

## 짧은 허혈과 재관류 횃수에 따라 흰쥐의 뼈대근육에서 나타나는 산화질소합성효소의 발현 변화

서윤경, 전수경, 박현주, 이상완, 고봉철,  
이덕구, 장남진, 백두진, 이완희<sup>1</sup>

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

<sup>1</sup>삼육대학교 보건복지대학 물리치료학과

**간추림**: 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 허혈양상화는 심장근육과 뼈대근육, 신경조직 등에서 허혈손상을 감소시킨다고 알려져 있으나 그 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 최근에는 허혈 및 재관류시 생성되는 산화질소(nitric oxide, NO)에 관한 연구들이 진행되고 있다. 산화질소합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는 NO는 허혈손상을 증가시키거나 감소시킨다고 알려져 있다. 이에 본 연구자들은 흰쥐의 뼈대근육에서 짧은 허혈과 재관류의 반복 횃수에 따라 NOS가 어떻게 변화되는지를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

9주령과 35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 대조군과 짧은 허혈과 재관류 반복군으로 나누었다. 짧은 허혈과 재관류 반복군의 실험동물은 5분 허혈-5분 재관류하는 과정을 3회, 6회 그리고 10회 실시하였고, 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 경과 후 넵다리골은근을 적출한 뒤, NOS 1과 NOS 2, NOS 3의 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

짧은 허혈과 재관류 반복군에서는 짧은 허혈과 재관류 횃수가 반복될수록, 주령이 증가 할수록, 재관류 72시간 경과 후 사망률이 높아졌다. 정상대조군에서 주령에 따른 NOS 1과 NOS 2, NOS 3 면역반응은 큰 차이가 없었다. NOS 1 면역반응은 9주령군에서 6회의 짧은 허혈과 재관류 반복 후 24시간에 중등도의 양성반응으로, 10회군에서는 중등도 또는 강한 양성반응으로 관찰되었다. 35주령군에서는 6회군과 10회군에서 미약한 또는 경도의 양성반응으로 관찰되었다. NOS 2 면역반응은 9주령군에서 3회의 짧은 허혈과 재관류 반복 후 3시간에 중등도 또는 강한 양성반응으로, 35주령에서는 미약한 양성반응으로 관찰되었다. NOS 3 면역반응은 9주령군에서 10회의 짧은 허혈과 재관류 반복 후 3시간에 경도 또는 중등도의 양성반응으로, 35주령에서는 미약한 양성 또는 음성반응으로 관찰되었다.

흰쥐의 넵다리골은근에서는 허혈과 재관류 횃수가 증가함에 따라 NOS 이형들의 분포 변화 양상과 폭은 매우 다르게 나타나며, NOS 1과 NOS 2보다 NOS 3의 변화폭이 큰 것으로 보아, 조직의 보호효과를 나타내는 것으로 알려진 NOS 3가 짧은 허혈과 재관류 후 나타나는 사망률의 증가와 연관이 있는 것으로 생각되었다.

**찾아보기 낱말**: 짧은 허혈과 재관류, 횃수, 넵다리골은근, NOS 1, NOS 2, NOS 3

### 서 론

NOS는 L-아르기닌이 산소와 반응하여 NO와

citrullin으로 대사되는 과정을 촉진하는 효소로, NOS 1 (neuronal NOS, nNOS)은 신경이나 힘줄과 연결되는 뼈대근육세포에서 주로 관찰되고 (Chang 등 1996), NOS 2 (inducible NOS, iNOS)는 큰포식세포와 비만세포, 그리고 호중성백혈구에서 (Granger 등 1988), NOS 3 (endothelial NOS, eNOS)는 혈관내

교신저자: 이완희 (삼육대학교 보건복지대학 물리치료학과)  
전자우편: whlee@syu.ac.kr

피세포와 심장근육세포에서 주로 관찰된다(Stewart 등 1994). 뼈대근육에서는 3 종류의 NOS 아형들이 모두 관찰되는 것으로 알려져 있다(Punkt 등 2001, 2002).

뼈대근육에서는 정상적으로 낮은 농도의 NO가 생성되어 몇 초 미만의 짧은 기간 동안 존재한다. 생성된 NO는 근육의 수축력을 조절하고, 사립체의 산소대사, 당대사의 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있으나, 많은 양의 NO는 다량의 peroxynitrite를 생성시켜 세포손상이나 질병을 유도한다(Reid 1998).

NOS 1에 의해 생성된 NO는 허혈 후 재관류된 뼈대근육에서 염증을 감소시키고, 혈관수축을 억제함으로써 혈류를 증진시켜 손상을 감소시킨다(Grozdanovic 2001). NOS 2에 의해 생성된 다량의 NO는 근육세포의 허혈손상을 유도하는 것으로 알려져 있다(Qi 등 2004). 그러나 NOS 2에 의해 생성된 NO가 혈관형성을 증진시켜 피판이식술(flap surgery)의 성공률을 증가시킨다는 연구도 있다(Kane 등 2001). NOS 3에 의해 생성된 NO는 혈관에서 단백질의 누출을 억제하여 손상을 감소시키거나(Ozaki 등 2002), 혈관을 확장시켜 염증세포들이 조직으로 이동하는 것을 촉진하기도 한다(Hickner 등 1997). 이러한 NO의 증가는 허혈 후 재관류 초기에 증가하여 허혈손상을 유도하거나 세포를 보호하며(Wang 등 1996), 허혈양상화의 보호효과를 유도한다고 알려져 있다(Hickner 등 1997).

허혈양상화(ischemic preconditioning)는 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 과정으로, 40분 허혈시킨 심장의 경색 크기를 감소시킨다고 알려져 있으며(Murry 등 1986), Gurke 등(1996)과 Mattei 등(2000)도 허혈양상화를 실시하면 허혈로 유도되는 뼈대근육의 세포자멸사와 피로도를 감소시킬 수 있다고 하였다. Muscari 등(2004)은 허혈양상화가 흰쥐 심장을 허혈시켰을 때 감소되는 NOS 3를 증가시키며, 이 때 생성된 NO는 허혈손상을 감소시키고, 세포를 보호한다고 하고, Jefayri 등(2000)도 허혈양상화가 허혈시킨 흰쥐의 신장에서 NOS 3를 증가시켜 손상을 감소시킨다고 하였다. 또한 Lochner 등(2002)은 허혈 전에 NO 제공물질을 투여하면 허혈양상화와

비슷한 보호효과를 유도할 수 있다고 하였다.

허혈양상화에 사용되는 허혈시간과 재관류시간 그리고 횟수는 연구자들마다 차이가 있다. Gurke 등(2000)은 10분 허혈과 10분 재관류하는 과정을 3회 실시하였고, Gurke 등(1996)은 5분 허혈과 5분 재관류하는 과정을 2회 실시하였으며, Jefayri 등(2000)은 4분 허혈과 11분 재관류를 4회 실시하였다. Sumerary와 Yellon(1999)은 허혈양상화의 횟수와 적용되는 시점 등이 허혈양상화의 보호효과에 영향을 준다고 하였다. 그러나 많은 실험에서 5분 허혈과 5분 재관류를 3회 실시하는 방법이 사용되고 있으며(Mattei 등 2000, Lochner 등 2002, Seo 등 2003a, Muscari 등 2004), 이러한 허혈양상화과정이 허혈내성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

허혈양상화의 보호효과는 장기이식이나 외과적 절제술의 성공률에 영향을 줄 수 있으며, 최근에는 허혈양상화가 NOS와 NO를 조절하여 세포를 보호할 수 있는지 확인하기 위하여 L-아르기닌과 같은 NO 공급자를 처리하거나, NOS 억제제를 투여하는 것이 허혈양상화와 허혈손상에 영향을 주는 지에 대한 연구들이 진행되고 있다.

이에, 본 연구자들은 일상생활이나 운동 등으로 짧은 기간의 허혈과 재관류가 반복적으로 일어나는 뼈대근육에서 NO의 생산 정도를 간접적으로 알 수 있는 NOS의 발현 변화를 알아보기 위하여, 9주령과 35주령 흰쥐의 넓다리근은근에서 짧은 허혈과 재관류 횟수에 따라 나타나는 NOS 이형의 발현을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

9주령과 35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(Daehan Biolink, Korea)를 정상대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군은 짧은 허혈과 재관류 반복 횟수에 따라 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 짧은 허혈과 재관류 반복 후 경과시간에 따라 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 실험처치기간 동안 사망한 실험동물을 제외하고 각

군당 6마리의 실험동물을 사용하였다(Table 1).

## 2. 실험동물 처치

우레탄(urethane, 1.5 g/kg)을 2회 복막안주사하여 실험동물을 마취시킨 후 실험을 실시하였다. 실험군은 개복 후 흰쥐용 혈관집계를 이용하여 왼온엉덩동맥을 5분 허혈과 5분 재관류하는 과정을 3회, 6회, 10회 반복하여 처치하였고, 정상대조군은 개복 후 아무런 처치를 하지 않았다.

실험처치가 끝난 뒤에 혈관집계를 제거하여 재관

류시켰으며, 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 경과 후에 실험동물을 목뼈탈골로 희생시켜 왼넙다리곧은근을 적출하였다. 실험처치 동안 전기담요를 이용하여 실험동물의 체온을 유지시켰으며, 재관류 후 발의 피부색을 관찰하여 재관류가 부적절한 실험동물은 실험에서 제외시켰다.

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

## 3. 면역조직화학염색

파라핀절편에서 크실렌을 이용하여 파라핀을 제거하고 함수시킨 뒤 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액으로 5분 동안 처리 후 PBS로 세척하고 0.4% 펩신용액 (Sigma Co., USA)으로 실온에서 8분 동안 반응시킨 뒤 PBS로 세척하였다. Rabbit block 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 산양의 정상혈청 15  $\mu$ L/mL)으로 37°C에서 1시간 처리한 뒤, 1차 항체 rabbit anti-NOS 1 Ab와 rabbit anti-NOS 2 Ab, rabbit anti-NOS 3 Ab (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:200 비율로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 2차 항체 biotinylated goat anti-rabbit IgG Ab (Vector Laboratory, USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory,

**Table 1.** Effects of cyclic short ischemia and reperfusion on mortality in 9 and 35 weeks old rats

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
9 weeks	cont	0/6	-	-	-	-
	3IP	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	6IP	0/6	0/6	0/6	0/6	4/10
	10IP	0/6	0/6	0/6	0/6	4/11
35 weeks	cont	0/6	-	-	-	-
	3IP	0/6	0/6	0/6	1/7	7/12
	6IP	0/6	0/6	0/6	0/6	10/19
	10IP	0/6	0/6	0/6	2/8	10/14

The number of rats died/total number of rats is shown.

Abbreviations

cont : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

**Table 2.** Immunoreactivities of NOS 1 in rat rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
9 weeks	cont	4.67 $\pm$ 1.53	-	-	-	-
	3IP	5.00 $\pm$ 0.00	3.00 $\pm$ 0.00	*0.33 $\pm$ 0.58	2.67 $\pm$ 0.58	1.33 $\pm$ 0.58
	6IP	5.00 $\pm$ 1.73	6.00 $\pm$ 1.00	5.33 $\pm$ 2.31	*8.67 $\pm$ 0.58	2.67 $\pm$ 0.58
	10IP	6.33 $\pm$ 0.58	5.33 $\pm$ 1.15	5.00 $\pm$ 1.00	*10.00 $\pm$ 0.00	6.67 $\pm$ 1.53
35 weeks	cont	4.33 $\pm$ 0.58	-	-	-	-
	3IP	6.00 $\pm$ 1.00	†3.00 $\pm$ 0.00	†2.33 $\pm$ 0.58	4.67 $\pm$ 0.58	5.00 $\pm$ 2.00
	6IP	†7.67 $\pm$ 0.58	4.33 $\pm$ 0.58	†2.00 $\pm$ 1.00	4.00 $\pm$ 1.00	5.67 $\pm$ 1.15
	10IP	5.00 $\pm$ 1.00	†2.67 $\pm$ 0.58	3.00 $\pm$ 1.73	4.00 $\pm$ 1.00	7.33 $\pm$ 2.08

Values determined by 3 observers were averaged and expressed as mean  $\pm$  S.D.

Abbreviations

cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, \* $p$  < 0.05 compared with 9 weeks old rats in the control group, † $p$  < 0.05 compared with 35 weeks old rats in the control group

USA)을 실온에서 30분 동안 반응시켰다. DAB kit (Vector Laboratory, USA)를 이용하여 실온에서 3~5분 동안 발색시킨 다음 1% 메칠그린용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다. 근육의 중심부분을 사진촬영하여 면역염색반응의 크기와 정도를 세 사람이 관찰하였다. 면역반응이 나타나지 않은 경우를 0점, 미약한 양성반응 3점, 약한 양성반응 6점, 중등도의 양성반응 9점, 강한 양성반응은 12점으로 크게 나누고 각각의 기준보다 강하거나 약한 경우를 고려하여 점수화하였다. 획득한 점수의 평균과 표준편차를 계산하여 Table 2와 3, 4에 정리하였고 *Student's t-test*를 실시하였다.

## 결 과

### 1. 짧은 허혈과 재관류에 의한 실험동물의 사망률

짧은 허혈과 재관류 횟수가 증가할수록, 재관류 24시간과 72시간에, 그리고 9주령군보다 35주령군에서 더 많은 실험동물이 사망하였다 (Table 1).

### 2. 면역조직화학염색

#### 1) 정상대조군

주령에 따라 관찰된 NOS 이형들의 면역반응은

**Table 3.** Immunoreactivities of NOS 2 in rat rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
9 weeks	cont	3.33±0.58	-	-	-	-
	3IP	*5.33±0.58	*10.00±0.00	*7.33±0.58	*9.33±0.58	*6.00±1.00
	6IP	4.33±0.58	*5.67±0.58	5.00±1.73	3.67±0.58	3.33±0.58
	10IP	*4.67±0.58	*7.67±0.58	*8.67±0.58	*7.67±0.58	4.33±1.53
35 weeks	cont	4.33±0.58	-	-	-	-
	3IP	†3.00±0.00	2.33±1.53	4.67±0.58	3.67±0.58	3.00±1.00
	6IP	4.33±1.15	2.67±1.15	5.67±1.53	5.00±0.00	†2.00±1.00
	10IP	3.33±1.15	†0.33±0.58	†1.00±1.00	3.00±1.00	†6.67±0.58

Values determined by 3 observers were averaged and expressed as mean±S.D.

Abbreviations

cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, \**p*<0.05 compared with 9 weeks old rats in the control group, †*p*<0.05 compared with 35 weeks old rats in the control group

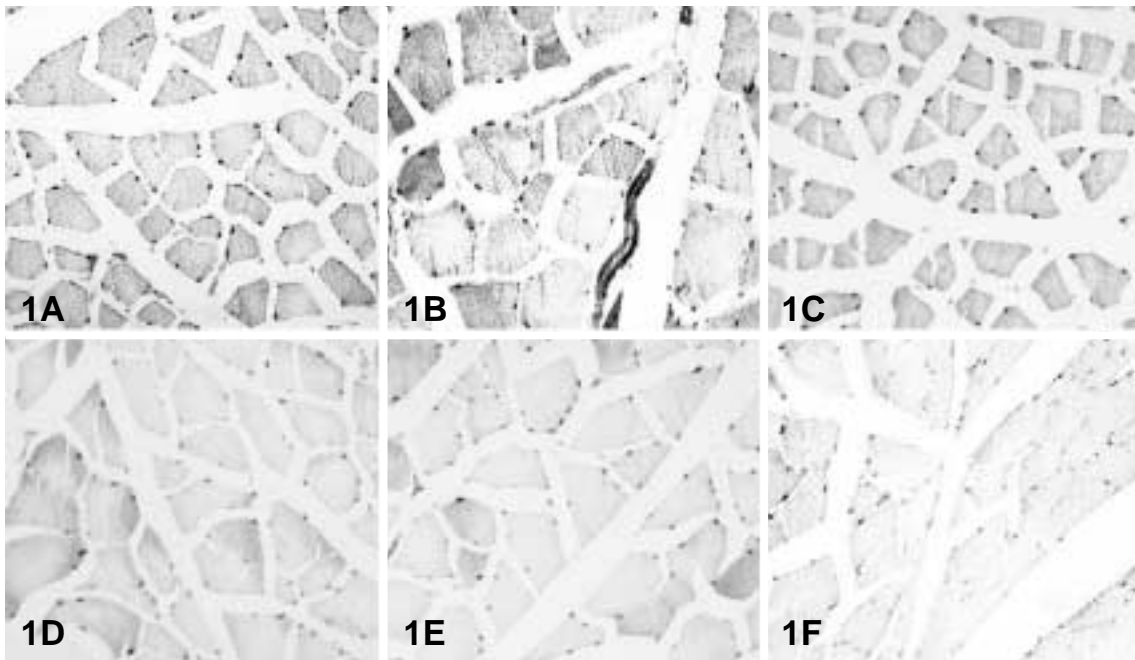
**Table 4.** Immunoreactivities of NOS 3 in rat rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
9 weeks	cont	9.67±0.58	-	-	-	-
	3IP	*5.00±1.00	*5.00±1.00	*4.00±1.00	*5.33±0.58	7.67±1.53
	6IP	*5.33±0.58	*3.00±0.00	*4.33±0.58	*2.33±0.58	7.00±2.00
	10IP	*6.67±0.58	*7.00±1.00	*4.00±1.00	*5.33±0.58	*8.33±0.58
35 weeks	cont	10.00±0.00	-	-	-	-
	3IP	†3.33±0.58	†1.33±0.58	†2.67±0.58	†3.67±1.15	†5.67±0.58
	6IP	†2.33±0.58	†3.33±1.53	†2.33±0.58	†4.00±1.00	†8.00±1.00
	10IP	†4.33±0.58	†1.33±0.58	†0.67±0.58	†5.00±1.00	†6.00±1.73

Values determined by 3 observers were averaged and expressed as mean±S.D.

Abbreviations

cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, \**p*<0.05 compared with 9 weeks old rats in the control group, †*p*<0.05 compared with 35 weeks old rats in the control group



**Fig. 1.** Distribution of NOS 1 in rat rectus femoris muscle, 24 hours after short ischemia and reperfusion. In 9 weeks aged rats, NOS 1 was increase with increasing of cyclic episod, NOS 1 was higher in 9 weeks old rats (A, B, C) than that in 35 weeks old rats (D, E, F). (A) 9 weeks old rat-3 cycles, (B) 9 weeks old rat-6 cycles, (C) 9 weeks old rat-10 cycles, (D) 35 weeks old rat-3 cycles, (E) 35 weeks old rat-6 cycles, (F) 35 weeks old rat-10 cycles, ( $\times 200$ ).

큰 차이가 없었다(Table 2, 3, 4).

## 2) 짧은 허혈과 재관류 반복군

### (1) NOS 1 면역조직화학염색

9주령군과 35주령군에서 관찰된 NOS 1 면역반응은 짧은 허혈과 재관류 반복 직후, 대조군보다 증가한뒤, 재관류 3시간과 6시간에서 감소하였고 24시간에 다시 증가하였다.

9주령군에서는 NOS 1 면역반응은 짧은 허혈과 재관류 반복 6회군과 10회군에서 3회군보다 더 증가되었다. 35주령군에서 NOS 1 면역반응은 재관류 초기에는 3회군과 6회군에서, 재관류 24시간 이후에는 10회군에서 더 증가하였다(Table 2, Figs. 1, 2).

### (2) NOS 2 면역조직화학염색

9주령군에서 관찰된 NOS 2 면역염색은 짧은 허혈과 재관류 반복 직후와 3시간에 대조군보다 증가하였으며, 3회군에서 강한 면역반응을 관찰할 수 있었

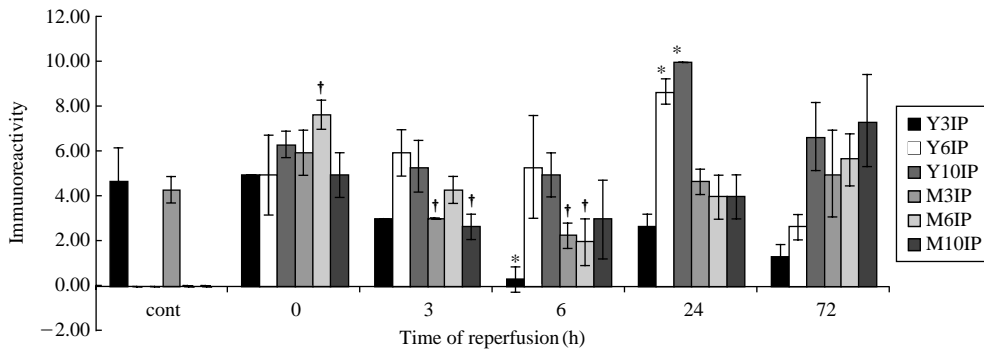
다. 재관류 6시간 경과시, 3회군과 6회군에서는 면역반응이 감소하는 반면, 10회군에서는 재관류 6시간에 증가되어 72시간까지 증가하였다.

35주령군에서 NOS 2 면역반응은 짧은 허혈과 재관류 반복 직후 대조군과 비슷하거나 감소하였으며, 6회군에서 가장 높게, 3회군에서 가장 낮게 관찰되었다. 재관류 3시간에는 재관류 직후보다 감소하며 6시간에는 증가한다. 3회군과 6회군은 재관류 24시간 이후에도 감소하였으나, 10회군에서는 72시간에 증가하였다(Table 3, Figs. 3, 4).

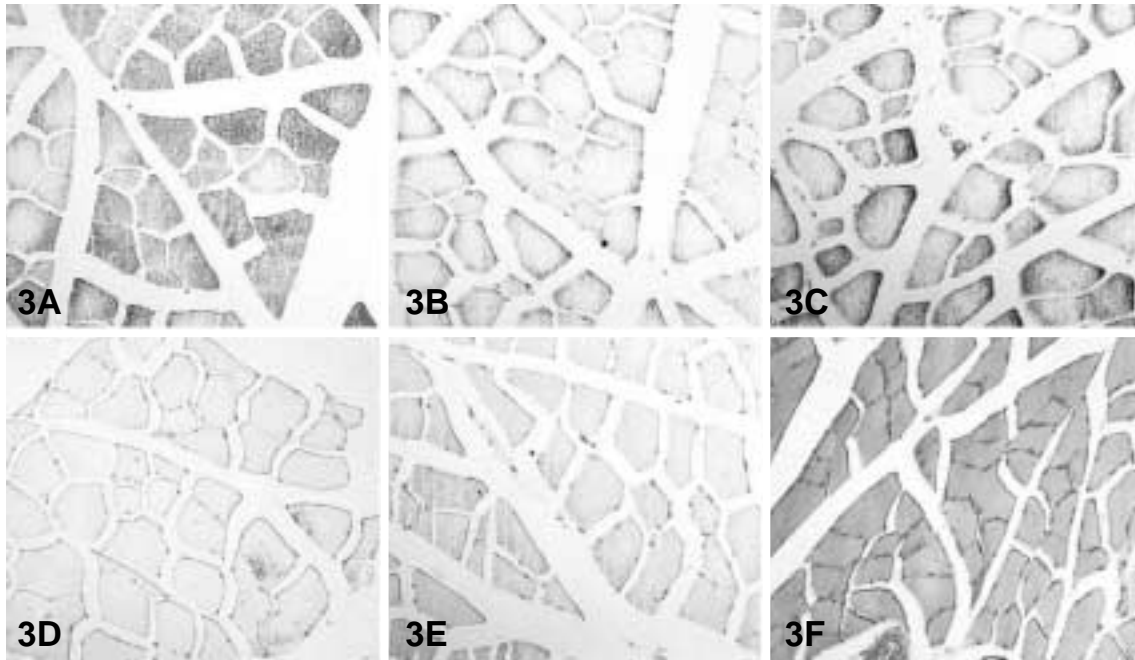
### (3) NOS 3 면역조직화학염색

NOS 3 면역반응은 근육형질막 주변에서 주로 관찰되었고, 9주령군과 35주령군에서 비슷하게 관찰되었다.

9주령군에서 NOS 3 면역반응은 짧은 허혈과 재관류 반복 직후 대조군보다 감소하며, 재관류시간이 경과하면서 증가하였고, 35주령군에서도 짧은 허혈



**Fig. 2.** Variations in NOS 1 immunoreactivity in rat rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups. Values represent the mean  $\pm$  S.D.; \* $p < 0.05$  compared with 9 weeks-old rats in the control group; † $p < 0.05$  compared with 35 weeks-old rats in the control group. cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, Y: 9 weeks-old rat, M: 35 weeks-old rat.

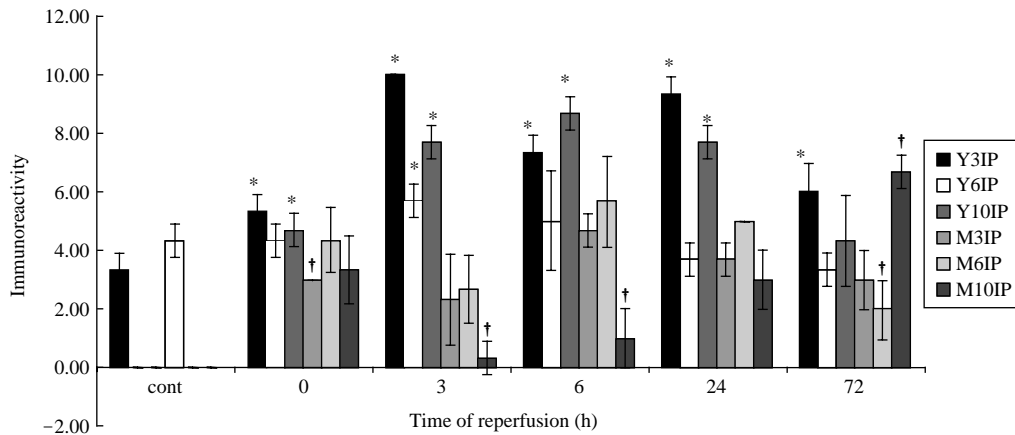


**Fig. 3.** Distribution of NOS 2 in rat rectus femoris muscle, 3 hours after short ischemia and reperfusion. NOS 2 was decreased with increasing of cyclic episodes and aging. (A) 9 weeks old rat-3 cycles, (B) 9 weeks old rat-6 cycles, (C) 9 weeks old rat-10 cycles, (D) 35 weeks old rat-3 cycles, (E) 35 weeks old rat-6 cycles, (F) 35 weeks old rat-10 cycles, ( $\times 200$ ).

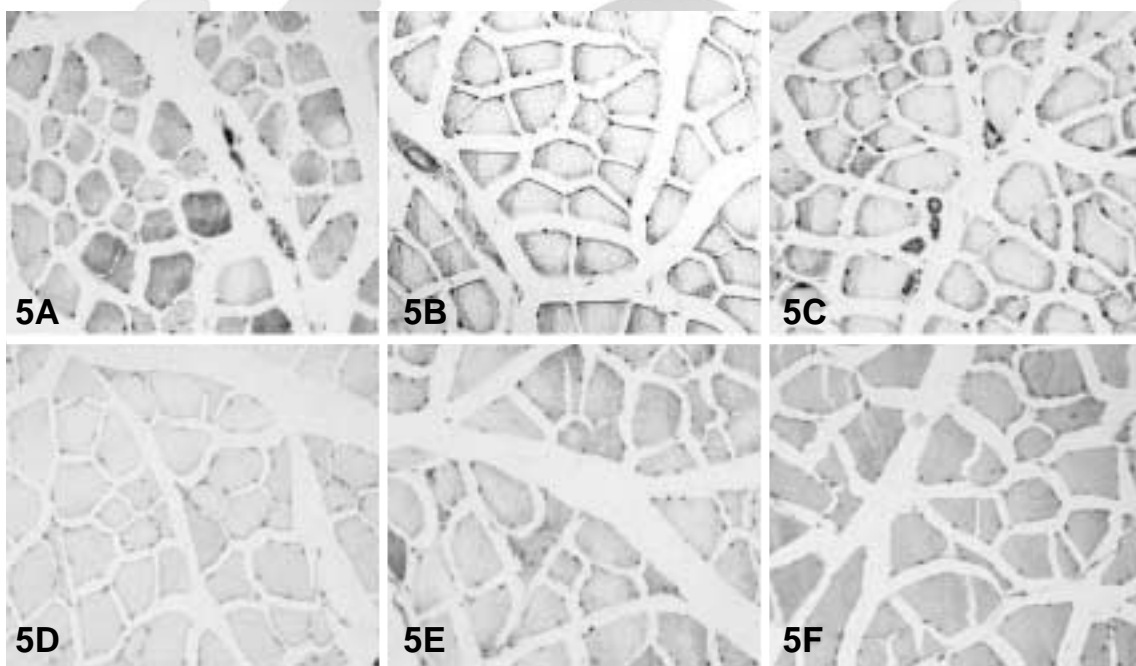
과 재관류 반복 직후 대조군보다 감소되었고, 재관류 24시간 이후에 증가하였다 (Table 4, Figs. 5, 6).

## 고찰

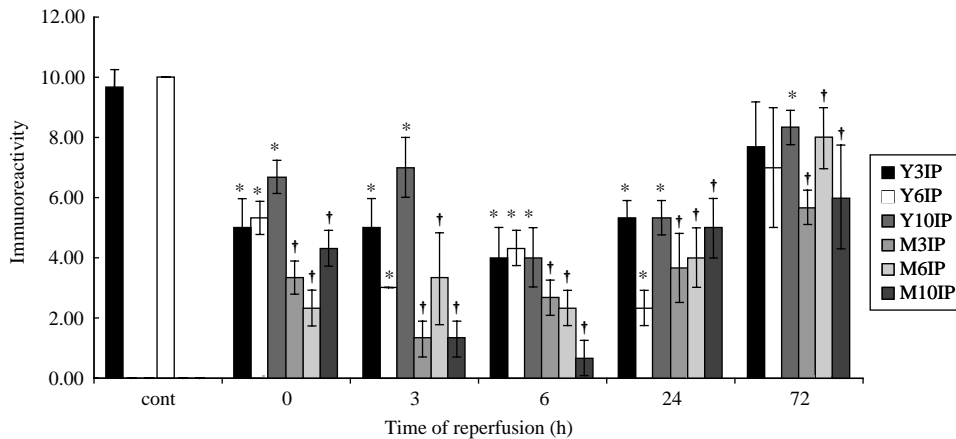
NOS 이형에 의해 생성되는 NO는 상황에 따라



**Fig. 4.** Variations in NOS 2 immunoreactivity in rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups. Values represent the mean  $\pm$  S.D.; \*  $p < 0.05$  compared with 9 weeks-old rats in the control group; †  $p < 0.05$  compared with 35 weeks-old rats in the control group. cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, Y: 9 weeks-old rat, M: 35 weeks-old rat.



**Fig. 5.** Distribution of NOS 3 in rat rectus femoris muscle, 3 hours after short ischemia and reperfusion. NOS 3 was higher in 9 weeks old rats (A, B-C) than that in 35 weeks old rats (D, E, F). (A) 9 weeks old rat-3 cycles, (B) 9 weeks old rat-6 cycles, (C) 9 weeks old rat-10 cycles, (D) 35 weeks old rat-3 cycles, (E) 35 weeks old rat-6 cycles, (F) 35 weeks old rat-10 cycles, ( $\times 200$ ).



**Fig. 6.** Variations in NOS 3 immunoreactivity in rectus femoris muscle of the control and cyclic short ischemia and reperfusion groups. Values represent the mean  $\pm$  S.D.; \* $p < 0.05$  compared with 9 weeks-old rats in the control group; † $p < 0.05$  compared with 35 weeks-old rats in the control group. cont: control, 3IP: 3 times of short ischemia and reperfusion, 6IP: 6 times of short ischemia and reperfusion, 10IP: 10 times of short ischemia and reperfusion, Y: 9 weeks-old rat, M: 35 weeks-old rat.

조직을 보호하거나 손상을 주는 역할을 한다. NOS 1은 근육형질막과 세포질에서 관찰된다 (Ho 등 2003). Grozdanovic (2001)은 24개월된 흰쥐의 뼈대 근육에서 6개월된 뼈대근육보다 NOS 1이 더 많이 관찰된다고 하였는데, 본 실험의 대조군에서 관찰된 NOS 1 면역반응은 넵다리골은근의 근육형질막과 세포질에서 관찰되었고, 주령에 따른 차이는 크지 않았다.

Nguyen과 Tidball (2003)은 10일 동안 운동을 시키지 않은 생쥐를 다시 운동시키게 되면, 호중성백혈구가 조직으로 많이 모이게 되며, 근육형질막의 염증반응과 세포손상이 증가한다고 하였다. 그러나 NOS 1이 지속적으로 발현되는 생쥐에서는 이와 같은 현상이 나타나지 않는다고 하였으며, L-NAME 처리시 세포손상과 백혈구가 증가된다고 하였다. Tidball 등(1998)도 움직이지 않던 흰쥐를 다시 운동시킬 경우 NOS 1은 감소하고, 다시 걷기 시작한 뒤 2일이 지나야 정상 수준으로 돌아온다고 하였으며, NOS 1이 감소되는 2일 동안 근육세포는 쉽게 손상된다고 하였다.

Nguyen과 Tidball (2003)과 Tidball 등(1998)의 의견을 고려하면, 본 시험에서 관찰된 짧은 허혈과 재관류 직후 대조군보다 증가된 NOS 1은 염증반응이

나 부종을 감소시킬 수 있다고 생각하였으며, 재관류 초기 3시간에 감소되었던 NOS 1이 재관류 24시간과 72시간에 증가하는 것은 Lochner 등(2002)이 제시한, 재관류 24시간 이후에 나타나는 second window 현상을 활성화시키는 데 관여할 것이라 생각할 수 있었다. Seo 등(2003a, b)은 9주령과 35주령 흰쥐의 뼈대근육을 4시간 허혈시킨 경우, 35주령의 근육에서 더 많은 세포자멸사가 나타난다고 하였는데, 이들의 실험결과를 고려하면, NOS 1 면역반응이 높게 관찰된 9주령군에서 35주령군보다 근육손상이 적게 일어날 수 있을 것이라고 생각된다.

NOS 2는 흰쥐의 뼈대근육에서 없거나 매우 낮게 관찰되고, mRNA도 정상 뼈대근육에서 거의 관찰되지 않으며, 질병상태에서 나타난다고 알려져 있다 (Hussain 등 1997). NOS 2는 내독소나 시토카인 (cytokine)에 의해서 유도되고, NOS 2에 의해 생성된 NO는 허혈과 재관류 손상의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Eu 등 2000). Thompaon 등(1996)은 내독소를 흰쥐의 정맥에 주사하면 가로막과 다리근육에서 NOS 2 mRNA가 4시간만에 증가하며, 8시간 후에는 단백질이 증가된다고 하였다. 또한 이들은 면역조직화학염색으로 NOS 2가 뼈대근육세포와 근육내의 내피세포 그리고 큰포식세포

포에서 관찰된다고 하였다. Mungrue 등 (2002)은 NOS 2가 많이 발현되는 생쥐의 심장을 허혈시키면, 과산화질소(peroxynitrite) 생성이 증가하며 부정맥의 발생도 증가하고 실험동물의 갑작스런 사망도 증가한다고 하였다.

이들의 실험결과들을 고려하면 본 실험에서 짧은 허혈과 재관류 반복 직후 넵다리곶은근에서 증가되는 NOS 2는 많은 양의 NO를 생산하여 조직손상을 유도할 수 있다고 생각되었다. 또한 NOS 2 면역반응은 9주령군의 3회군에서 가장 높게 관찰되었고, 35주령군에서는 6회군에서 높게 관찰되었으며, 35주령군보다 9주령군에서 더 증가되었다. 이는 35주령군보다 9주령군에서 많은 NO가 생성되며, 조직손상도 증가할 것이라고 생각할 수 있었다.

그러나 본 실험에서 짧은 허혈과 재관류를 반복하였을 때 실험동물의 사망률은 10회군에서 가장 높았고, 9주령 흰쥐보다는 35주령 흰쥐에서 더 많은 동물이 재관류 24시간 이후에 사망하는 것을 볼 때, 10회의 짧은 허혈과 재관류가 실험동물의 사망을 증가시킨다고 생각할 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험에서 관찰된 NOS 2 면역반응으로는 설명할 수 없었으며, 실험동물마다 자극에 대한 저항력의 차이가 있으며, 항산화제 활성도의 차이, 그리고 여러 효소들의 활성 정도에 따라 영향을 받을 수 있다고 생각할 수 있었다.

최근 Zweier 등(1995)은 허혈과 재관류가 일어나는 심장근육에서 허혈기간 동안 근육내 산소와 NADPH의 농도가 낮아지며, 산성도가 증가하여 NOS가 활성화되기에 부적절하여 NOS와는 별개의 기전으로 NO가 생성된다고 하였다. 허혈과 재관류로 산성화된 환경에서 생성된 NO는 심장의 허혈과 재관류에 해로운 역할을 한다. Lepore 등(1999)도 허혈 및 재관류된 뼈대근육에서 증가된 NO 생성은 NOS 억제제에 반응하지 않는다고 하였다. 즉 뼈대근육에서도 NOS와는 별개로 NO가 생성될 수 있다고 하였다. 그러나 아직 이렇게 생성된 NO가 어떤 역할을 하는지는 잘 알려지지 않았다.

Zweier 등(1995)과 Lepore 등(1999)의 의견을 고려하면, 10회의 짧은 허혈과 재관류가 반복되면서 감소된 NOS 2가 상대적으로 적은 양의 NO를 생산

하지만, 조직의 산성도는 증가하여 NOS와는 독립적인 방법으로 NO가 생산될 수 있다고 생각된다. 또한 이렇게 생성된 NO는 조직에 해를 줄 수 있다고 생각하였으며, 실험동물의 사망률에 영향을 미칠 수 있다고 생각되었다.

NOS 3는 뼈대근육에서 사립체의 표지자로 이용되기도 한다(Kobzik 등 1995). Rubinstein 등(1998)은 NOS 3가 모세혈관의 혈류를 증가시켜 조직의 생존에 기여하지만 이는 부종과 저혈류성 속을 악화시킬 수 있고, NOS 3 역시 반대되는 두 가지 기능을 수행할 수 있다고 하였다. 그러나 많은 연구자들은 허혈양상화로 증가되는 NOS 3가 허혈손상을 감소시켜 주는 것으로 보고하고 있다. Ozaki 등(2002)은 NOS 3가 지속적으로 발현되는 생쥐의 넵다리동맥을 30분 동안 묶어 장딴지근을 허혈시키면 대조군보다 조직손상이 감소되나, L-NAME를 처리하면 초산소기의 생성이 증가되며 뼈대근육의 손상이 증가된다고 하였다. Muscari 등(2004)는 흰쥐에서 실시하는 허혈양상화가 허혈된 심장에서 NOS 3의 감소를 예방하며, 증가된 NOS 3는 세포를 보호한다고 하였다.

NOS 3가 허혈양상화로 증가되며 세포를 보호한다는 Muscari 등(2004) 실험결과를 고려하면, 본 실험에서 짧은 허혈과 재관류 반복 직후 감소된 NOS 3가 재관류시간이 지나면서 증가하여 조직을 보호하는 데 기여할 것으로 생각되었다. 또한 9주령군에서는 재관류 3시간 이후부터, 35주령군에서는 24시간 이후에 증가하기 시작하였고, 9주령군에서 35주령군보다 NOS 3 면역반응이 높게 관찰되었는데, 이는 9주령군에서 빠르게 증가된 NOS 3가 35주령군보다 빠르게 조직을 보호할 것이라고 생각되었다. 또한 35주령 10회군의 NOS 3가 6회군보다 감소하였는데, 10회 이상의 짧은 허혈과 재관류의 반복은 NOS 3를 감소시켜 조직손상을 유도할 수 있다고 생각하였다.

앞으로 짧은 허혈과 재관류가 반복되면서 나타나는 NOS의 증가가 조직 내에서 NO의 증가를 유도하는지 확인해야 할 것이며, NOS와는 별개로 생성되는 NO를 확인하는 과정이 필요하다고 생각하였다. 또한 미발표 실험결과에서 넵다리곶은근에 세포

자멸사가 관찰되지 않은 것을 볼 때, 짧은 허혈과 재관류의 반복으로 유도되는 염증반응이나 NO가 근육조직 자체보다는 전신적인 영향을 일으키는 것으로 생각할 수 있었다.

본 실험에서 실험동물이 사망한 것과 여러 연구자들의 실험결과를 고려하였을 때, 9주령군에서 35주령군보다 증가된 NOS 1과 NOS 3가 조직손상과 개체 사망률을 감소시킬 수 있을 것이라 생각되었고, 이들의 증가는 염증반응을 감소시키고, 조직내 혈액공급을 증진하여 재건술이나 이식술의 성공률을 높이는데 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각하였다. 또한 35주령군에서 재관류기간 동안 대조군보다 낮아진 NOS 3도 실험동물의 사망에 영향을 줄 수 있을 것이라고 생각되었다. NOS 2는 35주령보다 9주령에서 더 증가하였으며, 본 실험에서 증가된 NOS 2가 개체 사망률을 감소시킬 수 있다고 생각하였다. 그러나 본 실험의 NOS 2 결과는 다른 여러 연구자들의 의견과는 많은 차이를 보이고 있는데, 이는 실험동물과 실험방법의 차이 등에 영향이 있을 것이라고 생각되었으며 이러한 NOS 2 증가가 실험동물의 사망률이나 조직손상에 어떠한 영향을 주는지는 더 연구되어야 할 것이다.

10회의 짧은 허혈과 재관류 반복군에서 3회나 6회군보다 사망률이 높았던 것으로 보아 짧은 허혈과 재관류 횟수를 많이 증가시키는 것이 조직이나 개체에 유익한 효과를 나타내지는 않는다고 생각된다. 또한 재관류 기간 동안 대조군보다 낮게 관찰된 NOS 3는 허혈과 재관류시 NOS 1이나 NOS 2보다 쉽게 영향을 받으며, 감소된 NOS 3가 조직손상에 영향을 줄 수 있다고 결론 지을 수 있었다.

## 참 고 문 헌

Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT : Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9142-9147, 1996.  
Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS : An apoptotic model for

nitrosative stress. *Biochemistry* 39: 1040-1047, 2000.  
Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT : Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81: 1129-1136, 1988.  
Grozdanovic Z : NO message form muscle. *Microsc Res Tech* 55: 148-153, 2001.  
Gurke L, Marx A, Sutter PM, Frentzel A, Salm T, Harder F, Seelig J, Heberer M : Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am Surg* 62: 391-394, 1996.  
Gurke L, Mattei A, Chaloupka K, Marx A, Sutter PM, Stierli P, Harder F, Heberer M : Mechanisms of ischemic preconditioning in skeletal muscle. *J Surg Res* 94: 18-27, 2000.  
Hickner RC, Fisher JS, Ehsani AA, Kohrt WM : Role of nitric oxide in skeletal muscle blood flow at rest and during dynamic exercise in humans. *Am J Physiol* 273: H405-410, 1997.  
Ho KM, Borja MC, Persson K, Brading AF, Andersson KE : Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human female intramural striated urethral sphincter. *J Urol* 169: 2407-2411, 2003.  
Hussain SN, Giaid A, El Dawiri Q, Sakkal D, Hattori R, Guo Y : Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 173-180, 1997.  
Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT : Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 85: 1007-1013, 2000.  
Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DR, Romero R, Messina A, Wagh M, Fraulin FO, Morrison WA, Stewart AG : Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 132: 1631-1638, 2001.  
Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS : Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 375-381, 1995.  
Lepore DA, Kozlov AV, Stewart AG, Hurlley JV, Morrison WA, Tomasi A : Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Nitric Oxide* 3: 75-84, 1999.  
Lochner A, Marais E, Toit ED, Moolman J : Nitric oxide trig-

- gers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 962: 402-414, 2002.
- Mattei A, Sutter PM, Marx A, Stierli P, Heberer M, Gurke L : Preconditioning with short cycles improves ischemic tolerance in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Eur Surg Res* 32: 297-304, 2000.
- Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M : Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 109: 735-743, 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, Calderara 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.
- Nguyen HX, Tidball JG : Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *J Physiol* 550: 347-356, 2003.
- Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, Yamashita T, Namiki M, Inoue N, Hirata Ki K, Yokoyama M : Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol* 160: 1335-1344, 2002.
- Punkt K, Zaitsev S, Park JK, Wellner M, Buchwalow IB : Nitric oxide synthase isoforms I, III and protein kinase-C theta in skeletal muscle fibres of normal and streptozotocin-induced diabetic rats with and without Ginkgo biloba extract treatment. *Histochem J* 33: 213-219, 2001.
- Punkt K, Zaitsev S, Wellner M, Schreiter T, Fitzl G, Buchwalow IB : Myopathy-dependent changes in activity of ATPase, SDH and GPDH and NOS expression in the different fibre types of hamster muscles. *Acta Histochem* 104: 15-22, 2002.
- Qi WN, Chaiyakit P, Cai Y, Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR : NF-kappaB p65 involves in reperfusion injury and iNOS gene regulation in skeletal muscle. *Microsurgery* 24: 316-323, 2004.
- Reid BM : Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 162: 401-409, 1998.
- Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS : Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 101: 1325-1333, 1998.
- 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, 2003a. (in Korean)
- Seo YK, Shin CS, Kim JH, You YJ, Paik DJ : Age-related alterations of apoptosis in ischemic-reperfused rat tibialis anterior and soleus muscles. *Korean J Phys Anthropol* 16: 291-299, 2003b. (in Korean)
- Stewart AG, Phan LH, Grigoriadis G : Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. *Microsurgery* 15: 693-702, 1994.
- Sumerary MS, Yellon DM : Ischemic preconditioning. In Grace PA, Mathie RT, eds, *Ischemia-Reperfusion Injury*. Oxford: Blackwell Science, 328-343, 1999.
- Thompson M, Becker L, Bryant D, Williams G, Levin D, Margraf L, Giroir BP : Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81: 2415-2420, 1996.
- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M : Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am J Physiol* 275: C260-266, 1998.
- Wang P, Zweier JL : Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *Biol Chem* 271: 29223-29230, 1996.
- Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P : Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1: 804-809, 1995.

Abstract

## Expression Pattern of Nitric Oxide Synthases in Rat Skeletal Muscle after Cyclic Episodes of Short Ischemia and Reperfusion

Youn-Kyoung Seo, Su-Kyoung Jeon, Hyun-Joo Park, Sang-Wan Lee,  
Bong-Cheol Koh, Duk-Ku Lee, Nam-Jin Chang, Doo-Jin Paik, <sup>1</sup>Wan-Hee Lee

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

<sup>1</sup>*Department of Physical Therapy, College of Health Science and Social Welfare, Sahmyook University*

The ischemic preconditioning was initially identified as a protective maneuver induced by brief periods of ischemia followed by reperfusion. Although ischemic preconditioning can reduce ischemic injury of heart, skeletal muscle and neuronal tissue, its protective mechanism remains elusive. Recently, several investigations suggest the associations of nitric oxide with protection from ischemic injury. Nitric oxide synthesized by a member of nitric oxide synthase (NOS) family has been known to increase or decrease the ischemic injury. The purpose of this study was to observe the expression patterns of NOS 1, NOS 2 and NOS 3 in the rat skeletal muscle after cyclic episodes of short ischemia and reperfusion.

Nine and thirty-five weeks-old male Sprague-Dawley rats were divided into control and cyclic short ischemia and reperfusion groups. The experimental group was further divided into 3 groups based on cycles of short ischemia and reperfusion. For cyclic short ischemia and reperfusion, left common iliac artery was occluded 3, 6 and 10 times for 5 minutes ischemia followed by 5 minutes reperfusion using rodent vascular clamps. The animals were sacrificed at hours 0, 3, 6, 24 and 72 after reperfusion and the left rectus femoris muscles were removed. The expression profiles and distribution of NOS 1, NOS 2 and NOS 3 were examined with immunohistochemical staining.

The results were as follows;

In the cyclic of short ischemia and reperfusion groups, the mortality was increased with increasing of cyclic episodes at 72 hours after reperfusion, and aging. In the control group, NOS 1, NOS 2 and NOS 3 immunoreactivities showed no differences with aging. In the 9 weeks-old rats, NOS 1 immunoreactivities were observed moderate at 24 hours after 6 times of short ischemia and reperfusion, and moderate and strong at 24 hours after 10 times of short ischemia and reperfusion. In the 35 weeks-old rats, NOS 1 immunoreactivities were observed trace or mild at 24 hours after 6 and 10 times of short ischemia and reperfusion. At 3 hours after 3 times of short ischemia and reperfusion, NOS 2 immunoreactivities were observed moderate or strong, and trace in the 9 and 35 weeks-old rats, respectively. At 3 hours after 10 times of short ischemia and reperfusion, NOS 3 immunoreactivities were observed mild or moderate, and trace or negative in the 9 and 35 weeks-old rats, respectively.

In summary, the expression profile of NOS 1, NOS 2 and NOS 3 were observed differently with increasing episodes of short ischemia and reperfusion. The alteration was the most prominent in NOS 3 than in NOS 1 and NOS 2. These results suggest that the alteration of NOS 3 known to protect tissue against ischemic injury may be associated with increasing mortality after multiple episodes of short ischemia and reperfusion.

**Key words** : Short ischemia and reperfusion, Cycle, NOS 1, NOS 2, NOS 3, Rectus femoris muscle