

## 허혈후 재관류된 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 관찰되는 PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, AP-1 분포에 관한 면역조직화학적 연구

서운경, 김창수<sup>1</sup>, 전수경, 김상범, 윤양하, 박주진<sup>2</sup>, 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, <sup>2</sup>치과학교실

<sup>1</sup>연변대학의학원 해부학교실

**간추림** : 뼈대근육의 허혈손상은 재관류시에 주로 일어나며, 재관류 동안 발현되는 여러 유전자와 전사인자들이 신호전달체계를 활성화시켜 세포손상을 유도한다고 알려져 있다. 이에 저자들은 허혈과 재관류시 관찰되는 전사인자 NF- $\kappa$ B와 AP-1, 그리고 이들을 활성화시키는 PKC $\theta$ 의 변화를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

9주령과 30주령, 65주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하여 대조군과 허혈군으로 나누었다. 실험동물을 4시간 허혈시키고, 재관류 0시간, 1시간, 3시간, 6시간에 희생시켜 앞정강근과 가자미근을 적출하여, PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B와 AP-1의 면역조직화염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대조군에서 PKC $\theta$  면역반응은 주령이 증가할수록 감소하였고, 앞정강근에서 높게 관찰되었다. 허혈군에서 PKC $\theta$  면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였고, 가자미근에서 높게 관찰되었다. 대조군에서 NF- $\kappa$ B 면역반응은 주령이 증가할수록 감소하였다. 허혈군에서 NF- $\kappa$ B 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였고, 가자미근에서 높게 관찰되었다. 대조군에서 AP-1 면역반응은 주령이 증가할수록 감소하였다. 허혈군에서 AP-1 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였고, 앞정강근에서 높게 관찰되었다. 허혈시 PKC $\theta$  면역반응의 증가 또는 감소는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 면역반응의 증가 또는 감소와 같은 양상으로 나타났다.

이상의 결과에서 허혈 및 재관류시 흰쥐의 뼈대근육에서 관찰되는 PKC $\theta$  면역반응의 증가는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 면역반응을 증가시키는 것으로 생각되었으며, 주령이 증가할수록 앞정강근이 가자미근보다 허혈자극에 대하여 민감하게 반응하는 것으로 결론지을 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : 허혈, 흰쥐, 앞정강근, 가자미근, PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, AP-1

### 서 론

뼈대근육은 백색근육섬유와 적색근육섬유 그리고 중간형근육섬유의 혼합섬유로 구성되어 있으며, 근육섬유 종류에 따른 허혈손상의 정도는 연구자들에 따라 의견의 차이가 있다 (Sternbergh와 Adelman 1992, Carvalho 등 1995, Woitaske와 McCater 1998). 앞정강근은 주로 백색근육섬유로 구성되어 있으며, 빠르게 수축하고 쉽게 피로해지며 당원대사를 주로 이용하여 에너지를 얻는다. 이와 반대로 가자미근은

주로 적색근육섬유로 이루어져 있으며 천천히 수축하고 피로에 대한 저항력이 크며, 산화대사를 이용하여 에너지를 얻는다고 알려져 있다 (Lindsay 등 1990). 또한 나이가 들면 뼈대근육을 구성하는 근육섬유의 조성비율이 변하고 (Punkt 등 1998), 호르몬의 변화, 근육량의 감소 등 여러가지 변화가 일어나 허혈손상이 쉽게 일어난다고 알려져 있다 (Holloszy 등 1991).

허혈손상의 주된 원인으로 알려진 활성산소기는 허혈후 재관류시 주로 생성되어, 여러 종류의 단백질분해효소와 싸이토키인, 전사인자 등을 활성화시켜 다양한 병태생리적 반응과 세포손상을 일으킨다

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

(Baxter 등 1995).

단백질인산화효소의 하나인 protein kinase C (PKC)는 serine/threonine protein kinase의 하나로 11가지의 이형이 알려져 있다. PKC 이형들은 세포의 종류와 조직의 종류 그리고 종에 따라서 다르게 분포하며 (Stabel과 Parker 1991), 그 중 PKC $\theta$ 는 혈구형성 세포와 뼈대근육에서 국한되어 발현되는 특성이 있다 (Meller 등 1998, Altman과 Villalba 2003).

PKC의 활성화는 여러 생리적 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 산화자극이 있을 때, PKC 이형들이 inhibitor  $\kappa$ B $\beta$  ( $I\kappa$ B $\beta$ ) kinase (Lin 등 2000)와 c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Avraham 등 1998)를 활성화시켜 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 활성화시킨다는 연구도 있다.

NF- $\kappa$ B와 AP-1은 허혈 및 재관류시 주로 활성화되는 전사인자로 다양한 생리적, 병리적 반응을 일으킨다 (Morgan 등 1999). NF- $\kappa$ B는 억제단백질인  $I\kappa$ B $\beta$ 와 결합되어 비활성화 상태로 세포질에 존재한다 (O'Neill과 Kaltschmidt 1997).  $I\kappa$ B가 인산화되어 NF- $\kappa$ B가 활성화되면 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 여러 유전자의 발현을 유도하여 세포를 보호하거나 또는 세포자멸사를 유도한다 (Sun 등 1993).

AP-1 역시 산화자극이 있는 경우 JNK에 의해서 활성화되어 여러 유전자의 발현을 유도하며, NF- $\kappa$ B와는 달리 주로 세포자멸사를 일으킨다고 알려져 있다 (Maulik 등 1999).

이에 저자들은 산화자극에 의해 활성화되는 PKC $\theta$ 의 분포와 PKC $\theta$ 의 활성화되는 것으로 알려진 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 분포가 허혈 후 재관류시킨 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 주령이 증가함에 따라 어떻게 변화하는지 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

9주령 (9주군), 30주령 (30주군), 65주령 (65주군)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (대한바이오링크)를 사용하여 정상대조군과 허혈군으로 나누었다. 허혈군은 재관류시간에 따라 0시간, 1시간, 3시간, 6시간 경

과군으로 세분하였으며, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

### 2. 실험동물 처치

생리식염수에 희석한 우레탄 (urethane, 1.15 g/kg)을 2회 복강내주사하여 실험동물을 마취시킨 뒤 개복하여 왼온영덩동맥을 4시간 동안 흰쥐용 혈관집게로 묶어 허혈시켰다. 혈관집게를 제거한 뒤 재관류 0시간, 1시간, 3시간과 6시간에 실험동물을 희생시켜 왼쪽 앞정강근과 가자미근을 적출하였다. 실험처치기간 동안 백열전등을 이용하여 실험동물의 체온을 유지시켰으며, 재관류 후 발의 피부색과 근육을 관찰하여 부적절한 재관류가 일어난 실험동물은 실험에서 제외시켰다.

### 3. 면역조직화학염색

적출한 근육은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 24시간 이내로 고정시킨 후 6 $\mu$ m 두께의 파라핀절편을 제작하였다. 파라핀절편을 일상적인 방법으로 탈파라핀 및 함수시킨 뒤, 3% 과산화수소-메탄올 혼합용액에 5분간 처리하였다. 0.4% 펩신 용액으로 실온에서 8분간 반응시키고 차단용액 (blocking solution)으로 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 일차항체 rabbit anti-PKC $\theta$  antibody, mouse anti-NF- $\kappa$ B antibody, rabbit anti-AP-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 1:20, 1:50, 1:40으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이차항체 biotinylated horse anti-mouse IgG antibody와 biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Lab., USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector)을 실온에서 30분동안 반응시킨 뒤, DAB kit (Vector)를 이용하여 발색시킨 다음 1% 메틸그린 용액으로 대조염색 후  $\times 200$  배율의 광학현미경으로 관찰하였다. 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하여 면역반응의 특이성을 확인하였고, 각 군의 근육 중심부위를 사진촬영하였다. 3명의 관찰자가 면역반응의 크기와 정도를 관찰하였다. 면역반응이 나타나지 않은 경우를 0점, 미약한 양성반응 3점, 약한 양성반응 6점, 중등도의 양성반

응 9점, 강한 양성반응 12점으로 크게 나눈 뒤 각각의 기준보다 강하거나 약한 경우를 고려하여 점수화하였다. 획득한 점수의 평균을 구하여 그 결과를 Table 1과 2, 3에 요약하였고, Student t-test를 실시하였다.

## 결 과

### 1. PKC $\theta$ 면역조직화학염색

대조군에서 PKC $\theta$  면역반응은 9주군에서 가장 높게 관찰되었다. 주령이 증가할수록 감소하였으나 65주군에서 30주군보다 높게 관찰되었고, 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었다.

허혈군에서는 주령이 증가할수록 PKC $\theta$  면역반응도 증가하였으며, 9주군과 30주군에서는 앞정강근에서 더 높게, 65주군은 가자미근에서 더 높게 관찰되었다(Table 1, Fig. 1).

### 2. NF- $\kappa$ B 면역조직화학염색

대조군에서 NF- $\kappa$ B 면역반응은 주령이 증가할수록 감소하였고, 앞정강근과 가자미근에서는 비슷한 수준으로 관찰되었다.

허혈군에서 NF- $\kappa$ B 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였으며, 가자미근에서 앞정강근보다 높게 관찰되었다. 9주군은 앞정강근에서 높게, 30주와 65

주군은 가자미근에서 높게 관찰되었다(Table 2, Fig. 2).

### 3. AP-1 면역조직화학염색

대조군에서 AP-1 면역반응은 주령이 증가할수록 감소하였으며, 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었으나 그 차이는 크지 않았다.

허혈군에서 AP-1 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였으며, 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었다(Table 3, Fig. 3).

## 고 찰

PKC는 여러 세포의 분화와 성장, 재생 등을 조절하며, 세포의 신호전달에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Stabel과 Parker 1991). Moraczewski 등(2002)은 손상된 흰쥐의 가자미근과 긴발가락편근이 재생될 때 PKC $\alpha$ 와 - $\epsilon$ , - $\delta$ , - $\theta$ , - $\zeta$ , - $\beta$ , - $\eta$  등이 나타남을 관찰하였고, 이들의 분포는 재생시기와 근육섬유의 종류에 따라 다르다고 하였다.

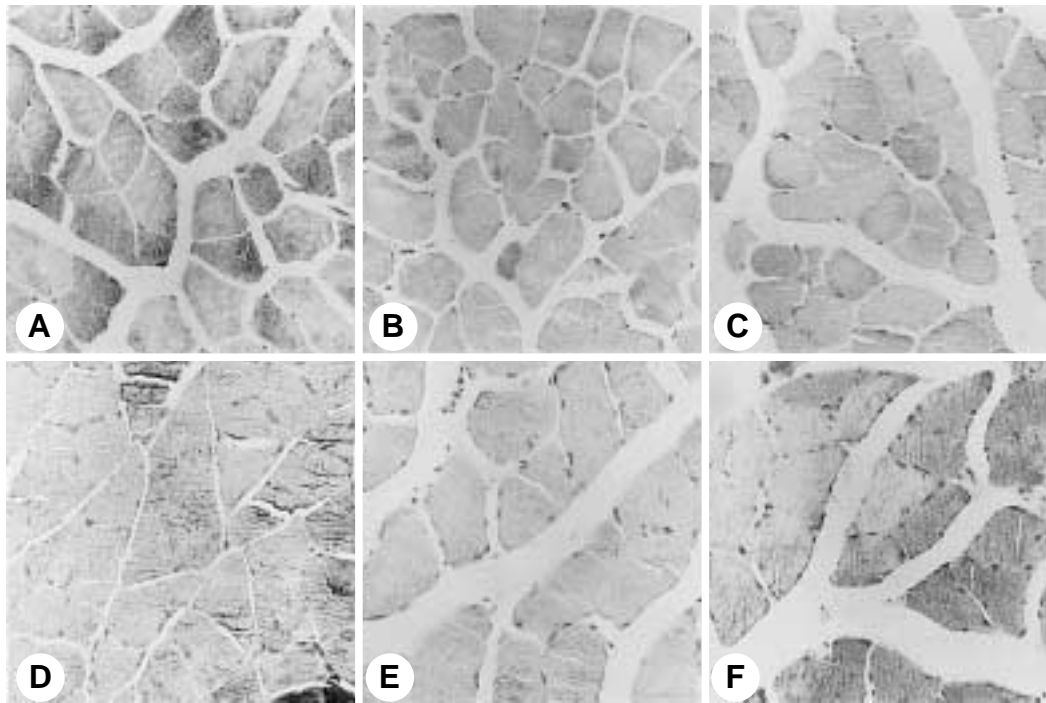
Hilgenberg와 Miles(1995)는 PKC $\theta$ 가 뼈대근육의 발달과 신경근육연접의 성숙에 관여한다고 하였고, Moraczewski 등(2002)은 손상된 근육이 재생될 때 PKC $\theta$ 가 세포질에서 관찰된다고 하였다. Donnelly 등(1994)은 PKC $\theta$ 가 뼈대근육에서 당의 이동과 대사를 조절하고, 당원대사에서 에너지를 획득하는 백

**Table 1.** Immunoreactivities of PKC $\theta$  in the rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemia groups

	Normal control	Reperfusion time after ischemia for 4 hours			
		0	1	3	6
9 weeks					
TA	8.83 $\pm$ 1.47	3.17 $\pm$ 1.17*	6.50 $\pm$ 2.17	7.50 $\pm$ 2.35 $\S$	3.50 $\pm$ 1.05*
Sol	8.50 $\pm$ 1.97	2.33 $\pm$ 1.03*	6.17 $\pm$ 1.72	1.67 $\pm$ 0.82*	3.33 $\pm$ 1.03*
30 weeks					
TA	2.67 $\pm$ 0.52 $\S$	6.67 $\pm$ 1.37*	5.83 $\pm$ 0.98 $\S$	5.00 $\pm$ 1.26*	2.33 $\pm$ 0.82
Sol	0.83 $\pm$ 0.75	6.33 $\pm$ 1.21*	4.67 $\pm$ 0.82*	6.67 $\pm$ 1.86 $\S$	5.33 $\pm$ 1.03 $\S$
65 weeks					
TA	3.50 $\pm$ 0.84	8.00 $\pm$ 2.76*	6.50 $\pm$ 1.22*	3.17 $\pm$ 1.47	1.67 $\pm$ 0.52*
Sol	3.17 $\pm$ 1.33	10.17 $\pm$ 1.94*	7.00 $\pm$ 1.41*	8.33 $\pm$ 1.97 $\S$	3.83 $\pm$ 1.60 $\S$

Values are mean  $\pm$  S.D.

Abbreviations: TA : tibialis anterior muscle, Sol : soleus muscle, \* $P$ <0.05 compared with the control group,  $\S$  $P$ <0.05 significantly different between TA and Sol



**Fig. 1.** Distribution of PKCθ in rat skeletal muscle, 1 hour after ischemia. PKCθ was increased with aging, and was higher in Sol than that in TA. (A) 9 weeks old rat, TA, (B) 30 weeks old rat, TA, (C) 65 weeks old rat, TA, (D) 9 weeks old rat, Sol, (E) 30 weeks old rat, Sol, (F) 65 weeks old rat, Sol. TA; tibialis anterior muscle, Sol; soleus muscle. (× 200)

색근육섬유에서 PKCθ가 더 많이 분포한다고 하였다.

본 실험에서 모든 주령의 대조군에서 관찰된 PKCθ 면역반응은 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었는데, 이는 Donnelly 등(1994)의 의견과 일치한다. 또한, PKCθ 면역반응은 9주군에서 가장 높게 관찰되었는데, 9주군이 사춘기에 해당하는 성장기라는 것을 생각한다면, 뼈대근육의 성장과 성숙이 일어나고 있기 때문에 가장 높게 관찰되었을 것이라 생각되었다. 30주군에서 PKCθ 면역반응이 감소하는 것은 근육의 성숙과 성장이 끝난 시기이기 때문이라고 생각하였으며, 65주군에서 PKCθ가 다시 증가하는 것은 노화가 진행됨에 따라 뼈대근육 내에 당원대사를 주로 이용하는 백색근육섬유의 수가 증가하기(Punkt 등, 1998) 때문이라고 생각되었다. 그러나 65주군의 PKCθ 면역반응은 9주군보다 낮게 관찰되었다.

허혈시 PKCθ 면역반응은 허혈직후 감소하나 재관류 3시간 이후에는 증가하였다. 또한 PKCθ 면역반응은 9주군에서 가장 높게 관찰되었고, 주령이 증가할수록 낮게 관찰되었으며, 앞정강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었다(Fig. 1). 뼈대근육에서 일어나는 허혈손상이 재관류 3시간에 시작하여 6시간에 대부분 끝난다는 Blaisdell (2002)의 의견과 근육 재생시 PKCθ가 증가한다는 Moraczewski 등(2002)의 의견을 고려하면 재관류 3시간에 증가된 PKCθ가 허혈손상에서 근육세포를 보호할 것이라고 생각할 수 있었다.

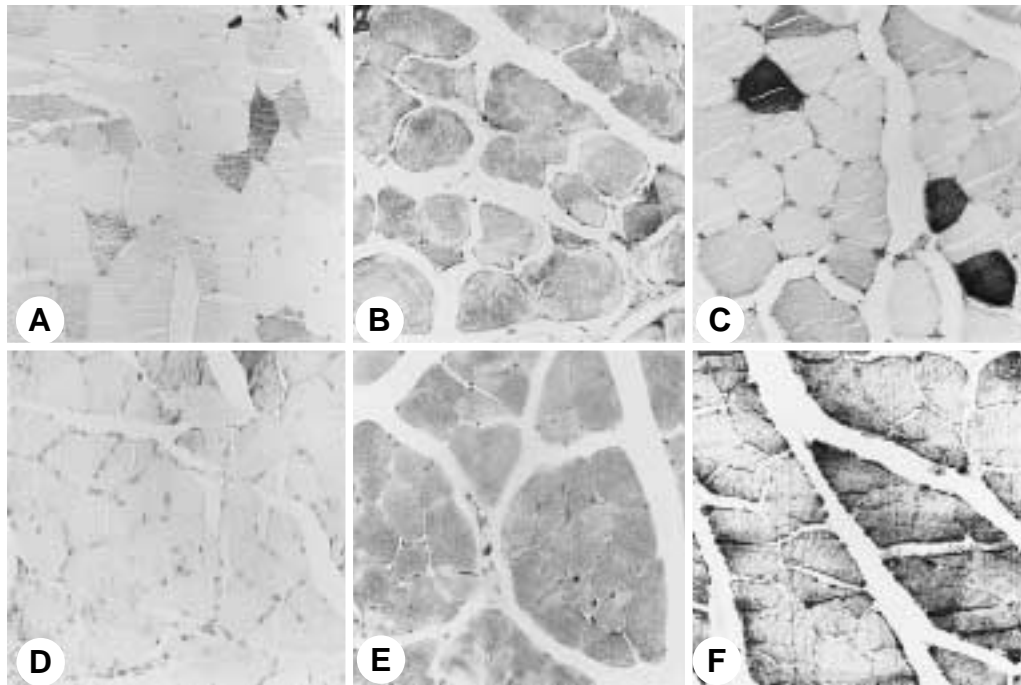
Ogata 등(2000)은 사람의 배꼽정맥내피세포를 배양할 때 산화자극이 PKCθ와 NF-κB를 활성화 시킨다고 하였고, PKC 억제제를 처리하면 NF-κB의 활성이 감소된다고 하였다. Avraham 등(1998)은 T세포에서 산화자극을 가하면 PKCθ가 AP-1을 활성화

**Table 2.** Immunoreactivities of NF-κB in the rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemia groups

	Normal control	Reperfusion time after ischemia for 4 hours			
		0	1	3	6
9 weeks					
TA	6.83 ± 1.47	3.83 ± 1.72*	4.50 ± 1.22* <sup>§</sup>	3.67 ± 0.82*	5.17 ± 1.72
Sol	6.33 ± 2.88	1.83 ± 0.98*	2.67 ± 0.82*	5.33 ± 1.51 <sup>§</sup>	3.83 ± 1.60
30 weeks					
TA	6.17 ± 1.33	3.17 ± 0.98*	8.33 ± 1.51*	5.67 ± 2.25	4.67 ± 1.86
Sol	4.83 ± 1.72	7.33 ± 2.88 <sup>§</sup>	9.50 ± 0.84*	7.50 ± 2.43*	6.83 ± 1.94
65 weeks					
TA	1.33 ± 1.03	5.33 ± 1.21*	8.33 ± 2.42*	7.67 ± 2.50*	1.33 ± 1.03
Sol	2.50 ± 1.64	7.50 ± 2.51*	9.17 ± 2.40*	9.17 ± 2.23*	3.17 ± 1.72

Values are mean ± S.D.

Abbreviations: TA : tibialis anterior muscle, Sol : soleus muscle, \**P* < 0.05 compared with the control group, <sup>§</sup>*P* < 0.05 significantly different between TA and Sol



**Fig. 2.** Distribution of NF-κB in rat skeletal muscle, 1 hour after ischemia. NF-κB was increased with aging. NF-κB was higher in Sol than that in TA of the 30 weeks and 65 weeks old rats. (A) 9 weeks old rat, TA, (B) 30 weeks old rat, TA, (C) 65 weeks old rat, TA, (D) 9 weeks old rat, Sol, (E) 30 weeks old rat, Sol, (F) 65 weeks old rat, Sol. TA; tibialis anterior muscle, Sol; soleus muscle. (× 200)

시킨다고 하였다.

본 실험에서 재관류 시간이 지남에 따라 PKCθ의

면역반응은 증가 또는 감소되는 것으로 관찰되었다.

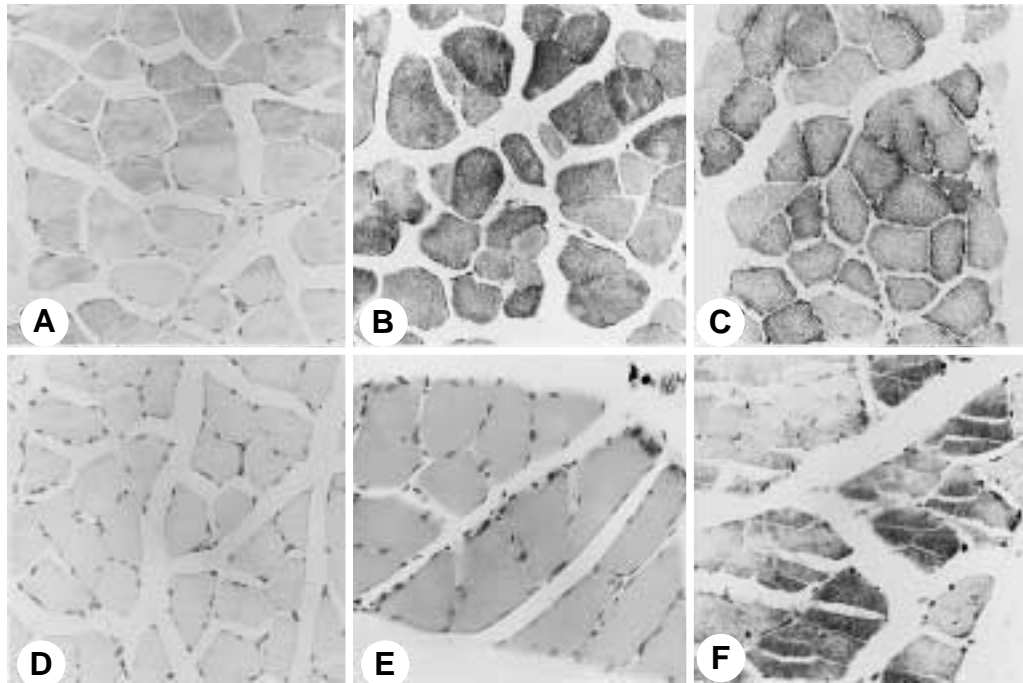
NF-κB와 AP-1 면역반응의 증가 감소는 시간적 차

**Table 3.** Immunoreactivities of AP-1 in the rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemia groups

	Normal control	Reperfusion time after ischemia for 4 hours			
		0	1	3	6
9 weeks					
TA	4.83 ± 0.75	3.33 ± 1.21* <sup>§</sup>	5.33 ± 1.03 <sup>§</sup>	7.33 ± 1.03* <sup>§</sup>	5.83 ± 1.17 <sup>§</sup>
Sol	5.83 ± 1.83	2.00 ± 0.63*	1.67 ± 0.82*	5.17 ± 1.47	1.33 ± 0.82*
30 weeks					
TA	4.40 ± 1.14	5.67 ± 1.03	10.00 ± 1.10* <sup>§</sup>	4.67 ± 0.82 <sup>§</sup>	5.17 ± 0.75
Sol	2.83 ± 1.47	2.83 ± 1.17	1.67 ± 0.82	3.00 ± 1.41	3.83 ± 1.84
65 weeks					
TA	1.00 ± 0.89	7.17 ± 1.47*	9.33 ± 1.37*	10.00 ± 1.67*	1.83 ± 0.41
Sol	1.17 ± 0.75	8.17 ± 1.47*	9.00 ± 2.00*	7.50 ± 2.17*	1.50 ± 0.55

Values are mean ± S.D.

Abbreviations: TA : tibialis anterior muscle, Sol : soleus muscle, \**P* < 0.05 compared with the control group, <sup>§</sup>*P* < 0.05 significantly different between TA and Sol



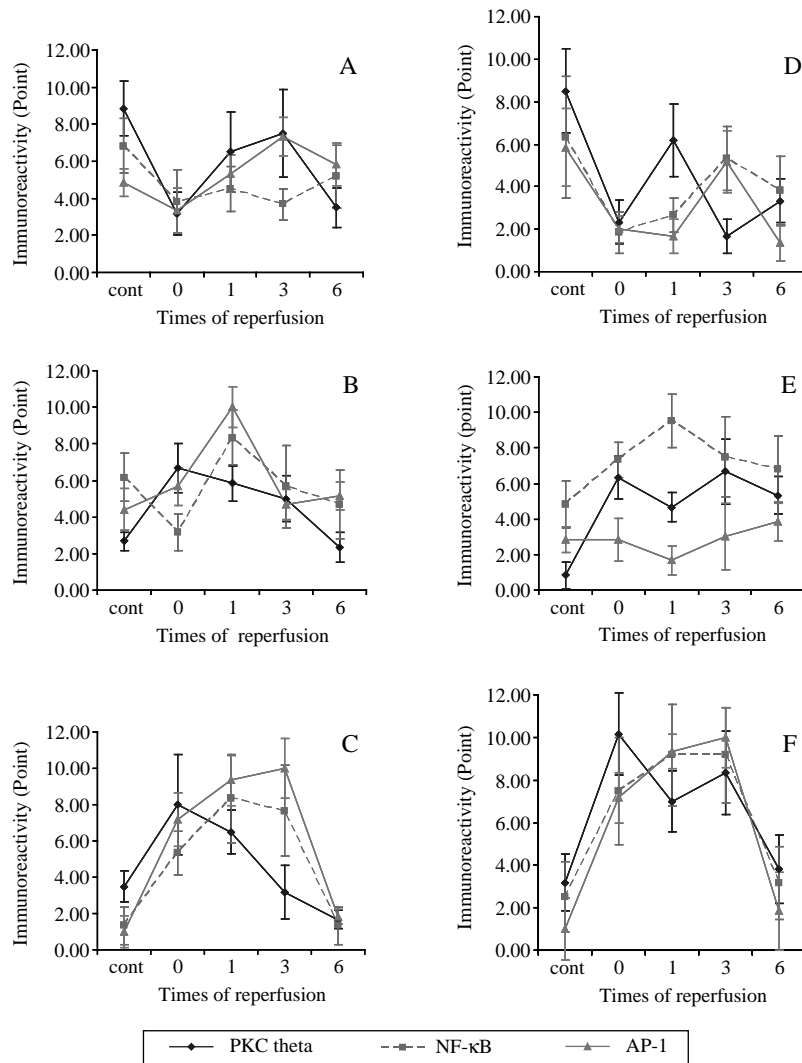
**Fig. 3.** Distribution of AP-1 in rat skeletal muscle, 1 hour after ischemia. AP-1 was increased with aging, and was higher in TA than that in Sol. (A) 9 weeks old rat, TA, (B) 30 weeks old rat, TA, (C) 65 weeks old rat, TA, (D) 9 weeks old rat, Sol, (E) 30 weeks old rat, Sol, (F) 65 weeks old rat, Sol. TA; tibialis anterior muscle, Sol; soleus muscle. (× 200)

이는 있으나 PKC $\theta$ 의 면역반응의 증감과 일치하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). Avraham 등(1998)과 Ogata 등(2000)의 의견을 고려하면, 뼈대근육에

서 허혈시 관찰되는 PKC $\theta$ 가 NF- $\kappa$ B와 AP-1활성화에 영향을 줄 수 있다고 생각되었다.

Mattson 등(1997)은 NF- $\kappa$ B가 산화자극에서 세포

— 허혈후 관찰되는 PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, AP-1의 분포 —



**Fig. 4.** Variations in PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, and AP-1 immunoreactivities of the control and ischemia groups. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (A) 9 weeks old rat, TA, (B) 30 weeks old rat, TA, (C) 65 weeks old rat, TA, (D) 9 weeks old rat, Sol, (E) 30 weeks old rat, Sol, (F) 65 weeks old rat, Sol. TA: tibialis anterior muscle, Sol: soleus muscle.

를 보호한다고 하였으나, Kim과 Chun (2003)은 토끼의 관절연골세포에 일산화질소를 처리하면 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 연골세포의 세포자멸사를 유도한다고 하였다. Maulik 등(1999)은 심장을 허혈시키면 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 활성이 증가되고, 허혈양상화는 허혈후 NF- $\kappa$ B 활성을 증가, AP-1 활성을 감소시키

며, 세포자멸사를 감소시킨다고 하였다. 여러 실험에서 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성화가 세포에 미치는 영향이 다르게 나타나는데, 이는 세포에 가해지는 자극의 종류와 강도의 차이, 그리고 세포의 종류와 나이, 생리적 상태 등에 따라 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성도가 다르기 때문이라고 생각된다(Mattson 등 1997).

한편, Sternbergh와 Adelman (1992)은 앞정강근과 장딴지빗근 그리고 가자미근을 2시간 허혈시키면, 대조군보다 손상이 증가하나 근육섬유의 종류에 따른 차이는 의미가 없다고 하였다. Gurke 등 (2000)은 3시간 허혈시 적색근육에서 일어나는 손상이 백색근육보다 크다고 하였다. Carvalho 등 (1995)은 흰쥐의 뒷다리를 2시간 허혈시켰을 때, 가자미근보다는 장딴지근과 장딴지빗근에서 근육양이 더 많이 감소된다고 하였고, 허혈시 근육의 대사과 기능 유지에 근육섬유의 종류가 중요한 역할을 한다고 하였다. Woitaske와 McCarter (1998)는 생쥐의 긴발가락뿔근이 가자미근보다 허혈에 쉽게 손상받고, 회복도 느리다고 하였다.

본 실험의 허혈군에서 NF- $\kappa$ B 면역반응은 주령이 증가할수록 증가하였고, 가자미근에서 앞정강근보다 높게 관찰되었다 (Fig. 2). AP-1 면역반응 역시 허혈 후 1시간과 3시간에 가장 높게 관찰되었고, 주령이 증가할수록 증가되었으며, 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었다 (Fig. 3).

백색근육이 허혈손상에 더 민감하다는 여러 실험 결과와 심장을 허혈시켰을 때 AP-1 활성이 세포자멸사와 비례한다는 여러 연구자의 의견을 고려하면, AP-1 면역반응이 높게 관찰된 앞정강근이 가자미근보다 허혈손상에 더 민감하다고 생각할 수 있었다. 또한, 세포의 보호작용과 깊은 연관이 있는 NF- $\kappa$ B는 가자미근에서 더 높게 나타나 앞정강근에 비해 허혈에 대한 내성이 높을 것으로 생각되었다.

뼈대근육은 노화될수록 세포내 효소 활성이 낮아지고, 항산화성 유지기전도 비효율적이어서 자극에 쉽게 손상을 받게 된다고 한다 (Bak 등 1998). 또한 노화는 근육을 구성하는 섬유 비율을 변화시키는데, Punkt 등 (1998)은 흰쥐의 긴발가락뿔근과 가자미근에서 주령이 증가할수록 백색근육섬유의 수가 증가하는 것을 관찰하였으며, Danieli-Betto 등 (1995)은 이러한 변화가 근육의 수축력과 기능에 영향을 준다고 하였다.

본 실험에서 허혈후 재관류시 관찰되는 PKC $\theta$ 와 NF- $\kappa$ B, AP-1 면역반응의 정도와 변동폭은 주령이 증가할수록 증가하여 노화로 인해 허혈손상에 민감한 백색근육섬유의 수가 증가하고, 자극에 민감해져

나타나는 것이라고 생각되었다. 65주군에서 AP-1 면역반응의 정도와 변동폭이 증가된 것으로 보아 다른 주령군에 비해 허혈에 대해 더 민감하게 반응할 것으로 생각할 수 있었다. Honma 등 (2002)은 나이가 들어 증가되는 효소활성이 직접 세포보호효과를 나타내지 못한다고 하였고, Seo 등 (2003)은 허혈시 65주군의 앞정강근에서 세포자멸사가 증가한다고 하였는데 이로 보아 65주군에서 증가된 NF- $\kappa$ B 면역반응은 세포를 보호하는데 직접적인 영향을 주지는 못했을 것이라고 생각되었다. 또한 이들의 변동폭은 가자미근보다 앞정강근에서 크게 관찰되었는데, 이로 보아 변동폭이 클수록 허혈손상에 민감할 것이라고 생각하였다.

허혈군에서 관찰된 PKC $\theta$ 와 NF- $\kappa$ B 그리고 AP-1 면역반응의 변화양상은 근육의 종류와 주령에 따라서 차이가 있었다. 실험군에서 재관류 시간에 따라 관찰된 PKC $\theta$ 와 NF- $\kappa$ B 그리고 AP-1 면역반응 변동의 차이는 근육섬유의 종류에 따라 세포가 지니고 있는 혈관의 분포와 에너지를 얻는 기전이 다르기 때문이라고 생각되었으며, 주령에 따라 자극에 대한 민감도와 방어효율이 다르기 때문이라고 생각하였다.

산화자극으로 세포에서는 세포를 보호할 수 있는 항산화효소 (Ahn 등 1999)와 heat shock protein (Honma 등 2002) 같은 단백질이 발현되는데, 발현되는 단백질의 양과 활성은 근육섬유의 종류와 주령에 따라 차이가 있으므로, 이러한 세포보호단백질에 대한 연구가 앞으로 보충된다면 실험군 사이의 차이를 설명할 수 있을 것이라고 생각된다.

이상의 결과로, 허혈 및 재관류에 따른 흰쥐의 뼈대근육에서 관찰되는 PKC $\theta$  면역반응의 증가는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 면역반응을 증가시키는 것으로 생각되었으며, 주령이 증가할수록 허혈자극에 대한 손상이 증가하고, 앞정강근이 가자미근보다 허혈자극에 민감하게 반응하는 것으로 결론지을 수 있었다.

## 참고 문헌

Ahn DC, Paik DJ, Yang HH : Effects of ischemic preconditioning, KATP channel on the SOD activation and apopto-

- sis in ischemic reperfused skeletal muscle of rat. Korean J Vet Res 39: 878-895, 1999. (in Korean)
- Altman A, Villalba M : Protein kinase C-theta (PKC theta): it's all about location, location, location. Immunol Rev 192: 53-63, 2003.
- Avraham A, Jung S, Samuels Y, Seger R, Ben-Neriah Y : Costimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. Eur J Immunol 28: 2320-2330, 1998.
- Bak MI, Wei JY, Ingwall JS : Interaction of hypoxia and aging in the heart; analysis of high energy phosphate content. J Mol Cell Cardiol 30: 661-672, 1998.
- Baxter GF, Goma FM, Yellon DM : Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium. Br J Pharmacol 115: 222-224, 1995.
- Blaisdell FW : The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 10: 620-630, 2002.
- Carvalho AJ, Hollett P, McKee NH : Recovery of synergistic skeletal muscle function following ischemia. J Surg Res 59: 527-533, 1995.
- Danieli-Betto D, Betto R, Megighian A, Midrio M, Salviati G, Larsson L : Effects of age on sarcoplasmic reticulum properties and histochemical composition of fast- and slow-twitch rat muscles. Acta Physiol Scand 154: 59-64, 1995.
- Donnelly R, Reed MJ, Azhar S, Reaven GM : Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. Endocrinology 135: 2369-2374, 1994.
- Gurke L, Marx A, Sutter PM, Stierli P, Harder F, Heberer M : Function of fast- and slow-twitch rat skeletal muscle following ischemia and reperfusion at different intramuscular temperatures. Eur Surg Res 32: 135-141, 2000.
- Hilgenberg L, Miles K : Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. J Cell Sci 108: 51-61, 1995.
- Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC : Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. Mech Ageing Dev 60: 199-213, 1991.
- Honma Y, Tani M, Takayama M, Yamamura K, Hasegawa H : Aging abolishes the cardioprotective effect of combination heat shock and hypoxic preconditioning in reperfused rat hearts. Basic Res Cardiol 97: 489-495, 2002.
- Kim SJ, Chun JS : Protein kinase C alpha and zeta regulate nitric oxide-induced NF-kappa B activation that mediates cyclooxygenase-2 expression and apoptosis but not dedifferentiation in articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun 303: 206-211, 2003.
- Lin X, O'Mahony A, Mu Y, Geleziunas R, Greene WC : Protein kinase C-theta participates in NF-kappa B activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of I kappa B kinase beta. Mol Cell Biol 20: 2933-2940, 2000.
- 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.
- Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K : Activation of NF-kappa B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. J Neurosci Res 49: 681-697, 1997.
- Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK : Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kappa B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. FEBS Lett 443: 331-336, 1999.
- Meller N, Altman A, Isakov N : New perspectives on PKC theta, a member of the novel subfamily of protein kinase C. Stem Cells 16: 178-192, 1998.
- Moraczewski J, Nowotniak A, Wróbel E, Castagna M, Gautron J, Martelly I : Differential changes in protein kinase C associated with regeneration of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. Int J Biochem Cell Biol 34: 938-949, 2002.
- Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG Jr, Pohlman TH, Verrier ED : An essential role for NF-kappa B in the cardioadaptive response to ischemia. Ann Thorac Surg 68: 377-382, 1999.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C : NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci 20: 252-258, 1997.
- Ogata N, Yamamoto H, Kugiyama K, Yasue H, Miyamoto E : Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells. Cardiovasc Res 45: 513-521, 2000.

- Punkt K, Mehlhorn H, Hilbig H : Region- and age-dependent variations of muscle fibre properties. *Acta Histochem* 100: 37-58, 1998.
- Seo YK, Shin CS, Kim JH, You YJ, Paik DJ : Age-related alterations fo Bcl-2 and Bax immunoreactivities in the ischemic-reperfused tibialis anterior and soleus muscles of the rats. *Korean J Phys Anthropol* 16: 97-107, 2003. (in Korean)
- Stabel S, Parker PJ : Protein kinase C. *Pharmacol Ther* 51: 71-95, 1991.
- Sternbergh WC 3rd, Adelman B : Skeletal muscle fiber type does not predict sensitivity to posts ischemic damage. *J Surg Res* 53: 535-541, 1992.
- Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC : NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259: 1912-1915, 1993.
- Woitaskie MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 102: 2052-2063, 1998.

K C I

**Abstract**

**Alterations of PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, and AP-1 in Ischemic-reperfused Tibialis Anterior and Soleus Muscles of Rats**

Youn-Kyoung Seo, Chang-Zhu Jin<sup>1</sup>, Su-Kyoung Jun,  
Sang-Bum Kim, Yang-Ha Yoon, Ju-Jin Park<sup>2</sup>, Doo-Jin Paik

*Department Anatomy and Cell Biology, <sup>2</sup>Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University*

*<sup>1</sup>Department Anatomy · Medical College of Yanbian University*

Ischemic-reperfusion injury of skeletal muscles takes place in the phase of reperfusion and induces cellular damages through activating various transcription factors and genes, which initiate signal transduction. The purpose of this study was to observe changes of expression of NF- $\kappa$ B and AP-1, which are known as a redox sensitive transcription factors in ischemic-reperfused rat skeletal muscles, and PKC $\theta$ , which activate NF- $\kappa$ B and AP-1.

Sprague-Dawley male rats of nine, thirty, and sixty-five weeks old were divided into control and ischemia groups. Ischemia was performed by occlusion of left common iliac artery for 4 hours using rodent vascular clamps. The animals were sacrificed at hours 0, 1, 3 and 6 after onset of reperfusion and tibialis anterior and soleus muscles were removed. The distributions of PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, and AP-1 immunoreactivity (IMR) were examined using immunohistochemical methods.

The results as follows;

In control groups, PKC $\theta$  IMR was decreased with age and was higher in tibialis anterior than that in soleus muscles. In ischemia groups, PKC $\theta$  IMR was increased with age and was higher in soleus than that in tibialis anterior muscles. In control groups, NF- $\kappa$ B IMR was decreased with age. In ischemia groups, NF- $\kappa$ B IMR was increased with age and was higher in soleus than that in tibialis anterior muscles. In control groups, AP-1 IMR was decreased with age. In ischemia groups, AP-1 IMR was increased with age and was higher in tibialis anterior than that in soleus muscles. Increase or decrease of PKC $\theta$  IMR was associated with the increase or decrease of NF- $\kappa$ B and AP-1 IMR in ischemic-reperfused rat skeletal muscles, respectively.

These results suggested that the increased expression of PKC $\theta$  may induce the upregulations of NF- $\kappa$ B and AP-1 in ischemic-reperfusion injury of rat skeletal muscle. It is also suggested that the ischemic injury may be increased with age, and tibialis anterior muscle is more susceptible to ischemic-reperfusion injury than soleus muscle.

**Key words** : Ischemia, Rat, Tibialis anterior, Soleus, PKC $\theta$ , NF- $\kappa$ B, AP-1