

짧은 허혈과 재관류 반복 후 흰쥐 넓다리근은근에서 나타나는 NF- κ B, AP-1, Bcl-2와 Bax의 분포

서윤경, 백두진, 남용석, 권태형¹, 김태승¹

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ¹정형외과학교실

간추림 : 허혈에 대해 내성을 가질 수 있도록 5분간 허혈과 5분간 재관류를 여러 차례 반복한 다음 흰쥐의 뼈대 근육에서 산화환원 반응에 민감한 전사인자인 NF- κ B와 AP-1 그리고 세포자멸사 억제인자인 Bcl-2와 촉진인자인 Bax의 분포를 관찰하기 위하여 본 실험을 시도하였다.

실험동물로는 9주령과 35주령 Sprague-Dawley계 수흰쥐를 사용하였고 정상 대조군, 짧은 허혈과 재관류군으로 나누었다. 짧은 허혈과 재관류는 개복후 흰쥐용 혈관집계를 사용하여 왼은엉덩동맥을 5분간 허혈시키고 5분간 재관류시키는 과정을 3회, 6회와 10회 반복한뒤 0, 3, 6, 24와 72시간에 왼넓다리근은근을 적출하고 6 μ m의 파라핀 절편을 제작하여 NF- κ B, AP-1, Bcl-2와 Bax를 면역염색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

NF- κ B의 분포는 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가할수록 처치후 3시간까지 증가하였으며, 35주령군에서 증가폭이 컸다. AP-1의 분포는 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가할수록 처치후 3시간까지 증가하였으며, 9주령군에서 증가폭이 컸다. Bcl-2의 분포는 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가할수록 처치후 3시간까지 감소하였으며 이후 다소 회복되었다. 감소폭은 35주령군에서 더 컸다. Bax의 분포는 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가할수록 처치후 3시간까지 더욱 증가하였으며, 9주령군에서는 이후 계속 감소하였으나, 35주령군에서는 24시간 경과시 다시 증가한 후 감소하였다. 증가폭은 9주령군에서 더 컸다.

이상의 결과에서 흰쥐 넓다리근은근에서는 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가되면서 나타나는 NF- κ B, AP-1, Bcl-2와 Bax 분포의 변동양상은 9주령군과 35주령군에서 유사하였으며, 회수가 증가할수록 변동폭은 더 커졌다.

찾아보기 낱말 : 짧은 허혈과 재관류, 흰쥐, NF- κ B, AP-1, Bcl-2, Bax

서 론

뼈대근육의 허혈후 재관류 현상은 외상, 사지의 재접합술 또는 절단술 등 여러 수술시 흔하게 일어나며, 허혈이 오랜 시간 지속되면 근육수축의 저하(Beyersdorf 등 1991)와 근육의 괴사(Blaisdell 등 1978, Blebea 등 1987) 같은 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 뼈대근육의 허혈후 재관류 손상은 허혈기간뿐 아니라, 재관류시에도 나타나며 (Walker

1986), 손상정도는 허혈시간에 비례하고(Blebea 등 1987), 이러한 손상은 반응성산소기의 작용으로 나타난다고 알려져 있다 (Pang 등 1993). Shatrov 등 (1997)은 반응성수산화기 TNF- α 를 매개로 NF- κ B의 활성화에 관여한다고 하였으며, Lakshminarayanan 등 (1998)은 H₂O₂가 AP-1을 활성화시켜 cytokine의 발현을 유도한다고 하였고, Tolando 등 (2000)은 세포내에서 발생된 과산화수소가 TNF- α 나 IL-1 β 를 자극하여 NF- κ B와 같은 전사인자를 활성화시킨다고 하였다.

한편, Murry 등(1986)이 짧은 허혈과 재관류를 4회 경험한 개의 심장에서 이어지는 긴 시간의 허혈에

교신저자: 김태승(한양의대 정형외과학교실)
전자우편: kimts@hanyang.ac.kr

대해 내성을 가지게 되는 현상을 '허혈양상화(ischemic preconditioning)'라 명명한 이래 많은 연구자가 심장보호효과의 원인을 규명하고자 노력하고있다.

허혈양상화의 효과는 에너지 및 포도당이용 감소에 따른 산증의 감소(Kida 등 1991), adenine 수용체의 활성화(Cohen 등 1994), K_{ATP} 이온통로의 활성화(Grover 1994), protein kinase C의 활성화(Mitchell 등 1995) 등이 알려져 있다. 이러한 연구는 대부분 5분간의 허혈과 5분간의 재관류를 3~4회 반복 경험한 경우이며 대부분 심장근육에서의 효과에 집중되어 있다.

이에 본 연구자들은 많은 연구에서 허혈에 대한 내성을 증가시켜 준다고 알려진 5분간의 허혈과 5분간의 재관류의 회수가 늘어나면서 뼈대근육에서 나타나는 변화를 관찰하기 위하여 5분간 허혈과 5분간 재관류를 3회, 6회와 10회 반복시킨 다음, 흰쥐의 넵다리곧은근에서 산화환원 반응에 민감한 전사인자인 NF- κ B와 AP-1의 분포와 세포자멸사 억제인자 Bcl-2와 촉진인자 Bax의 분포변화를 관찰하기 위하여 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 9주령과 35주령의 건강한 Sprague-Dawley계 수흰쥐를 사용하여 정상대조군과 짧은 허혈과 재관류군으로 나누었다. 짧은 허혈과 재관류군은 5분간 허혈과 5분간 재관류 경험 회수에 따라서 3회, 6회, 10회군으로 구분하였으며, 각각 재관류 시간에 따라 0시간, 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 경과군으로 세분하였으며, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험동물 처치

실험동물은 생리식염수에 희석한 우레탄(urethane, 1.15 g/kg)을 2회 복강주사하여 마취시킨 후 실험을 시행하였다. 짧은 허혈과 재관류는 개복 후 흰쥐용 혈관집게로 왼은엉덩동맥(left common

iliac artery)을 5분동안 폐색시키고 5분동안 재관류하는 과정을 각각 3회, 6회, 10회 실시하였다. 짧은 허혈과 재관류 조작후 혈관집게를 제거하여 재관류시켰으며, 재관류 0시간, 3시간, 6시간, 24시간과 72시간 뒤에 실험동물을 희생시켜 원넵다리곧은근(rectus femoris muscle)을 적출하였다. 실험동물은 처치하는 동안 백열전등으로 체온을 유지시켰으며, 재관류후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰다. 10회의 허혈양상화군은 재관류후 72시간을 견디지 못하고 사망하여 근육을 얻을 수 없었다.

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

3. 면역조직화학염색

제작한 파라핀절편을 일상적인 방법으로 탈파라핀 및 합수시킨 뒤 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 세척하고, 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액에 5분간 처리하였다. 0.4% pepsin 용액을 실온에서 8분간 반응시키고 blocking 용액을 37°C에서 1시간 처리한 뒤, 일차항체 mouse anti-NF- κ B Ab, rabbit anti-AP-1 (c-Jun Ab), rabbit anti-Bcl-2 Ab, rabbit anti-Bax Ab (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 1 : 20, 1 : 20, 1 : 25, 1 : 50으로 희석하여 4°C에서 15시간 반응시켰다. 이차항체 biotinylated horse anti-mouse IgG와 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Lab., USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector)을 실온에서 30분 반응시킨 뒤, DAB kit (Vector)를 이용하여 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경에서 200배로 관찰하였다. 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하여 면역반응의 특이성을 확인하였고, 각 군의 근육을 사진촬영하였다. 면역반응의 크기와 정도를 음성반응(-), 미약한 양성반응(+), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++), 강한 양성반응(+++)으로 나누어 관찰하였다.

결 과

1. 넓다리골근에서 나타나는 NF- κ B의 분포조건

1) 9주령 흰쥐의 소견

정상대조군에서 미약한 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재관류 3시간에 가장 많이 증가하였고 6시간 이후에는 다시 감소하였다. 3회군보다는 6회와 10회군에서 더 많이 증가되었다(Fig. 1A-C, Table 1).

2) 35주령 흰쥐의 소견

정상대조군에서 미약한 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재관류 3시간에 가장 많이 증가하였고 6시간 이후에는 다시 감소하였다. 3회군보다는 6회와 10회군에서 더 많이 증가되었다(Fig. 1D-F, Table 1).

2. 넓다리골근에서 나타나는 AP-1의 분포조건

1) 9주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 미약한 양성반응으로 관찰되었

고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재관류 3시간에 가장 많이 증가하였고 6시간 이후에는 다시 감소 하였다. 10회군에서 가장 높게 관찰되었다(Fig. 2A-C, Table 2).

2) 35주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 경도의 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재관류 3시간에 가장 많이 증가하였고 6시간 이후에는 다시 감소 하였다. 10회군에서 가장 높게 관찰되었다(Fig. 2D-F, Table 2).

3. 넓다리골근에서 나타나는 Bcl-2의 분포조건

1) 9주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 중등도의 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다 감소하였다. 재관류 3시간에 가장 많이 증가되었다(Fig. 3A-C, Table 3).

2) 35주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 강한 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재관류를 실시한 실험군은 대조군보다

Table 1. Immunoreactivity of NF- κ B in rectus femoris muscle of rat

| Age | Cycles | Times after treatment | | | | | |
|-----|-----------|-----------------------|----|-----|----|-----|-----|
| | | Control | 0h | 3h | 6h | 24h | 72h |
| 9W | 3 cycles | ± | ± | + | + | ± | ± |
| | 6 cycles | | + | ++ | + | + | + |
| | 10 cycles | | + | ++ | + | + | |
| 35W | 3 cycles | ± | + | ++ | + | + | ± |
| | 6 cycles | | ++ | +++ | + | ± | + |
| | 10 cycles | | ++ | +++ | + | ± | |

Table 2. Immunoreactivity of AP-1 in rectus femoris muscle of rat

| Age | Cycles | Times after treatment | | | | | |
|-----|-----------|-----------------------|-----|-----|----|-----|-----|
| | | Control | 0h | 3h | 6h | 24h | 72h |
| 9W | 3 cycles | ± | + | ++ | + | + | + |
| | 6 cycles | | ++ | ++ | + | ± | + |
| | 10 cycles | | +++ | +++ | ++ | + | |
| 35W | 3 cycles | + | + | ++ | + | ± | + |
| | 6 cycles | | + | ++ | + | ± | + |
| | 10 cycles | | ++ | +++ | ++ | + | |

Table 3. Immunoreactivity of Bcl-2 in rectus femoris muscle of rat

| Age | Cycles | Times after treatment | | | | | |
|-----|-----------|-----------------------|----|----|----|-----|-----|
| | | Control | 0h | 3h | 6h | 24h | 72h |
| 9W | 3 cycles | ++ | ++ | ± | + | ++ | ++ |
| | 6 cycles | | + | ± | + | ++ | + |
| | 10 cycles | | + | ± | + | ± | |
| 35W | 3 cycles | +++ | ++ | ± | + | + | ++ |
| | 6 cycles | | + | ± | + | + | ++ |
| | 10 cycles | | ± | ± | ± | + | |

Table 4. Immunoreactivity of Bax in rectus femoris muscle of rat

| Age | Cycles | Times after treatment | | | | | |
|-----|-----------|-----------------------|-----|-----|----|-----|-----|
| | | Control | 0h | 3h | 6h | 24h | 72h |
| 9W | 3 cycles | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | 6 cycles | | +++ | +++ | ++ | ± | + |
| | 10 cycles | | +++ | +++ | ++ | ± | |
| 35W | 3 cycles | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| | 6 cycles | | ++ | +++ | + | ++ | + |
| | 10 cycles | | +++ | +++ | ++ | ++ | |

감소하였다. 재판류 3시간에 가장 낮게 관찰되었다. 3회군에서 6회군이나 10회군보다 높게 관찰되었다 (Fig. 3D-F, Table 3).

4. 넓다리골은근에서 나타나는 Bax의 분포조건

1) 9주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 경도의 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재판류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재판류 3시간에 가장 많이 증가되었다. 6회군과 10회군에서 높게 관찰되었다 (Fig. 4A-C, Table 4).

2) 35주령 흰쥐의 소견

정상 대조군에서 중등도의 양성반응으로 관찰되었고, 짧은 허혈과 재판류를 실시한 실험군은 대조군보다 증가하였다. 재판류 3시간에 가장 많이 증가되었다. 10회군에서 가장 높게 관찰되었다 (Fig. 4D-F, Table 4).

고찰

뼈대근육에서 일어나는 허혈후 재판류손상은 허혈시 근육에서 형성되는 ATP의 대사물질이 재판류시 산소가 공급되면서 xanthine oxidase가 반응할 때 형성되는 초산소기 (superoxide radical)에 의해 일어나는 것 (Granger 1988, Idström 등 1990)으로 알려져 있다.

Palmer와 Paulson (1997)은 세포에서 산화환원 상태 (redox-state)에 따라 세포증식과 세포자멸사에 영향을 미치는 전사인자 NF- κ B와 AP-1이 조절된다고 하였다. 허혈후 재판류시 사립체에서 발생하는 초산소기가 세포내 여러 인산화효소의 활성을 변화시켜 NF- κ B와 AP-1을 활성화시키며, 호중성백혈구에서 분비되는 초산소기가 산화환원상태 민감성 막수용체 (redox-sensitive membrane receptor)에 작용하여 세포내에서 반응성산소기가 형성되면 NF- κ B와 AP-1은 활성화된다고 하였다. Jourdeuil 등 (1997)은 산소 산화물중 일부는 부착분자 (adhesion molecule), cytokine, 효소 등의 발현을 조절하는

NF- κ B를, 일부는 세포성장과 증식을 조절하는 AP-1을 활성화시키며 세포독성을 일으키지 않는 농도의 반응성산소기는 염증과 세포자멸사를 일으키는 유전자의 발현을 조절한다고 하였다.

Jones 등 (2000)은 초산소기와 과산화수소에 8시간 노출시킨 흰쥐 간세포의 세포자멸사는 NF- κ B를 억제시키면 감소한다고 하였고, Barazzone-Argiroffo 등 (2003)은 과산소증 (hyperoxia)으로 허파에서 NF- κ B가 감소되고 AP-1이 증가되며 세포괴사, 세포자멸사, 염증반응 등이 나타나고 이중 NF- κ B의 감소가 손상의 주원인으로 NF- κ B의 농도가 높으면 세포보호효과가 나타난다고 하였다.

Bcl-2계 단백질 (Bcl-2 family protein)은 세포의 생존과 죽음을 조절하는 중요한 단백질군으로 사립체의 속막과 겉막, 핵막, 세포질세망에 존재하는 막 단백질로 알려져 있다. 이들은 다른 Bcl-2계 단백질과 이합체 (dimer)를 형성하고 비동질성 단백질과도 결합하여 이온통로를 형성한다고 하였다. 세포자멸사는 Bcl-2계 단백질의 세포내 위치와 비율에 의존적으로 나타나게 되는 것으로 알려져 있다 (Motoyama 등 1998, Reed 1998, Lithgow 1994).

Misao 등 (1996)은 Bcl-2계 단백질 중 세포자멸사 억제인자나 촉진인자의 절대치가 세포의 죽음에 직접 영향을 미치는 것이 아니라 이 둘의 비율이 세포의 생사를 결정짓는다고 하였고, De Moissac 등 (1998)은 TNF의 자극으로 Bcl-2가 발현되는 심장근육세포에서 NF- κ B의 DNA 결합능력이 증가함에 따라 NF- κ B의 억제물질인 I- κ B가 감소되는데, 이처럼 Bcl-2가 I- κ B를 조절하는 것으로 보아, Bcl-2의 세포자멸사 억제효과는 NF- κ B의 신호전달 체계와 연관이 있다고 하였다. Maulik 등 (1999)은 짧은 시간의 허혈과 재판류를 반복시키면 심장근육세포에서 NF- κ B가 활성화되어 핵으로 이동하고 Bcl-2 mRNA가 증가한다고 하였고, 심장을 30분 허혈후 120분 재판류시키면 Bcl-2 mRNA의 발현은 억제되고 세포자멸사는 증가된다고 하였으며 이때 AP-1의 활성이 증가된다고 하였다. Seo 등 (2003)은 흰쥐의 앞정강근을 4시간동안 허혈시키면 Bax와 세포자멸사가 증가하며, 이들은 비례관계에 있다고 하였다. 또한 이들은 9주령보다는 30주령과 65주령의

흰쥐에서 세포자멸사가 더 많이 일어난다고 하였다.

Das 등(1999)은 허혈양상화시 발생하는 반응성산소기가 2차 전령물질로 작용하여 NF- κ B를 활성화시킨다고 하였고, Xuan 등(1999)은 토끼의 심장에서 허혈양상화후 NF- κ B의 DNA 결합능력이 현저히 증가한다고 하였다. Shimura 등(2002)은 허혈양상화의 심장근육 보호효과와 깊은 연관이 있는 COX-2의 발현과 NF- κ B의 활성화는 깊은 연관이 있다고 하였으며, Dawn과 Bolli (2002)는 허혈양상화시 AP-1과 NF- κ B가 활성화되어 iNOS, COX-2, aldose reductase, Mn-SOD 등을 발현시켜 보호효과를 유도한다고 하였다.

본실험에서 NF- κ B와 AP-1의 분포가 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가할수록 증가되는 것으로 보아 산화자극으로 이들의 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 세포자멸사 억제인자인 Bcl-2의 분포는 짧은 허혈과 재관류 경험이 증가할수록 감소하였으며 세포자멸사 촉진인자인 Bax는 증가한 것으로 보아, 회수가 증가할수록 산화자극이 증가하여 세포에서 변화가 일어날 것으로 생각되었다. 일반적으로 NF- κ B는 세포자멸사 억제효과와 연관이 있으며 (Hu 등 1999, Mustapha 등 2000, de Meester 등 2001, Liu 등 2002), AP-1은 세포자멸사 촉진효과와 연관이 있는 것(Dragunow와 Preston 1995, Porcile 등 2003)으로 알려져 있다. 그러나 본 실험에서 9주령군의 NF- κ B와 AP-1 그리고 Bax, 35주령군의 NF- κ B와 Bax의 재관류시간에 따른 증가감소의 경향이 같게 관찰된 것은 다소 의외였다.

이번 실험에서 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가하면서 72시간 경과시 특히, 35주령의 실험동물이 사망할 것을 예측하지 못하였다. 9주령군의 경우 짧은 허혈과 재관류를 10회 경험한 경우 재관류 72시간 경과시 6마리 모두 사망하였으며, 35주령군에서는 3회 경험한 경우 재관류 72시간 경과시 10마리 중 4마리, 6회 경험한 경우는 11마리중 5마리, 10회 경험한 경우는 10마리 모두 사망하였다. 35주령군에서 경우 짧은 허혈과 재관류 회수가 증가하면서 9주령군에 비하여 Bcl-2 분포의 감소폭이 커지고, Bax의 증가폭은 적은 것으로 보아 사망률이 증가되는 것은 Bax의 증가 때문이라기보다 Bcl-2의 감소

폭이 커진것과 연관이 있는 것으로 생각되었다.

이러한 실험동물의 사망은 넵다리곧은근에서 반복되는 짧은 허혈과 재관류로 에너지의 고갈과 반응성산소기의 형성이 증가하면서 촉진된 염증이 체내로 퍼져 여러 장기의 기능부전을 일으킨 결과(Tong 등 2002, Blaisdell 2002)일 것으로 생각되었으며, 뼈대근육은 3시간(Blaisdell 2002) 또는 4시간(Makitie와 Teravainen 1977, Labbe 등 1987)의 허혈에 가역적 손상이 일어난다는 점을 고려할 때, 반복되는 짧은 허혈과 재관류의 경험이 장시간의 허혈보다 더 위험할 수 있다고 생각되었다.

마지막으로 본 실험의 과정에서 허혈 또는 재관류 시기에 따라 발생하는 반응성산소기의 종류와 이 반응성산소기가 어떤 경로를 통해 전사인자를 활성화하며, 또한 혼합근육이 아닌 백색근육 또는 적색근육에서 나타나는 변화는 어떤 차이가 있는지 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본실험의 결과에서 흰쥐 넵다리곧은근에서는 짧은 허혈과 재관류 경험후 재관류 시간에 따른 NF- κ B, AP-1, Bcl-2와 Bax의 증가감소 경향은 9주령군과 35주령군에서 유사하였으며, 회수가 증가할수록 이들의 변동폭은 더 커졌다.

참 고 문 헌

- Barazzone-Argiroffo C, Pagano A, Juge C, Metrailler I, Rochat A, Vesin C, Donati Y : Glucocorticoids aggravate hyperoxia-induced lung injury through decreased nuclear factor-kappa B activity. *Am J Physiol* 284 : L197-L204. 2003.
- Beiersdorf F, Unger A, Wildhirt A, Kretzer U, Deuschander N, Kruger S, Matheis G, Hanselman A, Zimmer G, Satter P : Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: Preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia. *J Cardiovasc Surg* 32 : 664-676, 1991.
- Blaisdell FW, Steel M, Allen RE : Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. *Surgery* 84 : 822-834, 1978.
- Blaisdell FW : The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 10 : 620-630, 2002.

- Blebea J, Kerr JC, Hobson RW II., Padberg FJ Jr. : The effects of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Curr Surg* 44: 396–398, 1987.
- Cohen MV, Yang XM, Downey JM : Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning. *Circ Res* 74 : 998–1004, 1994.
- Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS : Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 196 : 59–67, 1999.
- Dawn B, Bolli R : Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 962 : 18–41, 2002.
- De Meester SL, Buchman TG, Cobb JP : The heat shock paradox: does NF- κ B determine cell fate. *FASEB J* 15 : 270–274, 2001.
- De Moissac D, Mustapha S, Greenberg AH, Kirshenbaum LA : Bcl-2 activates the transcription factor NF- κ B through the degradation of the cytoplasmic inhibitor I κ B α . *J Biol Chem* 273 : 23946–23951, 1998.
- Dragunow M, Preston K : The role of transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Rev* 21 : 1–28, 1995.
- Granger DN : Role of xanthine oxidase and granulocyte in ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol* 255 : H1262–H1275, 1988.
- Grover GJ : Protective effects of ATP-sensitive potassium channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 24 : S18–S27, 1994.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB : Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF- κ B and JNK activation and apoptosis through distinct pathway. *J Biol Chem* 274 : 30603–30610, 1999.
- Idström J, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 258 : H1668–H1673, 1990.
- Jones BE, Lo CR, Liu H, Pradhan Z, Garcia L, Srinivasan A, Valentino KL, Czaja MJ : Role of caspases and NF- κ B signaling in hydrogen peroxide- and superoxide-induced hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol* 278 : G693–G699, 2000.
- Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Grisham MB : Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. *J Clin Gastroenterol* 25 : S61–S72, 1997.
- Kida M, Fujiwara H, Ishida M, Kawa C, Ohura M, Miura I, Yabuuchi Y : Ischemic preconditioning preserves creatine phosphate and intracellular pH. *Circulation* 84 : 2495–2503, 1991.
- Labbe R, Cindsay T, Walker PM : The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J Vasc Surg* 6 : 152–157, 1987.
- Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA : H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 273 : 32670–32678, 1998.
- Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A : The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Diff* 5 : 411–417, 1994.
- Liu H, Lo CR, Czaja MJ : NF- κ B inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 35 : 772–778, 2002.
- Makitie J, Teravainen H : Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. *Acta Neuropathol* 37 : 101–109, 1977.
- Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK : Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF- κ B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Letters* 443 : 331–336, 1999.
- Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H : Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 94 : 1506–1512, 1996.
- Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A : Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 76 : 73–81, 1995.
- Motoyama S, Kitamura M, Saito S, Minamiya Y, Suzuki H, Saito R, Terada K, Ogawa J, Inaba H : Bcl-2 is located predominantly in the inner membrane and crista of mitochondria in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 248 : 628–636, 1998.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124–1136, 1986.

- Mustapha S, Kirshner A, De Moissac D, Kirshenbaum LA : A direct requirement of nuclear factor- κ B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 279 : H939-H945, 2000.
- Palmer HJ, Paulson KE : Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55 : 353-361, 1997
- Pang CY, Forrest CR, Mounsey R : Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery* 14 : 147-169, 1993.
- Porcile C, Stanzione S, Piccioli P, Bajetto A, Barbero S, Bisaglia M, Bonavia R, Florio T, Schettini G : Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in cerebellar granule cells: involvement of AP-1 and MAP kinases. *Neurochem Int* 43 : 31-38, 2003.
- Reed JC : Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17 : 3225-3236, 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, 2003. (in Korean)
- Shatrov VA, Boelaert JR, Chouaib S, Droge W, Lehmann V : Iron chelation decreases human immunodeficiency virus-1 Tat potentiated tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation in Jurkat cells. *Eur Cytokine Netw* 8 : 37-43, 1997.
- Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, Bolli R : Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 90 : 602-608, 2002.
- Tolando R, Jovanovic A, Brigelius-Flohe R, Ursini F, Maiorino M : Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. *Free Radic Biol Med* 28 : 979-986, 2000.
- Tong L, Toliver-Kinsky T, Edwards M, Rassin DK, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR : Attenuated transcriptional responses to oxidative stress in the aged rat brain. *J Neurosci Res* 70 : 318-326, 2002.
- Walker PM : Pathophysiology of acute arterial occlusion. *Can J Surg* 29 : 340-342, 1986.
- Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li JJ, Qiu Y, Han H, Li R, Bolli R : Nuclear factor κ B plays an essential role in the genesis of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 84 : 1095-1109, 1999.

Explanations of Photographs

Fig. 1. Immunoreactivities of NF- κ B in rat rectus femoris muscles at 3 hours after multiple ischemia and reperfusion ($\times 200$).

- A. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- B. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- C. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- D. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- E. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- F. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats

Fig. 2. Immunoreactivities of AP-1 in rat rectus femoris muscles ($\times 200$).

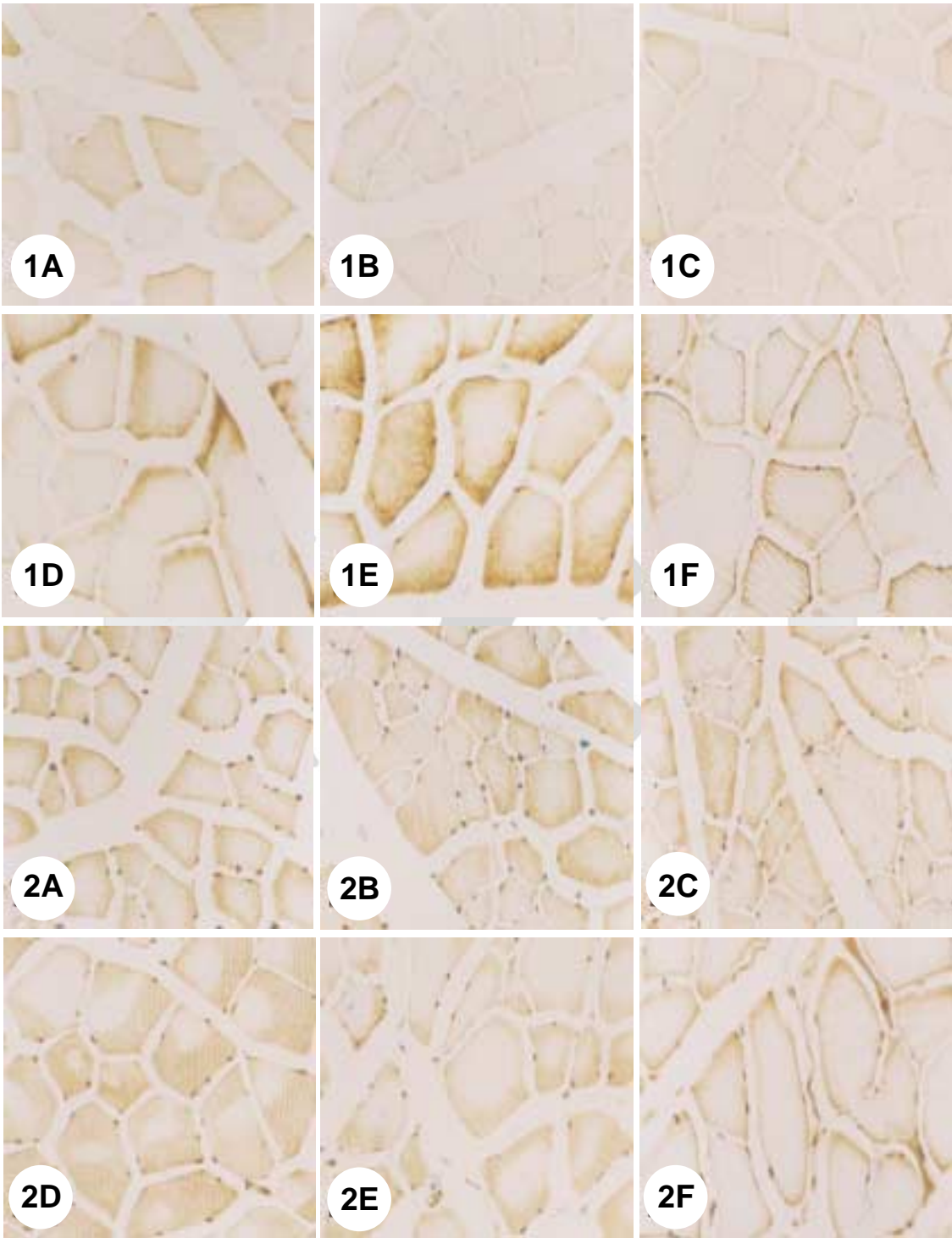
- A. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- B. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- C. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- D. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- E. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- F. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats

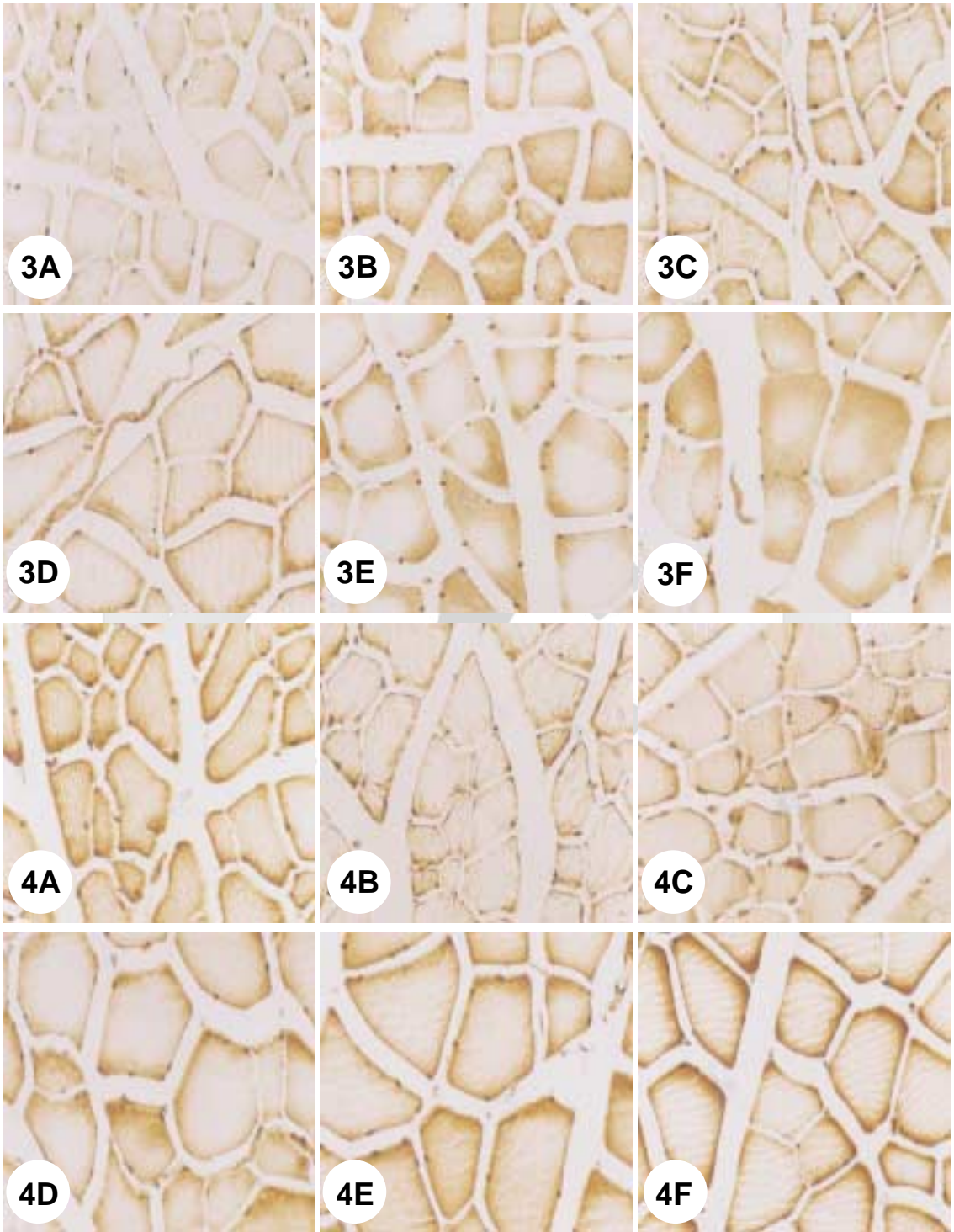
Fig. 3. Immunoreactivities of Bcl-2 in rat rectus femoris muscles ($\times 200$).

- A. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- B. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- C. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- D. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- E. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- F. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats

Fig. 4. Immunoreactivities of Bax in rat rectus femoris muscles ($\times 200$).

- A. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- B. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- C. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 9 weeks-old rats
- D. 3 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- E. 6 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats
- F. 10 times of short ischemia and reperfusion in the 35 weeks-old rats





Abstract

Effects of Multiple Cyclic Episodes with Short Ischemia and Reperfusion on the Distribution of NF- κ B, AP-1, Bcl-2, and Bax in Rectus Femoris Muscles of Rats

Youn-Kyoung Seo, Doo-Jin Paik, Yong-Seok Nam,
Tae-Hyoung Kweon¹, Tai-Seung Kim¹

*Department of Anatomy and Cell Biology, ¹Department of Orthopedics,
College of Medicine, Hanyang University*

The present study was designed to observe the expression patterns of NF- κ B and AP-1, redox-sensitive transcription factors, and Bcl-2 and Bax, apoptosis repressing and promoting factors, respectively, upon repetitive cycles of short ischemia and reperfusion.

Nine and thirty five weeks old Sprague-Dawley rats were subjected to the 3, 6, and 10 cycles of the ischemic process for 5 minutes followed by reperfusion for 5 minutes. The rats were divided by 5 groups, according to the time after treatment, such as 0, 3, 6, 24 and 72 hours. For short ischemia and reperfusion, left common iliac artery was occluded 3, 6, and 10 times for 5 minutes of ischemia followed by 5 minutes of reperfusion using rodent vascular clamps and left rectus femoris muscles were removed. The expression profiles and distribution of NF- κ B, AP-1, Bcl-2, and Bax which were observed using immunohistochemical staining methods with 6 μ m thick paraffin sections of the rectus femoris tissue were as follows:

The distribution of NF- κ B was increased as the cycles of ischemia and reperfusion increased up to 3 hours after treatment. This phenomenon was prominent in 35 weeks-old rats. The distribution of AP-1 was increased as the cycles of ischemia and reperfusion increased up to 3 hours after treatment. This phenomenon was prominent in 9 weeks-old rats. The distribution of Bcl-2 was decreased as the cycles of ischemia and reperfusion increased up to 3 hours after treatment. The extent of such reduction was more prominent in 35 weeks-old rats than 9 weeks-old rats. The distribution of Bax was increased as the cycles of ischemia and reperfusion increased up to 3 hours after treatment. After 3 hours of treatment, Bax positivity was gradually decreased in 9 weeks-old rats, but increased in 35 weeks-old rats to reach a peak at 24 hour after reperfusion. The extent of enhancement in 9 weeks-old rats was higher than that in 35 weeks-old rats.

In summary, multiple episodes of short ischemia and reperfusion altered the expression profiles of NF- κ B, AP-1, Bcl-2, and Bax in the rectus femoris muscle at the similar extents in 9 and 35 weeks-old rats. Such alterations were more more increased when the episodes were more repeated.

Key words : Short ischemia and reperfusion, Rat, NF- κ B, AP-1, Bcl-2, Bax