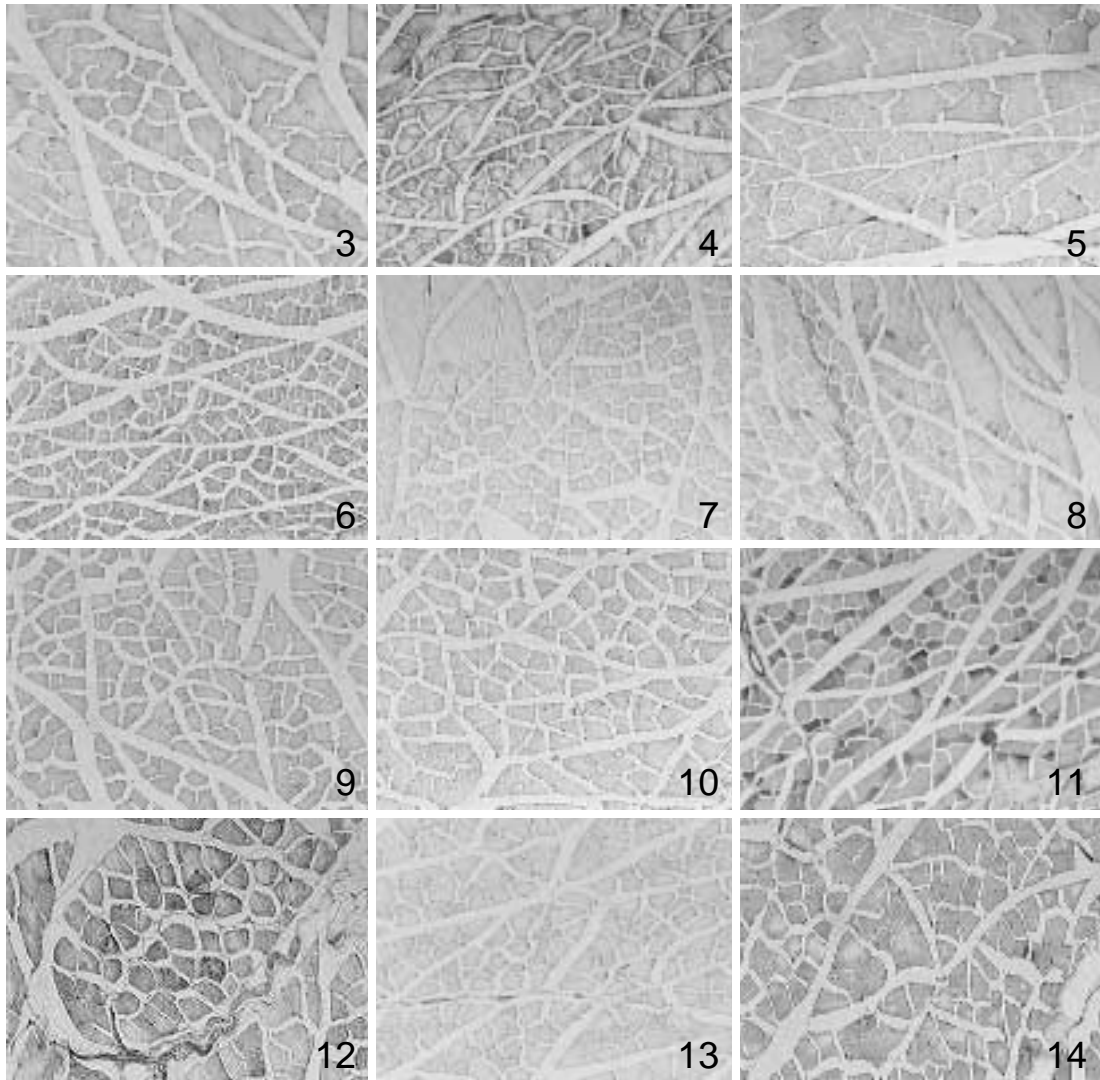


Fig. 2. Immunoreactivities of MnSOD on the rectus femoris muscle in the nine and thirty-five week-old rats followed repetitive cycles of brief ischemia and reperfusion. ycont: normal control group in the nine week-old rats, mcont: normal control group in the thirty-five week-old rats, IP: 5 min ischemia and 5 min reperfusion at the left common iliac artery, 3IP: three cycles of ischemia and reperfusion, 6IP: six cycles of ischemia and reperfusion, 10IP : ten cycles of ischemia and reperfusion.



**Figs. 3-14.** Immunohistochemistry of Cu,ZnSOD and MnSOD on the rectus femoris muscle of the SD rats followed repetitive cycles of brief ischemia and reperfusion. Cu,ZnSOD immunoreactivities on RF of nine week-old rat; (3) normal control; moderate, (4) 3IP3; Weak, (5) 3IP6; Very strong, (6) 6IP72; Very strong, (7) 10IP6; moderate. Cu,ZnSOD immunoreactivities on RF of thirty-five week-old rat; (8) normal control; Very strong, (9) 10IP6; Weak. MnSOD immunoreactivities on RF of nine week-old rat; (10) normal control; moderate, (11) 3IP6; moderate, (12) 6IP72; Very strong. MnSOD immunoreactivities on RF of thirty-five week-old rat; (13) normal control; moderate, (14) 10IP0; Very strong. RF; rectus femoris muscle, IP; ischemic preconditioning. ( $\times 100$ )

반응을, 72시간 후에 매우 강한 양성반응(Fig. 12)을 나타내었다.

허혈양상화 10회시 MnSOD는 재관류 직후 중등

도의 양성반응을, 3시간 후에 중등도의 양성반응을, 6시간 후에 강한 양성반응을, 24시간 후에 중등도의 양성반응을, 72시간 후에 중등도의 양성반응을 나타

**Table 1.** Immunoreactivities of Cu,ZnSOD in rat left rectus femoris muscle after the cyclic brief ischemia and reperfusion

	3IP		6IP		10IP	
	9w	35w	9w	35w	9w	35w
0 hr	+(3)	++(6)	++(6)	+++ (8)	+(4)	+++ (7)
3 hr	±(2)	+(4)	++(5)	+++ (7)	+++ (7)	+(4)
6 hr	+++ (8)	++(5)	+++ (7)	+++ (8)	+(4)	±(1)
24 hr	++(6)	±(2)	+(4)	++(5)	+++ (8)	+(3)
72 hr	+++ (7)	++(6)	+++ (8)	+++ (8)	+++ (7)	+++ (7)

ycont: +(4), mcont: +++(7)

number in ( ): a grade of immunoreactivities

±(1~2): weak, +(3~4): moderate,

++(5~6): strong, +++(7~8): very strong

Abbreviations

ycont : normal control of nine weeks-old rats

mcont : normal control of thirty five weeks-old rats

3IP : 3 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

6IP : 6 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

10IP : 10 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

**Table 2.** Immunoreactivities of MnSOD in rat left rectus femoris muscle after the cyclic brief ischemia and reperfusion

	3IP		6IP		10IP	
	9w	35w	9w	35w	9w	35w
0 hr	±(2)	+(4)	++(6)	++(6)	+(4)	+++ (8)
3 hr	++(5)	++(6)	+(4)	++(5)	+(3)	+++ (7)
6 hr	+(4)	+(3)	+(3)	+(4)	++(5)	±(2)
24 hr	±(2)	±(2)	±(1)	±(1)	+(3)	+++ (7)
72 hr	+(3)	+(4)	+++ (8)	++(6)	+(4)	+(4)

ycont: +(4), mcont: +(3)

number in ( ): a grade of immunoreactivities

±(1~2): weak, +(3~4): moderate,

++(5~6): strong, +++(7~8): very strong

Abbreviations

ycont : normal control of nine weeks-old rats

mcont : normal control of thirty five weeks-old rats

3IP : 3 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

6IP : 6 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

10IP : 10 cycles of non-lethal 5 min ischemia and 5 min reperfusion

내었다(Fig. 2, Table 2).

#### (2) 35주령 흰쥐의 넵다리곧은근 소견

허혈양상화 3회시 MnSOD는 재관류 직후 중등도의 양성반응을, 3시간 후에 강한 양성반응을, 6시간 후에 중등도의 양성반응을, 24시간 후에 약한 양성반응을, 72시간 후에 중등도의 양성반응을 나타내었다.

허혈양상화 6회시 MnSOD는 재관류 직후 강한 양성반응을, 3시간 후에 강한 양성반응을, 6시간 후에 중등도의 양성반응을, 24시간 후에 약한 양성반응을, 72시간 후에 강한 양성반응을 나타내었다.

허혈양상화 10회시 MnSOD는 재관류 직후 매우 강한 양성반응(Fig. 14)을, 3시간 후에 매우 강한 양성반응을, 6시간 후에 미약한 양성반응을, 24시간 후에 매우 강한 양성반응을, 72시간 후에 중등도의 양성반응을 나타내었다(Fig. 2, Table 2).

## 고 찰

허혈양상화는 치명적이지 않은 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 방법으로 장시간의 허혈 전에 처치하면, 심장(Park 등 1997, Yamashita 등 1998, Csonka

등 2001), 뇌(Puisieux 등 2004), 뼈대근육(Pudupakam 등 1998, Badhwar 등 2003, Badhwar 등 2004), 허파(Li 등 1998), 간(Yuan 등 2005) 등에서 허혈과 재관류 손상을 감소시켜 조직과 기관을 보호하는 것으로 알려져 있다.

Badhwar 등(2004)은 흰쥐의 긴발가락뿔근에서 10분씩 짧은 허혈과 재관류를 5회 반복하여 허혈양상화 처치 후 2시간 허혈과 90분 재관류시켰을 때, SOD 단백질의 발현과 catalase의 농도가 허혈양상화군에서 2배 증가하여 긴발가락뿔근을 보호한다고 하였고, Huda 등(2004)은 무릎수술 경험이 있는 환자의 넵다리네갈래근(quadriceps femoris muscle)에서 2시간 허혈과 45분 재관류시킨 경우, 재관류 경과시간이 5분에서 2시간, 4시간으로 증가할수록 과립성 백혈구에서 MnSOD mRNA의 발현은 증가하였으나 Cu,ZnSOD의 발현은 변화가 없다고 하였다.

SOD를 허혈과 재관류로 손상된 조직에 보충하거나 SOD를 과발현 시킨 경우 조직에서 허혈손상이 감소되는 것으로 알려져 있다. Ikebe 등(2002)은 흰쥐의 장딴지근을 3시간 허혈과 24시간 재관류시켰을 때, SOD를 처리한 경우 생리식염수를 처리한 정상대조군보다 혈류는 비슷하였으나 근육긴장도가 높은 것은 재관류 손상이 감소된 결과라고 하였다. Cu,ZnSOD를 과발현시킨 형질전환 생쥐의 대뇌를

60분 동안 허혈한 경우, 뇌의 부종과 DNA 분절이 감소하고, 피질의 손상이 감소하는 등 허혈손상에서 뇌가 보호(Kinouchi 등 1991, Saito 등 2003) 된다고 하였으며, Fujimura 등 (2000)은 Cu,ZnSOD를 과발현시킨 형질전환 생쥐의 대뇌를 1시간 허혈한 경우, 재판류 2시간과 4시간에 허혈시 나타나는 사립체에서 세포질로 시토크롬c의 이동이 감소한다고 하였다. Chen 등 (1998)은 MnSOD를 과발현시킨 형질전환 생쥐의 심장에서 35분 허혈과 45분 재판류시 회복률이 증가하였고, MnSOD의 반응 결과물인 과산화수소는 catalase에 의해 물과 산소로 분해되어 심장은 재판류 손상으로부터 추가적으로 보호된다고 하였다. Asimakis 등 (2002)은 SOD의 활성도가 50% 감소한 Cu,ZnSOD와 MnSOD 결핍 생쥐의 심장을 30분 허혈시켰을 때, 재판류 10분 경과시 모든 군에서 부정맥, 심실빈맥 등이 발생하고 20분 경과시에는 순환장애가 일어난다고 하였다. 또한 Cu,ZnSOD가 결핍된 생쥐의 심장기능은 재판류 경과 1시간 후에 완전히 회복하였으나, MnSOD가 결핍된 생쥐는 재판류 경과 45분부터 회복되고 1시간 후에는 60%만 회복되는 것으로 보아 MnSOD가 결핍된 생쥐의 심장이 Cu,ZnSOD가 결핍된 생쥐의 심장보다 허혈에 대한 손상이 심하게 일어난다고 하였다.

본 실험의 정상대조군에서는 9주령에서 Cu,ZnSOD와 MnSOD는 중등도의 양성반응을, 35주령에서 Cu,ZnSOD는 매우 강한 양성반응을, MnSOD는 중등도의 양성반응으로 관찰되어, Cu,ZnSOD와 MnSOD는 정상적으로 발현하며 Cu,ZnSOD는 나이가 들수록 증가하는 것으로 관찰되었다.

또, Cu,ZnSOD의 면역반응은 허혈양상화 3회와 6회시 9주령과 35주령에서 재판류 경과시간에 따른 변화양상은 유사하였고, 허혈양상화 3회시 9주령에서 변동폭이 크게 나타났지만, 6회시 9주령과 35주령 사이에 차이가 없었고, 허혈양상화를 10회로 증가한 경우 9주령과 35주령은 변화양상에 차이가 있었으며, 변동폭은 35주령에서 크게 나타났다. 또한 9주령과 35주령에서 Cu,ZnSOD의 면역반응은 허혈양상화 3회와 6회에서는 변화양상이 유사하였으나, 10회에서는 차이가 있었다. 9주령에서 허혈양상화 6회, 10회, 3회 순으로 변동폭이 증가하였고, 35주령

에서 허혈양상화 3회와 6회시 변동폭에 차이가 없었고 10회시 가장 큰 변동폭을 보였다.

그리고, MnSOD의 면역반응은 허혈양상화 3회와 6회시 9주령과 35주령의 변화양상이 유사하였고, 허혈양상화 3회와 6회시 변동폭에 차이가 없었고, 6회시 거의 유사하였다. 그러나 허혈양상화를 10회로 증가한 경우 9주령과 35주령은 변화양상에 차이가 있었고, 변동폭은 35주령에서 크게 나타났다. 9주령과 35주령에서 MnSOD의 면역반응은 허혈양상화 3회와 6회, 10회에서 변동양상에 차이를 보였고, 9주령에서는 3회, 10회, 6회 순으로 변동폭이 증가하였고, 35주령에서는 3회, 6회, 10회 순으로 변동폭이 증가하였다.

재판류시 혈류 증가로 자유산소기의 발생이 증가하여 조직에 손상이 일어나지만 (Ikebe 등 2001), 허혈양상화를 시키면 자유산소기의 발생이 감소하여 허혈과 재판류 손상이 억제된다고 하였다 (Ferencz 등 2002). 또한 허혈양상화로 내인성 항산화효소의 활성이 증가하여 자유산소기를 제거하고 (Yuan 등 2005) 그 결과 회복이 증가한다고 하였다 (Wang 등 1998). 본 실험에서는 재판류 경과 72시간에서 Cu,ZnSOD와 MnSOD가 9주령과 35주령 흰쥐에서 허혈양상화 3회와 6회시 증가하고, 6회에서 더 많이 증가하여, 허혈양상화 횟수를 증가한 경우 peroxynitrite의 형성이 감소하여 허혈손상을 보호한다는 Csonka 등 (2001)의 이론으로 미루어 볼 때 허혈양상화 횟수가 증가할수록 보호효과가 높아진다고 생각되었다. 그러나 재판류 경과 72시간에서 허혈양상화 10회시 Cu,ZnSOD는 9주령에서, MnSOD는 35주령에서 감소하여 과도한 허혈자극은 오히려 손상을 일으킬 것으로 생각되었다. 이는 이미 발표한 Seo 등 (2005)의 보고에서 허혈양상화 10회시 재판류 경과 72시간에서 가장 높은 사망률로 확인할 수 있었다.

Badhwar 등 (2003)은 허혈양상화 후 뼈대근육에서 24시간에 내성이 발생한다고 하였고, Puisieux 등 (2004)도 대뇌에서 24시간과 72시간에서 보호효과가 나타난다고 하였다. Yamashita 등 (1998)은 흰쥐의 원심실근육에서 0시간과 24시간에 손상부위가 감소한다고 하였고, Yamashita 등 (1994)은 생쥐의

심장근육 세포에서 24시간 이후에 나타나는 허혈양상화의 후기 보호효과는 새로운 MnSOD가 합성되어 나타나는 것이라고 하였기 때문에, 24시간은 허혈에 대한 내성이 발생하는 중요한 시점이라고 생각된다. 그러나 본 실험에서는 보호효과가 예상되었던 허혈양상화 3회와 6회시 9주령과 35주령에서 재판류 24시간에 Cu,ZnSOD와 MnSOD가 감소하였다. 이는 허혈양상화 후 SOD의 활성에 차이가 없거나 (Park 등 1997, Maczewski 등 2004), 허혈양상화가 자유산소기의 생성을 줄이기 때문에 이를 제거하기 위해 필요한 SOD가 감소된 것 (Li 등 1998)과 연관있다고 생각되었다.

그러나, SOD 발현만으로 허혈손상에 대한 모든 것을 설명할 수는 없다. 실험과정에서 9주령보다는 35주령의 사망률이 더 높은 것은 고령인 경우 재판류 손상에 더 민감하였기 때문으로 생각되었다 (Shah 등 1999).

본 실험의 결과를 실제적으로 예상해보면, 어린아이의 경우 과도하게 반복되는 허혈자극은 Cu,ZnSOD의 발현을 감소시켜 손상을 일으킬 수 있으며, 어른의 경우 MnSOD의 발현이 감소하여 허혈손상에 예민해지는 것으로 생각되었다.

이상의 실험결과에서 허혈양상화의 허혈손상 감소효과를 모두 설명할 수 없으나 10회 허혈양상화 시킨 흰쥐의 경우 9주령에서는 Cu,ZnSOD의 발현이, 35주령에서 MnSOD의 발현이 감소하여 손상이 일어날 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

Asimakis GK, Lick S, Patterson C : Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2<sup>(+/-)</sup> but not SOD1<sup>(+/-)</sup> mouse hearts. *Circulation* 105: 981-986, 2002.

Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL, Harris KA, Potter RF : Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 36: 371-379, 2004.

Badhwar A, Dungey AA, Harris KA, Scott JA, McCarter SD, Scott JR, Forbes TL, Potter RF : Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue

protection. *J Surg Res* 109: 62-67, 2003.

Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH : Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/ reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2281-2289, 1998.

Csonka C, Csont T, Onody A, Ferdinandy P : Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced peroxynitrite formation. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1217-1219, 2001.

Ferencz A, Szanto Z, Borsiczky B, Kiss K, Kalmar-Nagy K, Szeberenyi J, Horvath PO, Roth E : The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. *Surgery* 132: 877-884, 2002.

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH : The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 20: 2817-2824, 2000.

Huda R, Solanki DR, Mathru M : Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 107: 497-503, 2004.

Ikebe K, Kato T, Yamaga M, Hirose J, Tsuchida T, Takagi K : Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. *J Surg Res* 99: 1-6, 2001.

Ikebe K, Kato T, Yamaga M, Tsuchida T, Irie H, Oniki Y, Takagi K : Effect of nitric oxide on the contractile function of rat reperfused skeletal muscle. *J Surg Res* 106: 82-85, 2002.

Jennische E, Hansson HA : Postischemic skeletal muscle injury: patterns of injury in relation to adequacy of reperfusion. *Exp Mol Pathol* 44: 272-280, 1986.

Karliner JS, Honbo N, Epstein CJ, Xian M, Lau YF, Gray MO : Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1779-1786, 2000.

Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH : Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11158-11162, 1991.

Li G, Chen S, Lou W, Lu E : Protective effects of ischemic

- preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest* 113: 1356-1359, 1998.
- Maczewski M, Duda M, Pawlak W, Beresewicz A : Endothelial protection from reperfusion injury by ischemic preconditioning and diazoxide involves a SOD-like anti-O<sub>2</sub>-mechanism. *J Physiol Pharmacol* 55: 537-550, 2004.
- 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.
- Paik DJ, Yang SB, Ahn DH, Chun YH, Chang YK, Chung HS: Change in SOD Immunoreactivities of proximal and distal muscles at occlusive of the hind limb after 2 hours ischemia and timely reperfusion. *Kor J Physic Anthropol* 10: 93-111, 1997. (in Korean)
- Park JW, Chun YS, Kim YH, Kim CH, Kim MS : Ischemic preconditioning reduces O<sub>2</sub>- generation and prevents respiratory impairment in the mitochondria of post-ischemic reperfused heart of rat. *Life Sci* 60: 2207-2219, 1997.
- Pudupakkam S, Harris KA, Jamieson WG, DeRose G, Scott JA, Carson MW, Schlag MG, Kviety PR, Potter RF : Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 275: H94-99, 1998.
- Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gele P, Lhermitte M, Lebuffe G, Bordet R : Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res* 1027: 30-37, 2004.
- Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH : Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci* 23: 1710-1718, 2003.
- Seo YK, Paik DJ, Nam YS, Kweon TH, Kim TS : Effects of multiple cyclic episodes with short ischemia and reperfusion on the distribution of NF- $\kappa$ B, AP-1, Bcl-2 and Bax in retro femoris muscles of rats. *Kor J Phys Athropol* 18: 45-55, 2005. (in Korean)
- Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR : Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Dev* 107: 37-50, 1999.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL : Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents posts ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4556-4560, 1998.
- Weisiger RA, Fridovich I : Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248: 3582-3592, 1973.
- Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M : A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1181-1189, 1998.
- Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, Kuzuya T, Hori M, Taniguchi N, Kamada T, Tada M : Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest* 94: 2193-3199, 1994.
- Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X : Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/ reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 11: 1825-1828, 2005.

**Abstract**

**Effects of Repetitive Ischemic Preconditioning on the Expression of Cu,ZnSOD and MnSOD in Rectus Femoris Muscles of Rats**

Su-Kyung Jeon, Yoon-Kyung Seo, Nam-Jin Chang,  
Hyun-Zoo Park, Sang-Wan Lee, Doo-Jin Paik

*Department of Anatomy and Cell biology, College of Medicine, Hanyang University*

The present study was performed to investigate the dynamics of Cu,ZnSOD and MnSOD expression following courses of reperfusion after repetitive ischemic preconditioning on the left rectus femoris muscle of Sprague-Dawley rats.

Nine or thirty five weeks-old rats were subjected to three, six and ten cycles of ischemic preconditioning that was 5 min ischemia and 5 min reperfusion at the left common iliac artery. Left rectus femoris muscle was isolated 0, 3, 6, 24 and 72 hours of reperfusion after ischemic preconditioning and assayed by immunohistochemical staining with anti-Cu,ZnSOD and anti-MnSOD antibodies. The results were as follows;

The immunoreactivities of Cu,ZnSOD and MnSOD were increased in the repetitive three and six cycles of ischemic preconditioning. However, after the repetitive ten cycles of ischemic preconditioning, the Cu,ZnSOD immunoreactivities were decreased in the nine weeks-old rats while MnSOD immunoreactivities were decreased in thirty five weeks-old rats.

These findings suggest that severe damages result from decrease of Cu,ZnSOD in nine weeks-old rats and decrease of MnSOD in thirty five weeks-old rats after ten cycles of ischemic preconditioning.

**Key words** : Repetitive ischemic preconditioning. Cu,ZnSOD, MnSOD, Rectus femoris muscle, Rat