

원거리 허혈양상화가 흰쥐의 심장근육에서 NOS와 Akt 발현에 미치는 영향

조지연, 서윤경, 전수경, 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 원거리 허혈양상화는 생명유지와 밀접한 관련이 없는 장기에서 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 과정으로, 심장의 기능 장애에 의한 허혈손상을 감소시킨다고 알려져 있고, 원거리 허혈양상화는 iNOS를 감소시키고 eNOS를 증가시키며, Akt를 활성화시켜 심장근육을 보호한다고 알려져 있다. 본 실험은 원거리 허혈양상화가 흰쥐의 심장근육에서 관찰되는 iNOS와 eNOS, Akt의 발현 및 Akt의 활성화 (phospho-Akt, p-Akt)에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

35주령의 SD 수컷 흰쥐를 사용하여 대조군과 원거리 허혈양상화군으로 나누었고, 원거리 허혈양상화의 횟수에 따라 3회와 6회, 10회군으로 나누었다. 원거리 허혈양상화는 온영덩동맥을 5분 허혈과 5분 재관류를 반복하여 실시하였고, 재관류 0시간과 3시간, 6시간, 24시간, 72시간에 심장을 적출하여 iNOS와 eNOS, Akt, p-Akt의 면역조직화학염색과 Western blot 분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

iNOS는 원거리 허혈양상화에 의하여 증가되었고, 10회군에서는 3회와 6회군보다 증가되었다. eNOS는 원거리 허혈양상화에 의하여 증가 또는 감소되었으나, 횟수에 따른 eNOS 발현의 차이는 없었다. Akt는 원거리 허혈양상화 후 재관류 24시간과 72시간에 감소되었고, 횟수에 따른 Akt 발현의 차이는 없었다. p-Akt는 원거리 허혈양상화에 의하여 증가되었으나, 횟수에 따른 p-Akt 발현의 차이는 없었다.

이상의 실험결과로, 흰쥐 뒷다리에서 실시한 원거리 허혈양상화로 증가된 세포보호단백질 eNOS와 p-Akt가 심장근육세포의 보호현상에 관련이 있을 것으로 생각되며, 10회 이상의 원거리 허혈양상화는 iNOS를 증가시켜 심장근육의 허혈손상을 일으키는 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 원거리 허혈양상화, 흰쥐, 심장근육, iNOS, eNOS, Akt, p-Akt

서 론

원거리 허혈양상화(remote ischemic preconditioning, remote preconditioning)는 허혈양상화를 직접 실시하는 장기와는 떨어져 있는 다른 기관에서 허혈양상화 보호효과가 나타나는 일련의 과정을 말하며, 원거리 허혈양상화는 생명 유지와 직접적인 관련이 없는 팔과 다리, 작은창자 등과 같은 기관에서 허혈을 일으키기 때문에, 심장이나 뇌 같은 장기에서 허혈손상을 감소시킬 수 있는 이점이 있다(Günay-

din 등 2000). Kharbanda 등(2002)은 돼지의 다리에서 실시한 원거리 허혈양상화가 심장의 경색크기를 50% 정도 감소시킨다고 하였고, Shimizu 등(2007)은 돼지의 다리에서 실시한 원거리 허혈양상화가 심장동맥의 저항성을 감소시키고, 재관류시 혈류를 증가시킨다고 하였다. Bolli 등(1998)은 짧은 허혈과 재관류는 산화질소(nitric oxide)와 소량의 활성화산소기, 아데노신 등과 같은 물질을 유리시키며, 전사인자들을 활성화시켜 세포내 신호전달을 활성화시킨다고 하였다.

산화질소는 신체의 여러 생리적 반응을 조절하는 물질로, 산화질소의 합성에는 산화질소합성효소(nit-

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

ric oxide synthase, NOS)가 필요하며, neuronal NOS (nNOS, NOS 1)와 endothelial NOS (eNOS, NOS 3)는 세포에서 지속적으로 발현되는 반면에 inducible NOS (iNOS, NOS 2)는 염증반응이나 스트레스에 노출되었을 때 발현된다고 알려져 있다 (Alderton 등 2001). NOS 이형들에 의해 합성된 산화질소는 허혈 손상을 유발하거나 감소시킨다고 알려져 있으며, de Belder 등(1997)은 iNOS의 증가는 심장 허혈 후 기능부전을 유발시킨다고 하였고, Scherrer-Crosbie 등 (2001)은 eNOS의 증가가 급성심근경색 후 심장근육의 세포자멸사와 기능손실을 감소시킨다고 하였다. 최근에는 원거리 허혈양상화의 보호효과에도 NOS에 의해 합성된 산화질소가 관련되어 있다고 보고되고 있다 (Li 등 2004, Janssens 등 2004).

한편, Toth 등(2003)은 허혈양상화 또는 허혈 및 재관류시 발생하는 자유산소기가 serine/threonine kinase의 하나인 Akt/protein kinase B의 인산화를 증가시킨다고 하였다. 이들은 성장자극이나 산화자극이 있는 경우, serine 473 (Ser 473) 부위가 인산화되어 세포를 보호하는 인자들을 활성화시키고, 세포자멸사를 감소시킨다고 하였으며, Kis 등(2003)은 허혈양상화가 심장에서 Akt 인산화를 증가시키며, 심장근육의 허혈손상을 감소시킨다고 하였다.

원거리 허혈양상화를 실시하여 허혈손상이 감소되는 동물실험이나 환자를 대상으로 임상실험이 진행되고 있으나, 아직까지 원거리 허혈양상화가 어떻게 허혈손상을 감소시키는지 정확히 알려져 있지 않다. 이에 본 연구자들은 흰쥐의 뒷다리에서 실시한 원거리 허혈양상화가 심장근육의 iNOS와 eNOS, Akt의 발현 및 Akt의 인산화(phospho-Akt, p-Akt)에 어떤 영향을 주는지 알아보고, 원거리 허혈양상화 횟수에 따른 효과를 확인하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

35주령의 SD 수컷 흰쥐 (Daehan Biolink, Korea)를

사용하여 대조군과 짧은 허혈과 재관류 반복 횟수에 따라 원거리 허혈양상화 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 재관류 0시간과 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 실험처치기간 동안 사망한 실험동물을 제외하고 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험동물 처치

모든 실험처치는 우레탄(Urethane, 1.15 g/kg)을 배안에 주사하여 실험동물을 마취시킨 후 실시하였다. 원거리 허혈양상화는 흰쥐용 혈관집게를 이용하여 왼온엉덩동맥(left common iliac artery)을 5분 허혈과 5분 재관류를 3회와 6회, 10회 실시하였고, 정상대조군은 배안을 연 후 아무런 처치를 하지 않았다. 원거리 허혈양상화가 끝난 뒤에 혈관집게를 제거하였고, 재관류 0시간과 3시간, 6시간, 24시간, 72시간에 목척추뼈탈골로 실험동물을 희생시켜 심장을 적출하였다. 적출한 심장의 왼심실근육 꼭대기를 이용하여 Western blot analysis와 면역조직화학염색을 시행하였다.

3. 면역조직화학염색

Xylene을 이용하여 파라핀을 제거한 조직절편을 함수시킨 다음 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척한 뒤, 3% 과산화수소가 들어 있는 메탄올 혼합용액과, 0.4% pepsin 용액 (Sigma Co., USA)을 각각 8분 동안 반응시켰다. iNOS 염색을 위해 rabbit blocking 용액으로 37°C에서 1시간 처리한 뒤, rabbit anti-iNOS antibody (1 : 15, SantaCruz Biotechnology, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. eNOS 염색을 위해 mouse blocking 용액으로 37°C에서 1시간 처리한 뒤, mouse anti-eNOS antibody (1 : 100, BD Biosciences, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Akt 염색을 위해 goat blocking 용액을 37°C에서 1시간 동안 처리한 뒤, goat anti-Akt antibody (1 : 50, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. phospho-Akt 염색을 위해 rabbit blocking 용액을 37°C에서 1시간 동안 처

리한 뒤, rabbit anti-phospho-Akt antibody (1 : 30, Ser 473, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체 처리 후 PBS로 세척한 후 biotin이 결합된 2차 항체 horse anti-mouse IgG antibody와 rabbit anti-goat IgG antibody, goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratory, USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory, USA)을 실온에서 30분 동안 각각 반응시킨 뒤 DAB (Vector Laboratory, USA) 혼합용액으로 5분 동안 반응시켜 발색시켰다. 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였고, 원심실 꼭대기 부분을 사진촬영하여 면역염색반응이 나타나지 않은 경우 음성반응 (-)으로, 발색반응의 정도와 분포에 따라, 미약한 양성반응(±), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++), 강한 양성반응(+++)으로 정하여 Table 1과 2, 3, 4에 정리하였다.

4. Western blot analysis

원심실 꼭대기 부분을 잘게 부순 뒤, 단백질을 분해 효소 억제제 (PMSF 1.0 mM, EDTA 1.0 mM, pepstatin A 1 µM, leupeptin 1 µM, aprotinin 0.1 µM)가 포함된 단백질 추출 용액 (iNtRON Biotechnology, Korea)을 조직 0.01 g 당 30 µL 첨가한 뒤 조직분쇄기 (homogenizer, Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 13,500 rpm에서 10초씩 2회 균질화시킨 뒤 원심분리하여 상층액을 얻었다.

40 µg의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond™-P membrane (Amersham Biosciences, England)에 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, 1차 항체 anti-rabbit iNOS antibody (1 : 1,000, Stressgen, USA), anti-mouse eNOS antibody (1 : 1,000, BD Biosciences, USA), anti-rabbit Akt antibody (1 : 1,000, Cell signaling, USA), anti-mouse p-Akt antibody (Ser 473, 1 : 1,000, Cell signaling, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체 anti-mouse IgG antibody와 anti-rabbit IgG antibody (Amersham Bio-

sciences, USA)를 각각 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 enhanced chemiluminescence 용액 (Amersham Biosciences, USA)을 1분 동안 처리하여 x-ray 필름에 1분 동안 노출시켰다. Quantity one® 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 관찰된 band의 농도 (density)를 측정하였다.

통계처리는 SigmaPlot 10.0 (SYSTAT Software Inc., USA)을 이용하여, student *t*-test로 분석하였고 *P* < 0.05인 값을 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. 원거리 허혈양상화가 심장근육에서 iNOS 발현에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

원거리 허혈양상화 후 iNOS는 대조군보다 증가되었으나, iNOS는 미약한 양성반응(±) 또는 경도의 양성반응(+)으로 관찰되었고 실험군 사이의 차이는 크지 않았다 (Table 1, Fig. 1).

2) Western blot analysis

재관류 0시간에 (Fig. 2A) 원거리 허혈양상화 직후에 따른 iNOS의 차이는 없었고, 3시간에 (Fig. 2B) 10회군의 iNOS는 3회와 6회군보다 증가하였다 (*P* < 0.05). 6시간에 10회군의 iNOS는 3회와 6회군보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었으며, 24

Table 1. Immunoreactivities of iNOS in the rat myocardium of the control and remote ischemic preconditioning groups

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

Abbreviations: cont: control, 3IP: 3 cycles of remote ischemic preconditioning, 6IP: 6 cycles of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 cycles of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity.

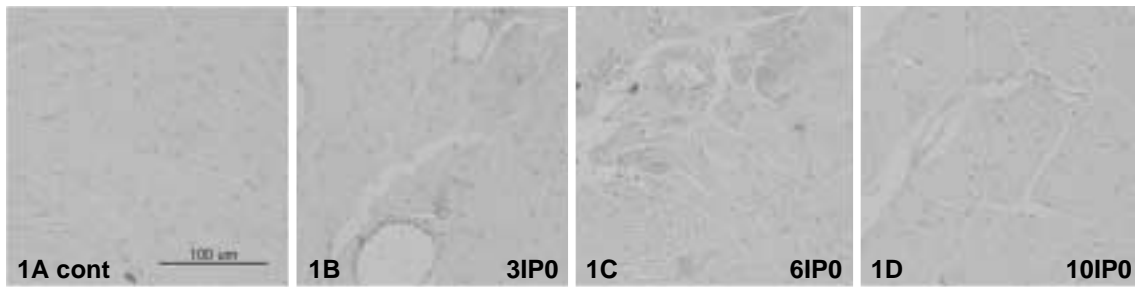


Fig. 1. Immunohistochemical staining of iNOS in rat myocardium after remote ischemic preconditioning. Intensity of the immunoreactivity (IR) is shown in Table 1. Remote ischemic preconditioning (IP) increased iNOS (B ~ D) compared to control group (A). cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP ($\times 400$).

시간에 3회군의 iNOS는 대조군과 6회군, 10회군보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 72시간에 (Fig. 2C), 10회군의 iNOS는 대조군과 3회와 6회군보다 증가하였다(10회군; $P < 0.05$, 3회군, 6회군 $P > 0.05$).

원거리 허혈양상화 3회군에서 (Fig. 3A), iNOS는 재관류 0시간과 3시간에 대조군보다 증가하여 6시간에 최고치가 되었다(3시간, 6시간; $P < 0.05$), 24시간 이후에는 대조군 수준으로 감소하였다. 6회군에서 (Fig. 3B), iNOS는 재관류 0시간에 대조군보다 감소하였다가 ($P < 0.05$), 3시간에 증가하여 최고치가 되었다 ($P < 0.05$). 6시간과 24시간의 iNOS는 대조군보다 감소되었고 ($P < 0.05$), 72시간에는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었다. 10회군에서 (Fig. 3C), iNOS는 재관류 0시간에 대조군보다 증가하기 시작하여 6시간에 최고치에 달하고 ($P < 0.05$), 24시간에는 대조군 수준으로 감소되었다.

2. 원거리 허혈양상화가 심장근육에서 eNOS발현에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

원거리 허혈양상화 후 eNOS는 대조군보다 증가되었다. 재관류 직후에는 3회군과 6회군에서, 6시간과 24시간에는 3회군에서, 72시간에는 10회군에서 높게 관찰되었다 (Table 2, Fig. 4).

Table 2. Immunoreactivities of eNOS in the rat myocardium of the control and remote ischemic preconditioning groups

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

Abbreviations: cont: control, 3IP: 3 cycles of remote ischemic preconditioning, 6IP: 6 cycles of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 cycles of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity.

2) Western blot analysis

재관류 0시간에 (Fig. 5A) 원거리 허혈양상화 3회와 6회군의 eNOS는 대조군보다 감소하였고 ($P < 0.05$), 6회군의 eNOS가 3회와 10회군보다 낮게 관찰되었다 ($P < 0.05$). 3시간에 (Fig. 5B) 원거리 허혈양상화 후 eNOS는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 6시간에 원거리 허혈양상화군의 eNOS는 대조군보다 감소하였으나 통계적 유의성은 없었고, 24시간에 원거리 허혈양상화군의 eNOS는 대조군보다 감소하였고 (6회군; $P < 0.05$, 3회군, 10회군 $P > 0.05$), 6회군의 eNOS가 3회와 10회군보다 낮게 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 재관류 72시간에 (Fig. 5C), 6회군의 eNOS가 대조군이나 3회, 10회군보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

원거리 허혈양상화 3회군에서 (Fig. 6A), eNOS는

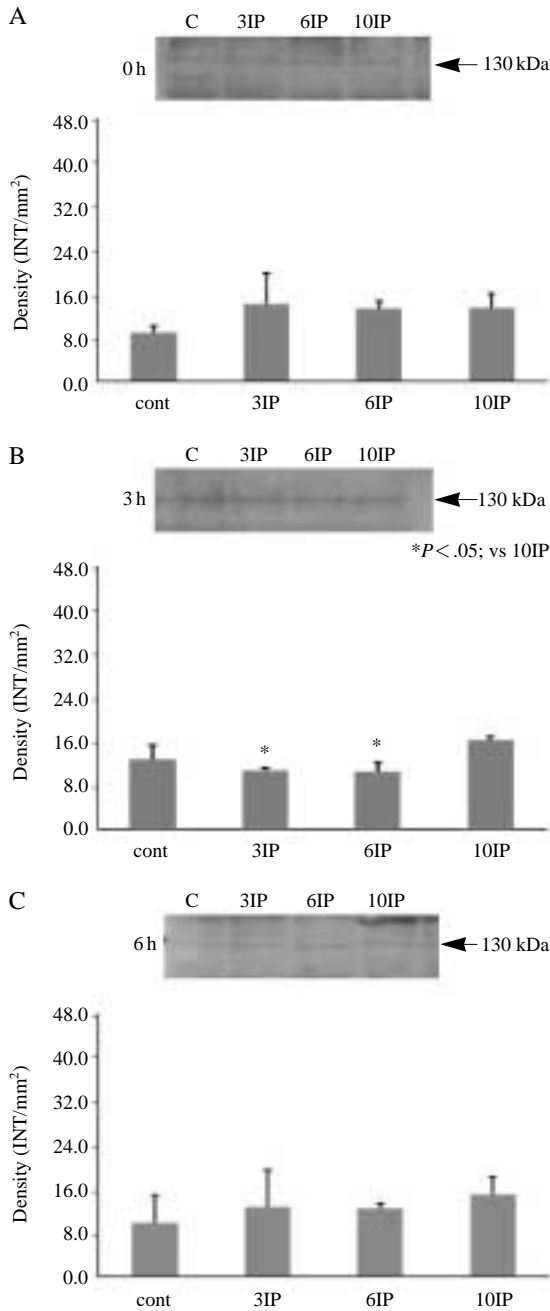


Fig. 2. Western blot analysis of iNOS in rat myocardium. A: 0 hr after remote ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. C & cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP.

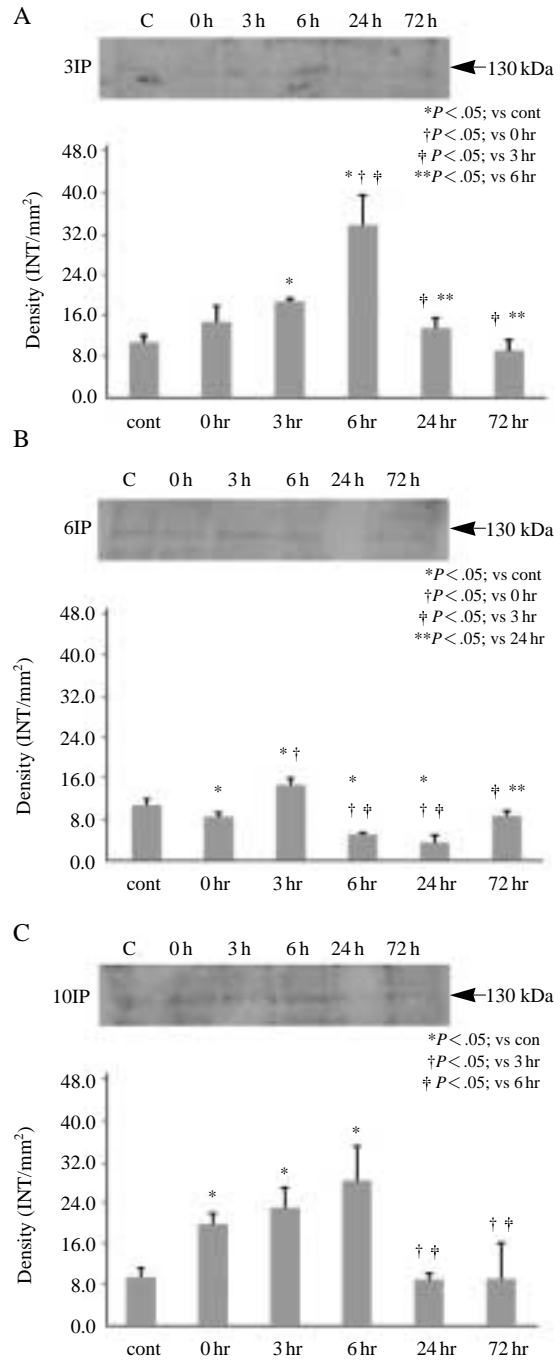


Fig. 3. Western blot analysis of iNOS in rat myocardium. A: 3 cycles of remote ischemic preconditioning (IP), B: 6IP, C: 10IP. Values are means \pm SD. C & cont: control.

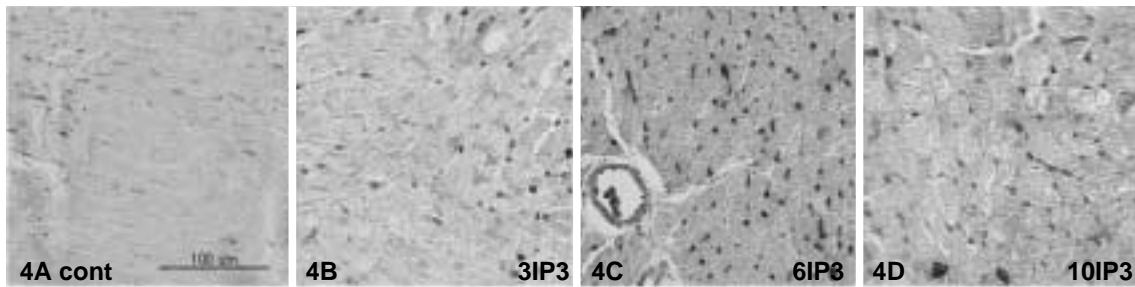


Fig. 4. Immunohistochemical staining of eNOS in rat myocardium, 3 hours after remote ischemic preconditioning. Intensity of the immunoreactivity (IR) is shown in Table 2. Remote ischemic preconditioning (IP) increased eNOS compared to control group (A). Immunolocalization of eNOS in the 10IP groups (D) was weaker than that in 3IP (B) and 6IP (C) groups. cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP ($\times 400$).

Table 3. Immunoreactivities of Akt in the rat myocardium of the control and remote ischemic preconditioning groups

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

Abbreviations: cont: control, 3IP: 3 cycles of remote ischemic preconditioning, 6IP: 6 cycles of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 cycles of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity.

재관류 0시간부터 72시간까지 대조군보다 증가하였다 ($P < 0.05$). 6회군에서 (Fig. 6B), eNOS는 재관류 0시간과 3시간에 대조군보다 감소하였고 ($P < 0.05$), 6시간 이후에는 대조군 수준으로 관찰되었다. 10회군 (Fig. 6C)에서, eNOS는 재관류 0시간 이후에 대조군보다 증가하기 시작하여 6시간에 최고치에 달하고 (6시간; $P < 0.05$, 0시간, 3시간; $P > 0.05$), 24시간과 72시간에는 감소하였으나 대조군보다는 높은 수준으로 유지 되었다 ($P = 0.06$; 10회군 vs 대조군).

3. 원거리 허혈양상화가 심장근육에서

Akt발현에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

원거리 허혈양상화 후 Akt는 대조군보다 감소되었다가 증가되었다. 재관류 3시간과 24시간에는 원거리 허혈양상화 3회와 6회군의 Akt가 10회군보다

Table 4. Immunoreactivities of p-Akt in the rat myocardium of the control and remote ischemic preconditioning groups

	Time of reperfusion (h)				
	0	3	6	24	72
cont	+				
3IP	+	+++	+	++	++
6IP	++	+++	++	++	+, ++
10IP	+, ++	++, +++	++	++	+

Abbreviations: cont: control, 3IP: 3 cycles of remote ischemic preconditioning, 6IP: 6 cycles of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 cycles of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity.

증가되었다 (Table 3, Fig. 7).

2) Western blot analysis

재관류 0시간에 (Fig. 8A) 원거리 허혈양상화 10회군의 Akt는 대조군보다 감소하였고 ($P < 0.05$), 6회군의 Akt가 3회와 10회군보다 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다. 3시간에 (Fig. 8B) 원거리 허혈양상화군의 Akt는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 6시간에 원거리 허혈양상화군의 Akt는 6회군에서 감소하고, 10회군에서 대조군보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었고, 24시간에 원거리 허혈양상화군의 Akt는 대조군보다 감소하였고 (6회군; $P < 0.05$, 3회군, 10회군 $P > 0.05$), 6회군의 Akt는 10회군보다 낮게 관찰되었다 ($P < 0.05$). 72시간에 (Fig. 8C), 원거리 허혈양상화 3회와 6회군의 Akt는 대조군보다 감소하였고 (3회군; $P < 0.05$, 6회군 $P > 0.05$),

— 원거리 허혈양상화 후 심장근육의 NOS와 Akt —

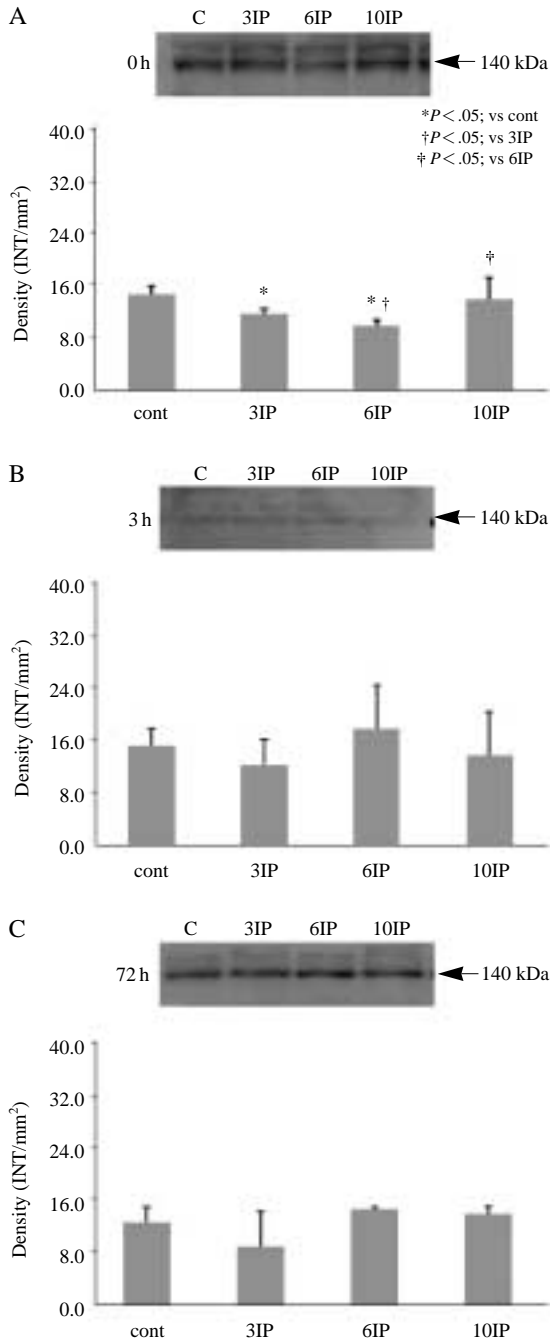


Fig. 5. Western blot analysis of eNOS in rat myocardium. A: 0 hr after remote ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. C & cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP.

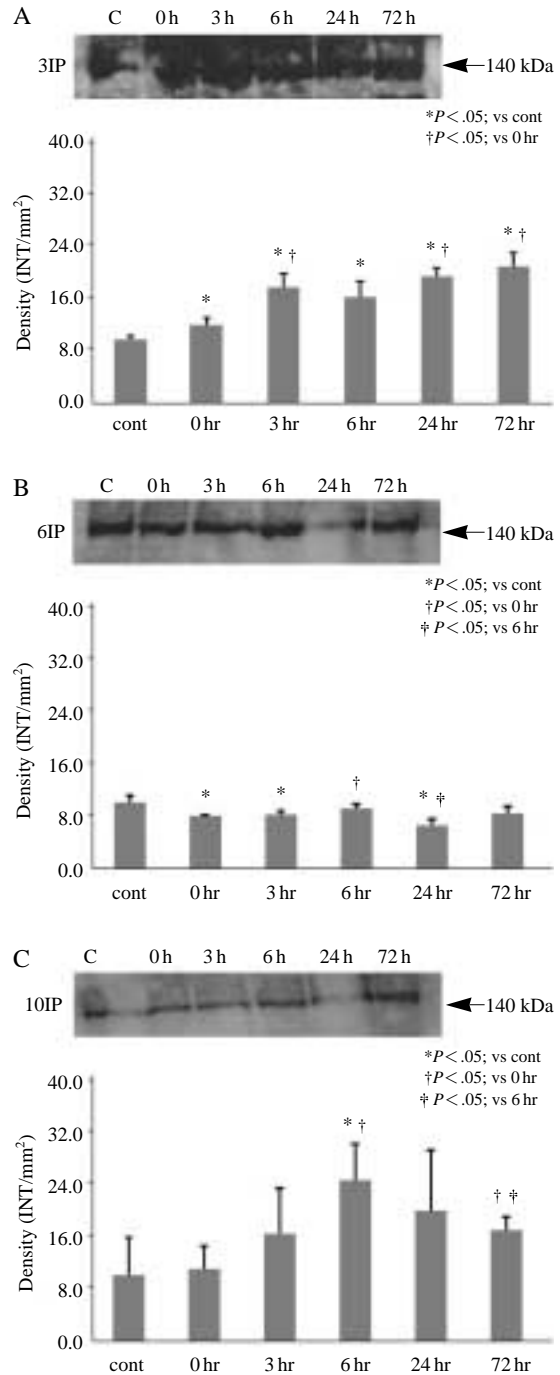


Fig. 6. Western blot analysis of eNOS in rat myocardium. A: 3 cycles of remote ischemic preconditioning (IP), B: 6IP, C: 10IP. Values are means \pm SD. C & cont: control.

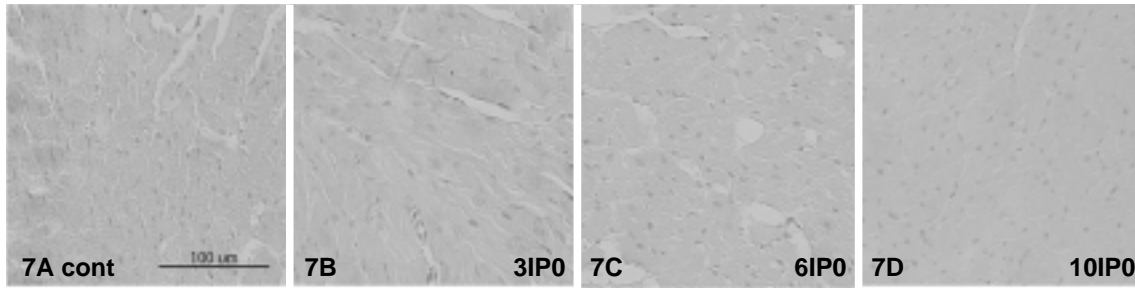


Fig. 7. Immunohistochemical staining of Akt in rat myocardium after remote ischemic preconditioning. Intensity of the immunoreactivity (IR) is shown in Table 3. Remote ischemic preconditioning (IP) increased Akt compared to control group (1A). Immunolocalization of Akt in the 10IP groups (D) was weaker than that in 3IP (B) and 6IP (C) groups. cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP ($\times 400$).

10회군은 대조군 수준으로 관찰되었다. 10회군의 Akt는 3회군보다 증가되었다($P < 0.05$).

원거리 허혈양상화 3회군에서 (Fig. 9A) 재관류 시간에 따른 Akt는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 6회군에서 (Fig. 9B), Akt는 재관류 3시간 이후에 대조군보다 감소되었다($P < 0.05$; 24시간 vs 대조군). 10회군 (Fig. 9C)에서 Akt는 재관류 0시간 이후에 대조군보다 감소하였다($P < 0.05$).

4. 원거리 허혈양상화가 심장근육에서

Akt 인산화 (p-Akt) 발현에 미치는 영향

1) 면역조직화학염색

원거리 허혈양상화 후 p-Akt는 대조군보다 증가되거나 비슷하게 관찰되었다 (Table 4, Fig. 10).

2) Western blot analysis

재관류 0시간에 (Fig. 11A) 원거리 허혈양상화 3회군의 p-Akt는 대조군보다 감소하였고 ($P < 0.05$). 6회와 10회군의 p-Akt는 대조군과 3회군보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 3시간 (Fig. 11B)과 6시간에 p-Akt는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 24시간에 원거리 허혈양상화군의 p-Akt는 대조군보다 증가하였고, 72시간에 (Fig. 11C), 원거리 허혈양상화군의 p-Akt는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 허혈양상화군에 따른 차이는 없었다.

원거리 허혈양상화 3회군에서 (Fig. 12A), p-Akt는

재관류 0시간에 증가되었다. 3시간에는 대조군보다 감소 ($P < 0.05$), 6시간과 24시간에는 3시간보다 증가되었다 ($P < 0.05$). 72시간의 p-Akt는 24시간보다 감소되었다 ($P < 0.05$). 6회군에서 (Fig. 12B), p-Akt는 재관류 0시간과 3시간에 대조군보다 증가되고, 6시간과 72시간 대조군 수준으로 관찰되나 통계적 유의성은 없었다. 10회군 (Fig. 12C)에서, p-Akt는 재관류 0시간부터 6시간까지 대조군보다 증가하고, 24시간 이후에는 대조군 수준으로 관찰되나 통계적 유의성은 없었다.

고찰

본 실험결과에서 첫째, 원거리 허혈양상화는 재관류 초기에 심장근육의 iNOS를 대조군보다 증가시켰고, 10회군의 iNOS가 3회와 6회군보다 더 증가되었다. 또한 iNOS는 재관류 3시간 또는 6시간까지 증가되었고, 24시간 이후에는 대조군 수준으로 감소되었다.

Scherrer-Crosbie 등 (2001)은 생쥐의 심장동맥을 묶으면, iNOS 발현과 심근경색의 크기가 증가된다고 하였고, Sam 등 (2001)은 iNOS가 결손된 생쥐의 심장을 허혈시키면 세포자멸사가 줄어들고 심장의 수축력이 증가한다고 하였다. Liang 등 (2004)도 흰쥐의 심장을 허혈시키면 iNOS와 심장근육의 세포

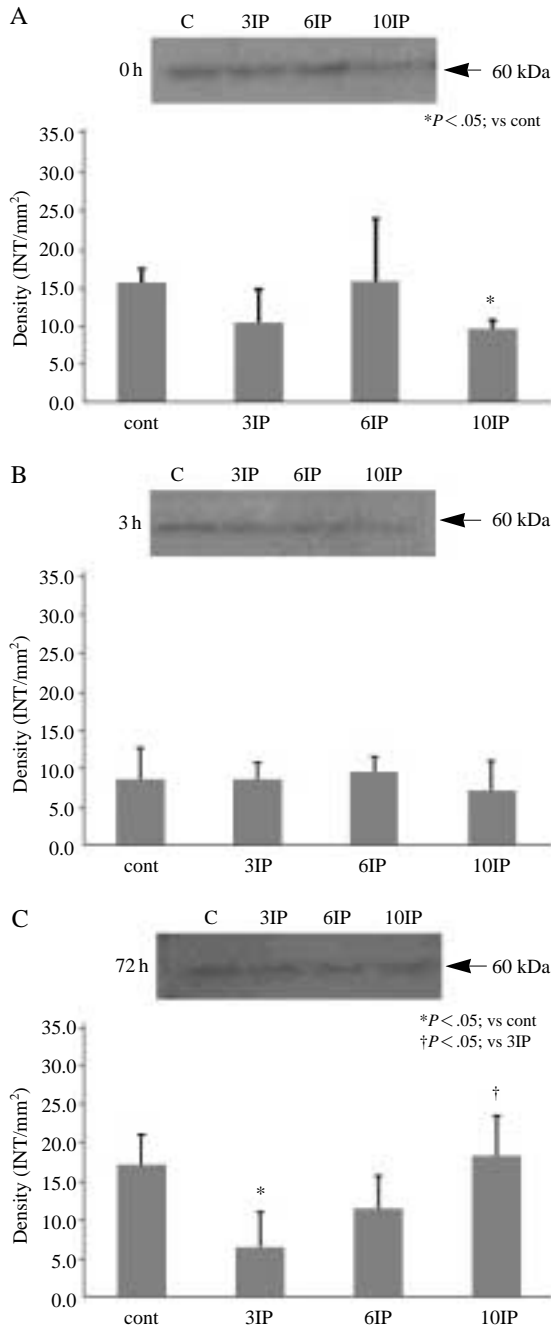


Fig. 8. Western blot analysis of Akt in rat myocardium. A: 0 hr after remote ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. C & cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP.

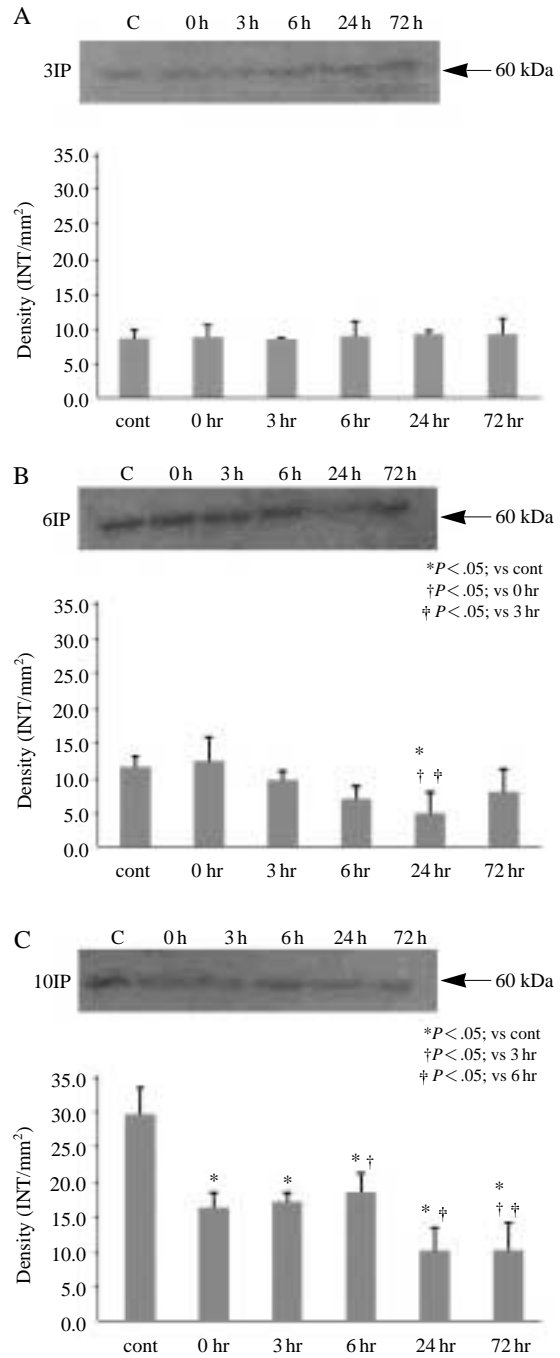


Fig. 9. Western blot analysis of Akt in rat myocardium. A: 3 cycles of remote ischemic preconditioning (IP), B: 6IP, C: 10IP. Values are means \pm SD. C & cont: control.

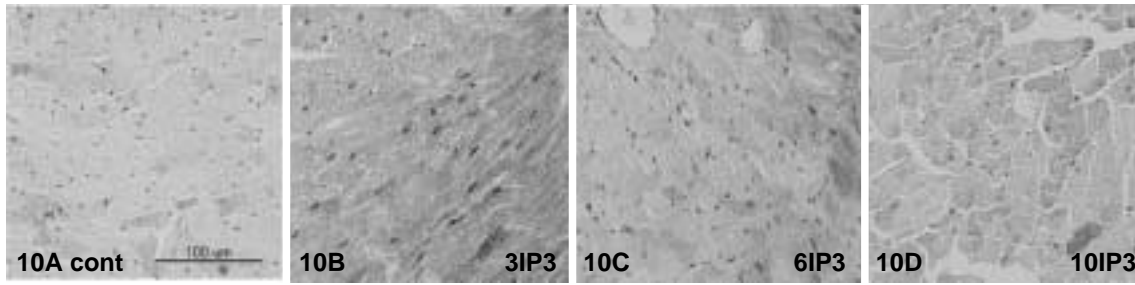


Fig. 10. Immunohistochemical staining of p-Akt in rat myocardium, 3 hours after remote ischemic preconditioning. Intensity of the immunoreactivity (IR) is shown in Table 4. Remote ischemic preconditioning (IP) increased p-Akt compared to control group (1A). cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP ($\times 400$).

손상이 증가되나, iNOS를 억제시키면 산화질소의 농도와 세포자멸사가 감소된다고 하였다. 그러나, Guo 등(1999)은 iNOS와 심장근육의 경색 크기는 관련이 없다고 하였고, Li 등(2004)은 허혈 24시간 전에 생쥐의 앞다리에서 실시한 원거리 허혈양상화가 허혈된 심장에서 NF-kB와 iNOS mRNA 발현을 증가시키고 경색을 감소시키나, 이러한 보호효과가 어떤 기전에 의해서 일어나는지 정확하지 않다고 하였다.

아직까지 iNOS에 의해 생성된 산화질소의 역할은 논란의 여지가 있으나, Mungrue 등(2002)은 다량으로 생성된 산화질소는 그 자체로도 세포손상을 일으킬 수 있으며, peroxynitrite를 빠르게 형성해 허혈손상을 일으킬 수 있다고 하였고, Scherrer-Crosbie 등(2001)과 Sam 등(2001), Liang 등(2004)의 의견을 고려하면, 본 실험에서 흰쥐 뒷다리에서 실시한 원거리 허혈양상화는 심장에서 iNOS를 증가시키며, 10회의 원거리 허혈양상화는 iNOS를 3회와 6회군보다 증가시켜 허혈손상을 가중시킬 것으로 생각된다.

둘째, 원거리 허혈양상화는 심장근육에서 eNOS를 대조군보다 증가 또는 감소시켰으나, 횡수에 따른 eNOS의 차이는 크지 않았다. 3회군의 eNOS는 재관류 0시간부터 72시간까지 대조군보다 증가되었고, 6회군의 eNOS는 재관류 초기에 감소되었으며, 대조군과 비슷한 수준으로 유지되었다. 10회군의 eNOS는 재관류 6시간에 대조군보다 증가한 뒤 감

소하였다.

Liang 등(2004)은 흰쥐의 심장동맥을 30분 허혈했을 때, 재관류 초기에 증가된 eNOS가 산화질소 생성을 증가시켜 세포자멸사를 감소시킨다고 하였고, Janssens 등(2004)은 eNOS가 결손된 생쥐의 심장에 경색을 일으키면 대조군보다 심실기능이 감소되고, 심장근육세포의 비대와 기능부전이 일어난다고 하였고, 이들은 eNOS가 허혈손상에서 심장근육세포를 보호해 준다고 하였다. Valen 등(2000)도 불안정 협심증(unstable angina pectoris)을 앓고 있던 환자가 심장동맥우회술을 받으면, 협심증 과거력이 없는 대조군의 환자보다 우심방귀에서 세포자멸사 촉진인자 AP-1이 감소하고, 증가된 eNOS, HSP72는 허혈손상을 감소시킨다고 하였다. 이들의 의견을 고려하면, 원거리 허혈양상화 후 증가된 eNOS는 심장근육세포를 허혈손상에서 보호할 것으로 생각되며, 허혈 후 일어나는 심실의 기능부전과 심실비대를 감소시키는 데도 관여할 것이라 생각되었다. 그러나 원거리 허혈양상화 10회군에서 증가된 eNOS는 iNOS의 과도한 증가로 인해 허혈손상에서 심장근육세포를 효과적으로 보호하지 못했을 것으로 생각되며, 재관류 72시간에 관찰된 심장 위축에도 영향을 주었을 것이라 생각된다.

마지막으로, 본 실험에서 원거리 허혈양상화 후, 재관류 초기에 관찰된 Akt는 3회와 6회군에서 10회군보다 크게 관찰되었으나 큰 차이는 없었으며, p-Akt의 차이도 크지 않았다. 3회군의 Akt는 재관류

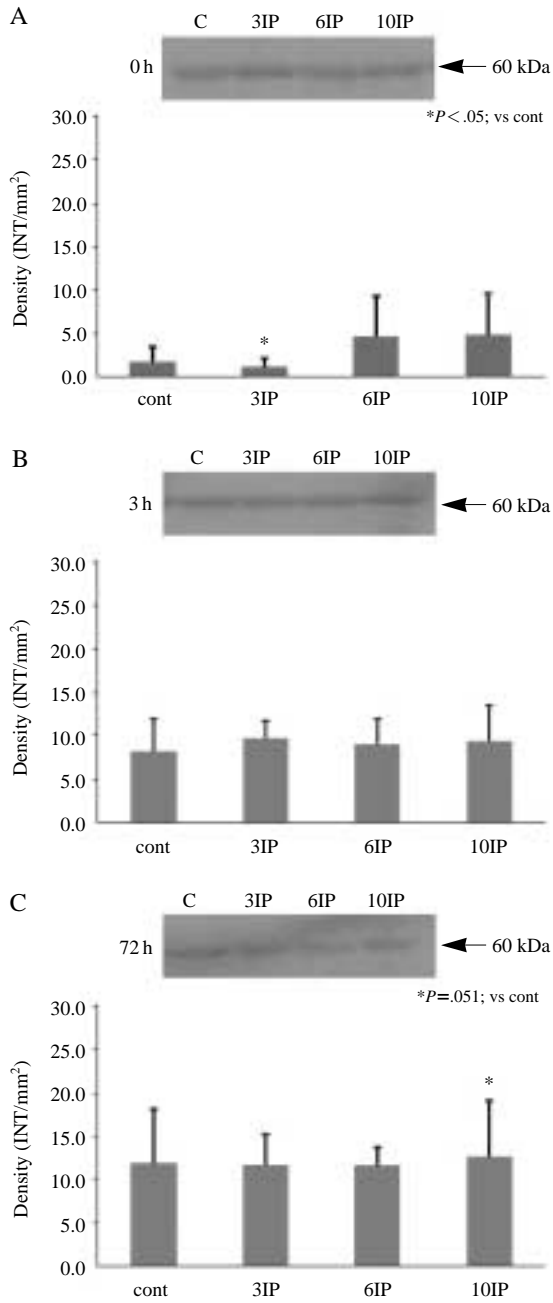


Fig. 11. Western blot analysis of p-Akt in rat myocardium. A: 0 hr after remote ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 72 hrs after IP. Values are means \pm SD. C & cont: control, 3IP: 3 cycles of IP, 6IP: 6 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP.

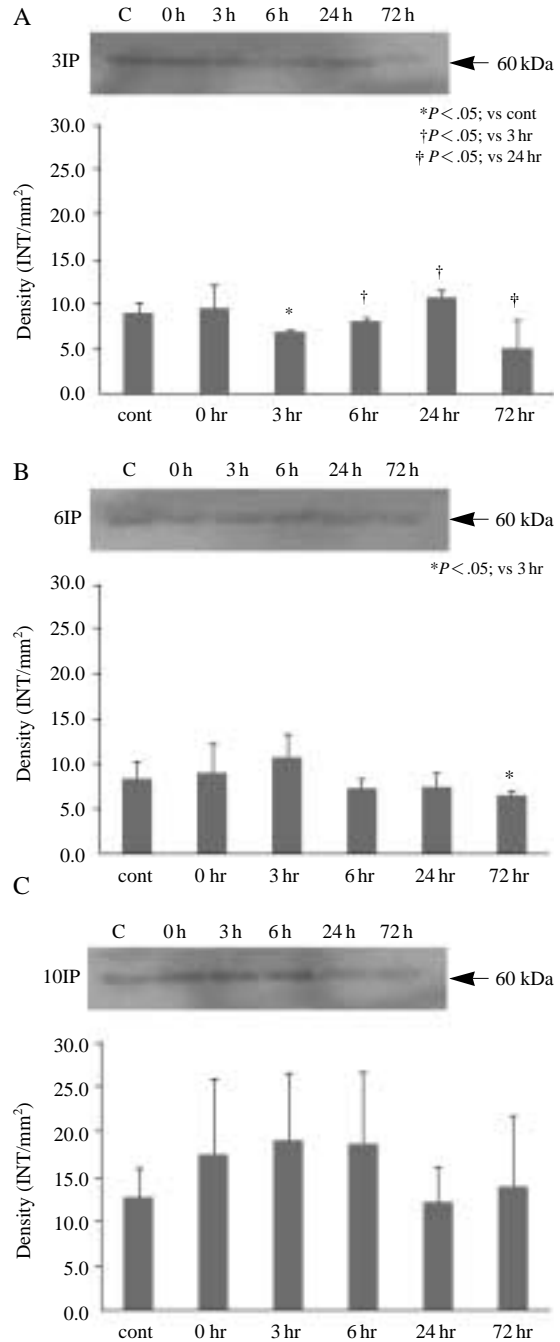


Fig. 12. Western blot analysis of p-Akt in rat myocardium. A: 3 cycles of remote ischemic preconditioning (IP), B: 6IP, C: 10IP. Values are means \pm SD. C & cont: control.

동안 대조군과 비슷한 수준으로, p-Akt는 대조군보다 증가하였다. 6회군의 Akt와 p-Akt는 24시간 이후에 대조군보다 감소하였고, 10회군의 Akt는 재판류 직후에, p-Akt는 재판류 24시간 이후에 감소되었다.

허혈 및 재판류시 생성되는 산화질소는 Akt를 활성화시키며(Yamashita 등 2001), 활성화된 Akt는 세포자멸사 촉진인자인 Bad와 caspase-9를 억제하여 세포를 보호한다고 알려져 있다(Brazil과 Hemmings 2001). 또한 GSK3 β 의 활성을 억제하여 당합성을 증가시키고, eNOS를 활성화시켜 허혈에서 세포를 보호한다고 알려져 있다(Fujio 등 2000, Jonassen 등 2001).

Mocanu 등(2002)은 흰쥐의 심장을 허혈시키면 45%의 경색부위가 관찰되나, 허혈양상화를 실시하면 Akt 인산화가 증가되고, 경색크기는 18% 정도로 감소된다고 하였으며, 허혈양상화 보호효과에 Akt 인산화가 반드시 필요하다고 하였다. Noshita 등(2003)은 생쥐 대뇌의 허혈중심부에서 관찰된 Akt 인산화는 재판류 24시간까지 감소되나, 허혈손상이 적은 부분에서는 재판류 4시간에 Akt의 인산화가 증가되며, 허혈의 강도와 손상정도에 따라 Akt 인산화가 다르다고 하였다. 본 실험에서 원거리 허혈양상화 10회군에서 Akt와 p-Akt가 3회와 6회군보다 낮게 관찰되고, 10회군의 p-Akt가 재판류 24시간과 72시간에 대조군보다 감소된 것은 재판류 초기에 iNOS의 과도한 증가로 인하여 Akt 활성화가 억제된 것으로 생각되며, 감소된 Akt와 p-Akt는 허혈손상에서 심장근육세포를 효과적으로 보호할 수 없을 것이라 생각되었다.

앞으로 원거리 허혈양상화 후에 심장허혈을 실시하여, 오랜시간의 허혈에 대한 보호 또는 손상효과를 확인하는 과정이 있어야 하며, 10회군에서 증가된 iNOS와 재판류 72시간 뒤 감소된 흰쥐 심장의 크기와 관련이 있는지 확인해야 할 필요가 있으며, 증가된 iNOS가 산화질소의 양을 과도하게 증가시키는지 산화질소의 양을 확인해야 할 것으로 생각된다. Scherrer-Crosbie 등(2001)과 Valen 등(2000)이 언급한 것처럼, 팔이나 다리에서 실시하는 원거리 허혈양상화는 심근경색이나 큰 혈관 수술을 하

는 환자에게 쉽게 접근할 수 있는 중재법이 될 수 있으며, 이러한 시술은 수술 후, 환자의 심실비대와 기능부전 같은 부작용을 감소시킬 수 있을 것이라 생각되었다.

이상의 실험결과로, 흰쥐 뒷다리에서 실시한 원거리 허혈양상화로 증가된 세포보호단백질 eNOS와 p-Akt가 심장근육세포의 보호현상에 관련이 있을 것으로 생각되며, 10회 이상의 원거리 허혈양상화는 iNOS를 증가시켜 심장근육의 허혈손상을 일으키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG : Nitric oxide synthase: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615, 2001.
- Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qui Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J : Nitric oxide hypothesis of delayed preconditioning. *Basic Res Cardiol* 93: 325-328, 1998.
- Brazil DP, Hemmings BA : Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26: 657-664, 2001.
- de Belder A, Robinson N, Richardson P, Martin J, Moncada S : Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 95: 1672-1673, 1997.
- Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K : Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101: 660-667, 2000.
- Günaydin B, Cakici I, Soncul H, Kalaycioglu S, Cevik C, Sancak B, Kanzik I, Karadenizli Y : Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res* 41: 493-496, 2000.
- Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R : The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1507-1512, 1999.
- Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szilid

- Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD : Cardio-myocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 94: 1256-1262, 2004.
- Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM : Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 89: 1191-1198, 2001.
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schimit MR, Hoschtitzky JA, Voge M, Sorensen K, Redington NA, MacAllister R : Transient limb ischemia induces remote ischemic pre-conditioning in vivo. *Circulation* 106: 2881, 2002.
- Kis A, Yellon DM, Baxter GF : Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1063-1071, 2003.
- Li G, Labruto F, Sirsjo A, Chen F, Vaage J, Valen G : Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 968-973, 2004.
- Liang F, Gao E, Tao L, Liu H, Qu Y, Christopher TA, Lopez BL, Ma XL : Critical timing of L-arginine treatment in post-ischemic myocardial apoptosis-role of NOS isoforms. *Cardiovasc Res* 62: 568-577, 2004.
- Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM : PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34: 661-668, 2002.
- 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.
- 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.
- Sam F, Sawyer DB, Xie Z, Chang DL, Ngoy S, Brenner DA, Siwik DA, Singh K, Apstein CS, Colucci WS : Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. *Circ Res* 89: 351-356, 2001.
- Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vançon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH : Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 104: 1286-1291, 2001.
- Shimizu M, Konstantinov IE, Kharbanda RK, Cheung MH, Redington AN : Effects of intermittent lower limb ischemia on coronary blood flow and coronary resistance in pigs. *Acta Physiol* 190: 103-109, 2007.
- Toth A, Kovacs K, Deres P, Halmosi R, Czopf L, Hanto K, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K : Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem Pharmacol* 66: 2263-2272, 2003.
- Valen G, Hansson GK, Dumitrescu A, Vaage J : Unstable angina activates myocardial heat shock protein 72, endothelial nitric oxide synthase, and transcription factor NFκB and AP-1. *Cardiovasc Res* 47: 49-56, 2000.
- Yamashita K, Kajstura J, Discher DJ, Wasserlauf BJ, Bishopic NH, Anversa P, Webster KA : Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res* 88: 609-614, 2001.

Abstract

**Effects of Remote Ischemic Preconditioning on the Expressions
of NOS and Akt in the Rat Myocardium**

Ji-Yon Jo, Youn-Kyoung Seo, Su-Kyoung Jeon, Doo-Jin Paik

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

Remote ischemic preconditioning (IP), brief tolerating cycles of ischemia and reperfusion in remote non-vital organs, can reduce ischemic injury of the heart. IP induces cardiac protection by down-regulating iNOS or up-regulating eNOS. In addition, Akt has been known to protect myocardium against ischemia-reperfusion injury. This study was undertaken to observe the expression of iNOS, eNOS, Akt and phospho-Akt (p-Akt) in the rat myocardium after IP.

Thirty-five weeks-old male Sprague-Dawley rats were divided into control and IP groups. The IP group was further subdivided into 3 groups based on the number of cycles of IP. For IP, left common iliac artery was occluded 3, 6 and 10 cycles for 5 min of ischemia alternating with 5 min of reperfusion. The rats were sacrificed at 0, 3, 6, 24 and 72 hours of IP and the heart was removed. The expression of iNOS, eNOS, Akt and p-Akt in the rat myocardium was examined by immunohistochemical staining and Western blot analysis.

The expression of iNOS was increased by IP and was higher in 10IP groups than 3IP and 6IP group. The expression of eNOS was increased or decreased by IP and was showed no difference with increasing episode of IP. The expression of Akt was decreased by IP at 24 and 72 hours after reperfusion, and showed no differences with increasing episode of IP. The expression of p-Akt was increased by IP and showed no difference with increasing episode of IP.

These results suggest that hind limb ischemic preconditioning provides cardiac protection through up-regulation of eNOS and phosphorylation of Akt, however excessive episodes of remote preconditioning may induce the myocardial ischemic injury through overexpression of iNOS.

Key words : Remote ischemic preconditioning, Rat, Myocardium, iNOS, eNOS, Akt, p-Akt