

## 본태성 고혈압 흰쥐의 앞정강근에서 허혈양상화 후 산화질소합성효소와 Akt의 발현

최성욱, 서윤경<sup>1</sup>, 백두진<sup>1</sup>, 김태승

한양대학교 의과대학 정형외과학교실,

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 산화질소는 허혈-재관류 기간에 생성되어 전사인자들을 활성화시킨다고 알려져 있다. 산화질소를 생성하는데 필요한 산화질소합성효소(nitric oxide synthase, NOS)는 nNOS와 iNOS, eNOS 등 3종류가 있다. Akt는 세포 생존에 중요한 인자로 알려져 있으며, 허혈양상화는 NOS와 Akt의 발현에 영향을 주어 허혈손상을 감소시킨다고 알려져 있다. 또한 NOS의 변화는 고혈압의 발병과 관련이 있으며, 또한 고혈압은 뼈대근육의 피로저항과 수축력의 감소 같은 변화를 유도한다고 알려져 있다. 본 실험에서 다리에서 실시한 허혈양상화가 본태성 고혈압 흰쥐의 뼈대근육에서 발현되는 NOS 이형과 Akt의 발현에 어떤 영향을 주는지 알아보려고 하였다.

9 주령의 정상 혈압 흰쥐와 본태성 고혈압 흰쥐를 사용하여 대조군과 허혈양상화 3회군, 10회군으로 나누었다. 허혈양상화는 왼은덩동맥을 5분 허혈과 5분 재관류를 3회 또는 10회 반복하여 실시하였고, 재관류 시간 0시간과 0.5시간, 1시간, 3시간, 24시간에 실험동물을 희생시켜 앞정강근을 적출하였다. NOS 이형과 Akt의 발현 변화를 관찰하기 위해, 면역조직화학염색과 Western blot assay를 시행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

본태성 고혈압 흰쥐에서 허혈양상화 처치후 nNOS의 발현은 감소, iNOS의 발현은 증가, eNOS의 발현과 Akt 발현은 감소하였다. 또한 10회의 허혈양상화는 iNOS의 발현을 증가시키고, nNOS와 eNOS, Akt의 발현을 감소시켰다.

위의 결과를 종합하면 본태성 고혈압 흰쥐에서 반복적인 허혈양상화는 앞정강근에서 iNOS의 발현을 증가시키며, eNOS와 Akt의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 따라서 고혈압 상태에서 실시하는 반복적인 허혈양상화는 앞정강근의 허혈 손상을 증가시킬 것으로 생각된다.

(2008년 9월 1일 접수, 2008년 10월 14일 게재승인)

**찾아보기 낱말** : 고혈압, 허혈양상화, 앞정강근, NOS, Akt

### 서 론

고혈압(hypertension)은 현대인에게 흔히 발병하는 성인병의 하나이다. Chen 등(1981)은 본태성 고혈압 흰쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)에서 세동맥 수가 감소된다고 하였고, 이러한 변화는 고혈압 환자에서 심장질환이나 허혈성 뇌질환이 많이 발생하는 원인이 된다고 알려져 있다. 또한 최근에는 고

혈압이 뼈대근육에 미치는 영향에 대한 연구도 이루어지고 있다. Gray 등(1994)은 본태성 고혈압 흰쥐의 뼈대근육은 피로저항도와 수축력이 정상 혈압 흰쥐(Wistar-Kyoto rat, WKY)보다 감소된다고 하였고, Smith 등(2006)은 SHR이 저산소증에 노출시 뼈대근육으로 공급되는 산소의 양이 감소된다고 하였다. 그러나 아직까지 어떤 기전으로 고혈압이 뼈대근육에 영향을 주는지는 명확히 밝혀져 있지 않다.

Tolins 등(1990)은 산화질소(nitric oxide, NO)가 혈압과 혈관의 항상성유지에 중요한 역할을 한다고

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

하였고, Forstermann 등(1986)은 산화질소가 혈관 민무늬근육세포 내에 칼슘이온을 감소시켜 혈관을 이완시킨다고 하였다. 산화질소는 L-arginine이 산소와 반응하는 과정에서 생산되며 이 과정에 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)가 필요하다. NOS에는 neuronal NOS (nNOS)와 inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS) 3 종류가 알려져 있다(Alderton 등 2001). Chou 등(1998)은 SHR의 대동맥에서 eNOS의 활성과 단백질이 감소되는 반면, iNOS의 활성과 단백질이 증가된다고 하였고, 이들은 고혈압의 발병에 산화질소와 NOS가 관련이 있다고 하였다.

산화질소는 뼈대근육의 수축력과 당대사를 조절하나(Punkt 등 2002), 과도한 산화질소는 근육세포의 손상을 유도하며, NOS 이형들의 변화에 따라 근육세포의 허혈손상이 증가 또는 감소한다고 알려져 있다(Muscari 등 2004). Krotkiewski 등(1998)은 고혈압 환자의 뼈대근육에서 빠르게 수축하는 백색근육섬유의 비율이 높아진다고 하였고, Quadrilatero와 Rush (2006)는 SHR의 뼈대근육에서 세포자멸사가 증가된다고 하였다. 고혈압으로 인하여 증가되는 백색근육섬유의 비율이나 세포자멸사의 증가는 허혈 자극이 있을 때 뼈대근육의 손상을 증가시킬 수 있을 것이다.

한편, Akt는 serine-threonine kinase의 하나로, 산화질소 또는 활성산소기에 의해서 활성화되어 세포를 보호한다(Ushino-Fukai 등 1999). Zhou 등(2000)은 활성화된 Akt가 허혈된 흰쥐 대뇌에서 세포자멸사를 억제시킨다고 하였고, Kis 등(2003)은 허혈양상화를 실시하여 증가된 Akt가 흰쥐의 심장근육세포를 허혈손상에서 보호한다고 하였다.

뼈대근육은 수축과 이완의 반복으로 산화자극에 계속 노출되고 있는 조직이다. 이러한 근육조직에 고혈압으로 인하여 산소 공급량이 감소되거나, NOS 이형들의 발현이 변화되어 산화질소가 생성되는 양상이 달라진다면, 뼈대근육은 허혈손상에 노출되기 쉬우며, 이러한 변화는 허혈자극에 민감하다고 알려진 백색근육섬유에서(Seo 등 2003) 더 잘 관찰될 것으로 생각되었다. 이에 본 연구자들은 허혈양상화가

본태성 고혈압 흰쥐의 백색근육섬유로 구성된 앞정강근에서 발현되는 NOS와 Akt에 어떤 영향을 주는 지 알아보고, 허혈양상화 횟수의 증가가 이들의 발현에 영향을 주는지 알아보하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

9주령의 정상 혈압 흰쥐(Wistar-Kyoto rat, WKY)와 본태성 고혈압 흰쥐(SHR)를 사용하여 대조군과 허혈양상화 3회군 그리고 10회군으로 나누었고, 마지막 허혈 뒤 재관류 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간, 24시간군으로 세분하였다. 각 군당 6마리씩 WKY 72마리, SHR 72마리의 실험동물(Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan)을 사용하였다.

### 2. 혈압측정

꼬리에 tail-cuff를 감은 뒤 혈압측정기계(Blood Pressure Analyzer, IITC Model 179, IITC Life Science Inc., CA, USA)를 이용하여 수축기 혈압을 측정하였다. 실험동물의 평균 수축기 혈압은 WKY는  $145.2 \pm 5.3$  mmHg, SHR은  $184.3 \pm 7.1$  mmHg였다.

### 3. 허혈양상화처리

우레탄(urethane)을 2회 복강주사하여(1.15 g/kg) 실험동물을 마취시킨 뒤 배안을 열고, 원온영덩땀막을 흰쥐용 혈관집게로 5분 허혈, 5분 재관류를 3회 또는 10회 반복하였다. 혈관집게를 제거한 뒤 재관류시간에 따라 목척추뼈탈골 방법으로 실험동물을 희생시켜 원앞정강근을 척출하였다. 정상대조군의 실험동물은 배안을 연 후 아무런 처치를 하지 않았다.

### 4. 면역조직화학염색

탈파라핀 및 함수시킨 파라핀절편을 인산화완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)과

증류수로 세척한 뒤 3% 과산화수소와 메탄올 혼합용액으로 6분 처리한 후 PBS로 세척하였고, 0.4% pepsin 용액 (Sigma, USA)으로 실온에서 8분 반응시켰다. Blocking 용액으로 37°C에서 40분 처리한 뒤, mouse anti-nNOS 항체 (1 : 100, BD Biosciences, USA)와 rabbit anti-iNOS 항체 (1 : 100, assay design, USA), mouse anti-eNOS 항체 (1 : 150, BD Biosciences), goat anti-Akt 항체 (1 : 50, Santa Cruz Biotechnology)를 4°C에서 16시간 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체, horse anti-mouse IgG 항체 또는 goat anti-rabbit IgG 항체 또는 rabbit anti-goat IgG 항체를 PBS에 1 : 1,000 비율로 희석하여 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory, USA)으로 실온에서 30분 처리한 뒤, DAB kit (Vector Laboratory)를 이용하여 발색시켰으며, 1% methyl blue 용액으로 대조염색하였다. 실험

동물 근육의 중심부를 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 5회 관찰 및 사진촬영 하였고, 면역염색 반응 강도와 양성반응 지역의 크기에 따라, 음성반응 (-), 미약한 양성반응 (±), 경도의 양성반응 (+), 중등도 양성반응 (++) , 강한 양성반응 (+++)으로 정하여 Table 1과 2, 3, 4에 정리하였다.

### 5. Western blot analysis

단백질추출용액 (iNtRON Biotechnology, Korea)을 근육조직 0.05 g 당 1 mL씩 첨가한 뒤 homogenizer (Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 균질화 및 원심분리한 뒤 상층액을 얻었다. 상층액에서 40 µg의 단백질을 취하여 8% 또는 12% SDS-polyacryamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond™-P membrane (Amersham Biosciences,

**Table 1.** Immunoreactivities of nNOS in the rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR

		Time of reperfusion					
		Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	24 hr
WKY	3IP	+	+	±	±	++	++
	10IP	+	+	±	+++	+++	+
SHR	3IP	++	+++	±	±	±	++
	10IP	++	+	++	+	+	++

Abbreviations: WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 times of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

**Table 2.** Immunoreactivities of iNOS in the rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR

		Time of reperfusion					
		Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	24 hr
WKY	3IP	±	+	++	±	++	++
	10IP	±	+	±	++	++	++
SHR	3IP	±	++	++	+++	+	++
	10IP	±	+	+++	+	++	+++

Abbreviations: WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 times of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

**Table 3.** Immunoreactivities of eNOS in the rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR

		Time of reperfusion					
		Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	24 hr
WKY	3IP	++	+	+	++	++	++
	10IP	++	+	++	++	+	++
SHR	3IP	+	+	±	±	++	+++
	10IP	+	±	++	±	++	+

Abbreviations: WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 times of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

**Table 4.** Immunoreactivities of Akt in the rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR

		Time of reperfusion					
		Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr	24 hr
WKY	3IP	+	±	±	++	+	+++
	10IP	+	+	±	±	+	++
SHR	3IP	+	+	+++	+	+	+
	10IP	+	+	+	+	++	+

Abbreviations: WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of remote ischemic preconditioning, 10IP: 10 times of remote ischemic preconditioning, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

England)에 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액(TBST; 25 mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20, 3% non-fat dry milk)으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, 1차 항체 mouse anti-nNOS 항체 (1 : 1,000, BD Biosciences), rabbit anti-iNOS 항체 (1 : 1,000, assay designs, USA), mouse anti-eNOS 항체 (1 : 1,000, BD Biosciences), rabbit anti-Akt 항체 (1 : 1,000, Cell signaling, USA)를 4°C에서 16시간 처리하였다. TBST로 세척한 뒤 2차 항체 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG 항체 또는 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 항체 (Amersham Biosciences)를 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시키고, TBST로 세척한 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences) 용액을 1분 처리한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다. Quantity one® 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 band의 농도(density)를 측정하였고, student *t*-test를 실시하였다. Anti-mouse actin 항체 (1 : 5,000, BD Biosciences)를 이용하여 각 실험군에 포함된 단백질의 양을 확인하였다(실험결과에는 포함시키지 않았다).

## 결 과

### 1. 허혈양상화가 앞정강근에서 관찰되는 nNOS에 미치는 영향

#### 1) 면역조직화학염색

nNOS는 뼈대근육 세포질에서 관찰되었고, nNOS는 SHR에서 WKY보다 낮게 관찰되었다(Table 1, Fig. 1).

#### 2) Western blot 분석

허혈양상화 3회군(Fig. 2A)에서, WKY와 SHR의 nNOS는 재관류 초기에 대조군보다 증가된 뒤 3시간 이후에 감소되었다. 허혈양상화 10회군(Fig. 2B)에서, WKY의 nNOS는 재관류 동안 대조군보다 감소되었고, SHR의 nNOS는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었다.

### 2. 허혈양상화가 앞정강근에서 관찰되는 iNOS에 미치는 영향

#### 1) 면역조직화학염색

iNOS는 뼈대근육 세포질과 혈관에서 관찰되었다. iNOS는 SHR에서 WKY보다 높게 관찰되었고 재관류 초기에는 3회군이, 재관류 후기에는 10회군에서 높게 관찰되었다(Table 2, Fig. 3).

#### 2) Western blot 분석

허혈양상화 3회군(Fig. 4A)에서, WKY와 SHR의 iNOS는 재관류 후 대조군보다 감소하였으나, 재관류 0.5시간과 3시간에 SHR의 iNOS는 WKY보다 증가하였다( $p < 0.05$ ). 허혈양상화 10회군(Fig. 4B)에서, WKY의 iNOS는 재관류 이후 대조군보다 감소하였고, SHR의 iNOS는 재관류 이후 감소되었다가 3시간에 증가되었다.

### 3. 허혈양상화가 앞정강근에서 관찰되는 eNOS에 미치는 영향

#### 1) 면역조직화학염색

eNOS는 뼈대근육의 세포질과 혈관의 내피세포에서 관찰되었다. eNOS는 SHR에서 WKY보다 낮게 관찰되었고, 10회군에서 3회군보다 낮게 관찰되었다(Table 3, Fig. 5).

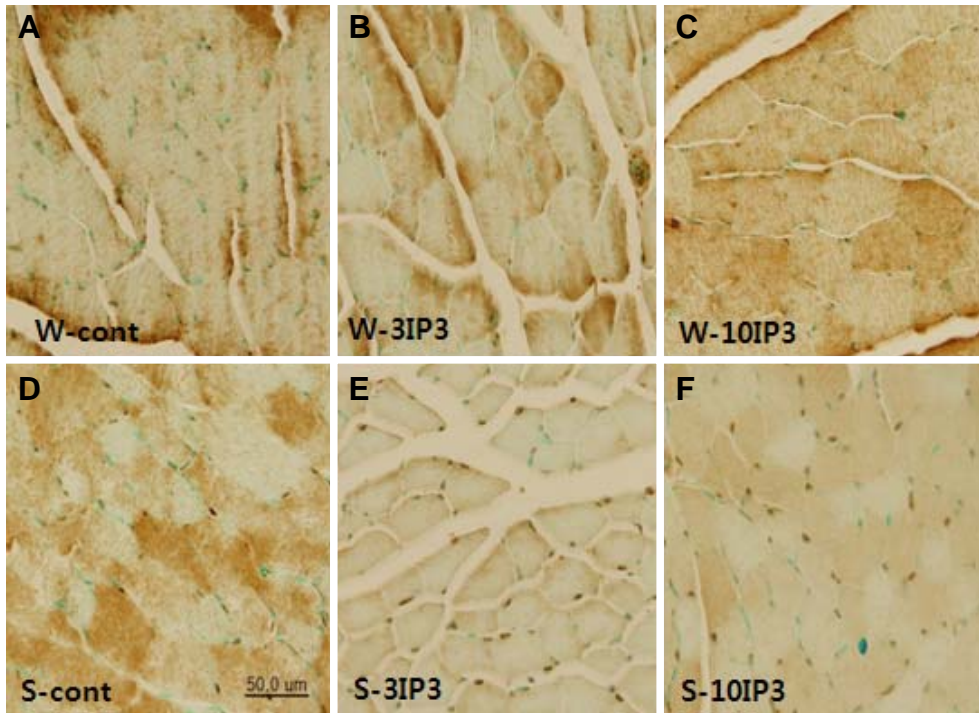
#### 2) Western blot 분석

허혈양상화 3회군(Fig. 6A)에서, WKY의 eNOS는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, SHR의 eNOS도 재관류 0.5시간에 대조군보다 감소된( $p < 0.05$ ) 것을 제외하고는 대조군과 비슷하였다. 허혈양상화 10회군(Fig. 6B)에서, WKY와 SHR의 eNOS는 재관류 초기에 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었고, 재관류 1시간과 3시간에 WKY의 eNOS는 SHR보다 증가되었다( $p < 0.05$ ).

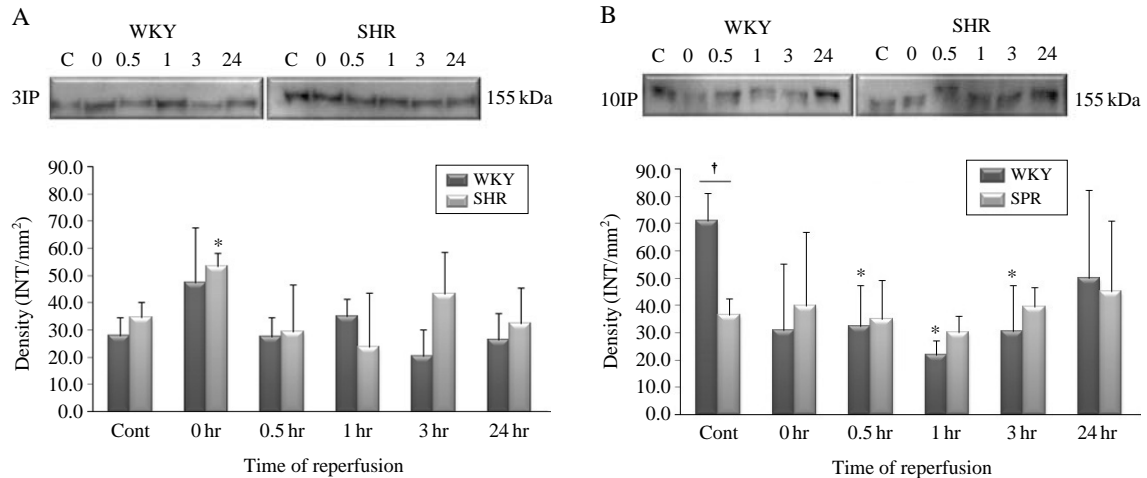
### 4. 허혈양상화가 앞정강근에서 관찰되는 Akt에 미치는 영향

#### 1) 면역조직화학염색

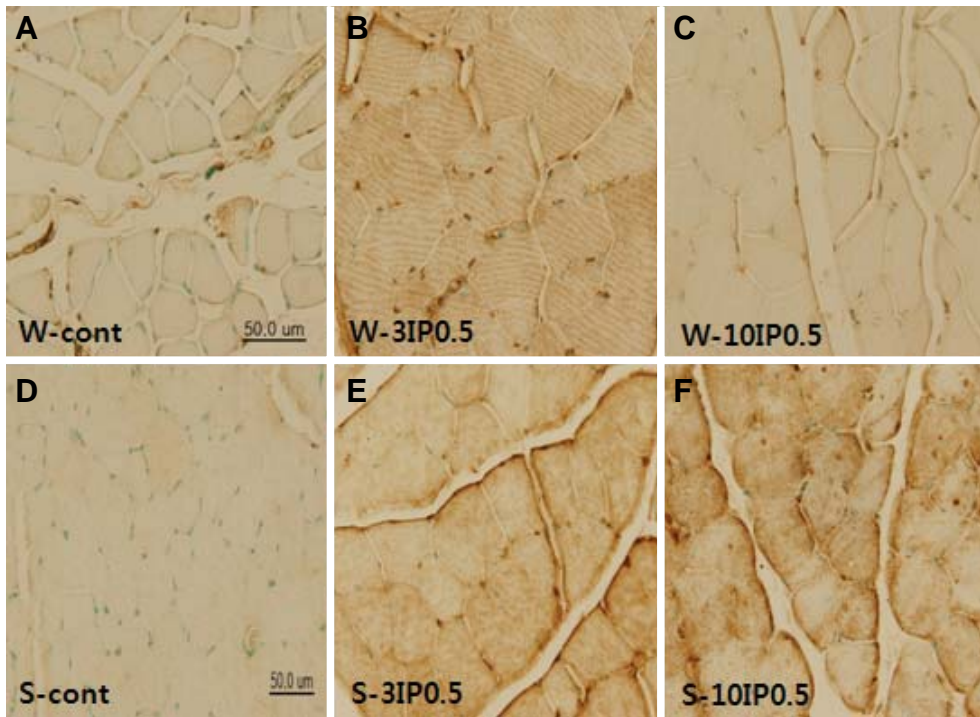
Akt는 뼈대근육세포의 형질막부분, 세포질과 혈관



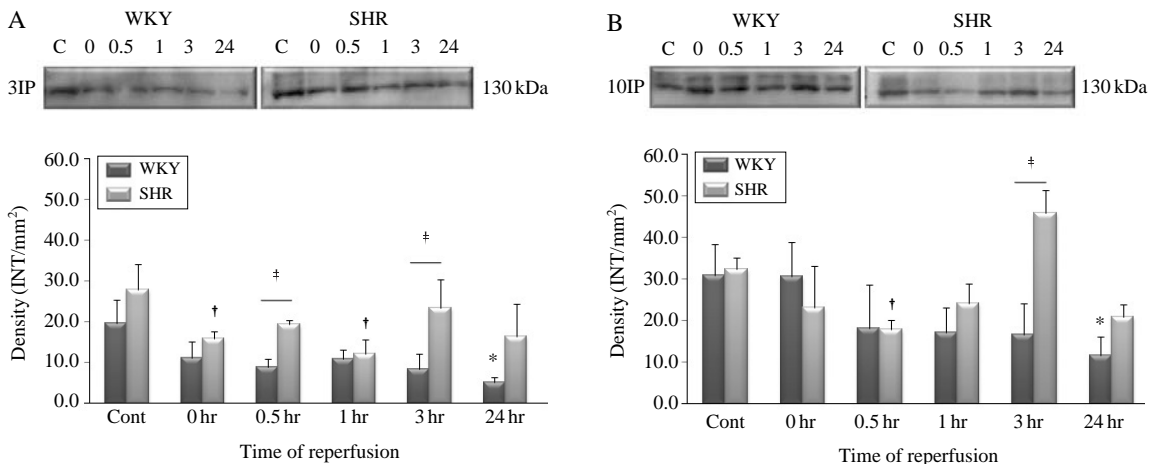
**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of nNOS in rat tibialis anterior muscle, 3 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 1. Intensities of nNOS were weaker in SHR (D~F), compare to WKY (A~C). W: Wistar-Kyoto rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: spontaneously hypertensive rat ( $\times 400$ ).



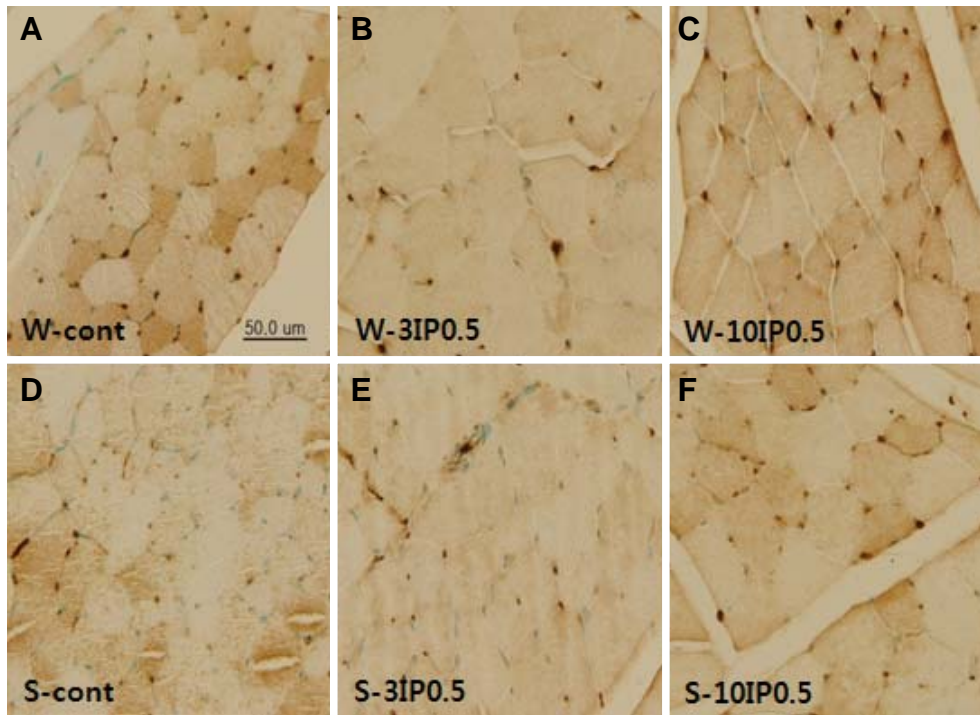
**Fig. 2.** Western blot analysis of nNOS in rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR, after ischemic preconditioning (IP). A: 3IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in SHR. B: 10IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in WKY, †:  $p < 0.05$  between WKY and SHR. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.



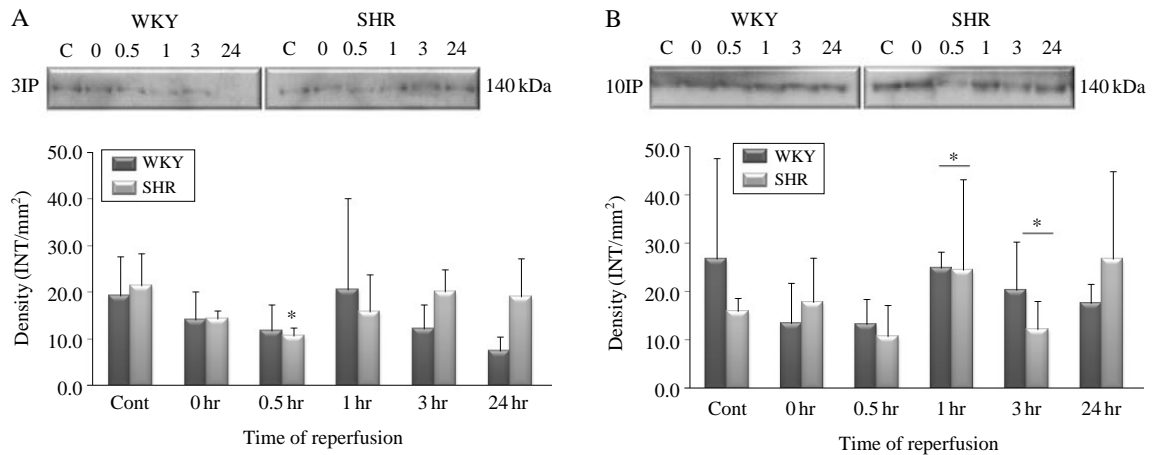
**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of iNOS in rat tibialis anterior muscle, 0.5 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 2. IP increased iNOS, compared with cont (A, D). Intensities of iNOS were stronger in SHR (E, F), compare to WKY (B, C). W: Wistar-Kyoto rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: spontaneously hypertensive rat ( $\times 400$ ).



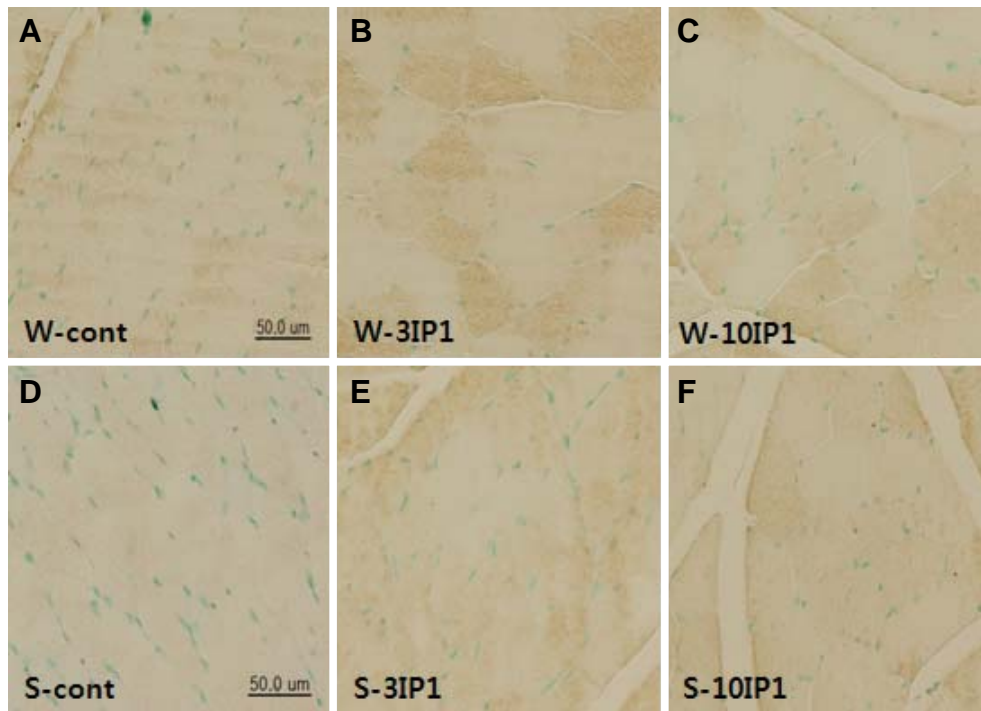
**Fig. 4.** Western blot analysis of iNOS in rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR, after ischemic preconditioning (IP). A: 3IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in WKY, †:  $p < 0.05$  vs cont in SHR, ‡:  $p < 0.05$  between WKY and SHR. B: 10IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in WKY, †:  $p < 0.05$  vs cont in SHR, ‡:  $p < 0.05$  between WKY and SHR. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.



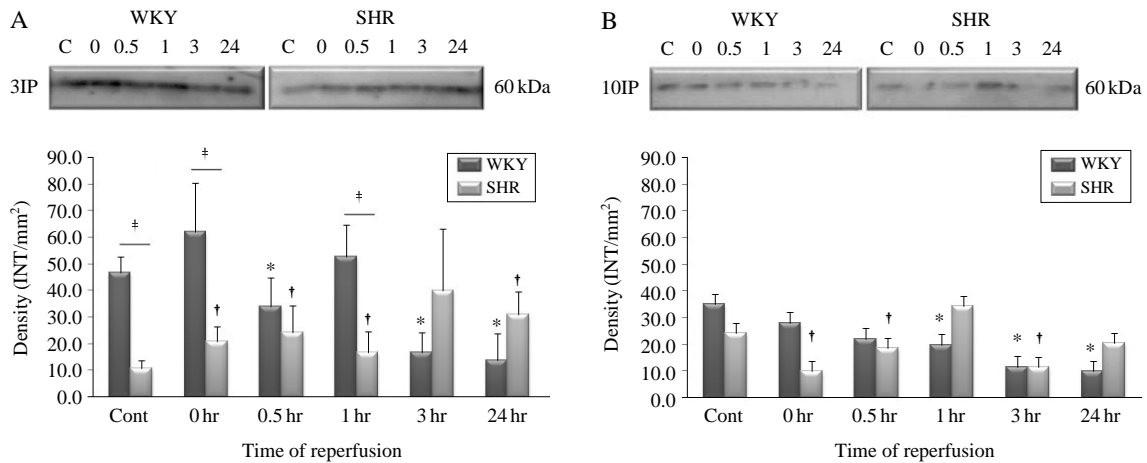
**Fig. 5.** Immunohistochemical staining of eNOS in rat tibialis anterior muscle, 0.5 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 3. IP increased eNOS, compared with cont (A, D). Intensities of eNOS were weaker in SHR (E, F), compare to WKY (B, C). W: Wistar-Kyoto rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: spontaneously hypertensive rat ( $\times 400$ ).



**Fig. 6.** Western blot analysis of eNOS in rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR, after ischemic preconditioning (IP). A: 3IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in SHR. B: 10IP. \*:  $p < 0.05$  between WKY and SHR. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.



**Fig. 7.** Immunohistochemical staining of Akt in rat tibialis anterior muscle, 1 hours after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 4. Intensities of Akt were weaker in SHR (D~F), compare to WKY (A~C). W: Wistar-Kyoto rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: spontaneously hypertensive rat ( $\times 400$ ).



**Fig. 8.** Western blot analysis of Akt in rat tibialis anterior muscle of the WKY and SHR, after ischemic preconditioning (IP). A: 3IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in WKY, †:  $p < 0.05$  vs cont in SHR, ‡:  $p < 0.05$  between WKY and SHR. B: 10IP. \*:  $p < 0.05$  vs cont in WKY, †:  $p < 0.05$  vs cont in SHR. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

의 내피세포에서 관찰되었다. Akt는 SHR에서 WKY보다 낮게 관찰되었고, 10회군에서 3회군보다 낮게 관찰되었다(Table 4, Fig. 7).

## 2) Western blot 분석

허혈양상화 3회군(Fig. 8A)에서, WKY의 Akt는 재관류 0시간과 1시간에 대조군보다 증가된 것을 제외하고는 감소되었다. SHR의 Akt는 재관류 후 3시간을 제외하고는 대조군보다 증가되었다( $p < 0.05$ ). 재관류 초기에 Akt는 WKY에서 SHR보다 증가되었다. 허혈양상화 10회군(Fig. 8B)에서, WKY의 Akt는 재관류 1시간 이후에 대조군보다 감소되었으나( $p < 0.05$ ), SHR의 Akt는 재관류 0시간부터 3시간까지 대조군보다 감소되었다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

정확한 기전이 밝혀지지 않았지만, 고혈압은 뼈대근육의 피로 저항도와 수축력 감소(Gray 등 1994), 근육형질 내 칼슘 농도 증가(Ameen 등 1991), 산소공급량의 감소(Smith 등 2006) 등을 일으킨다고 알려져 있다. 본 실험에서는 정상 혈압 흰쥐(WKY)와 본태성 고혈압 흰쥐(SHR)의 앞정강근에서 발현되는 NOS와 Akt의 변화를 허혈양상화 횟수에 따라 알아 보았다.

첫째, nNOS는 허혈양상화 3회군에서 재관류 초기에 증가되었고, 10회군에서는 감소되었다. nNOS는 3회군에서 10회군보다 더 증가되었고, WKY에서 관찰된 nNOS가 SHR보다 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다. Tidball 등(1998)은 움직이지 않던 흰쥐를 운동시키면 뼈대근육의 염증반응과 손상이 증가되나, nNOS의 증가는 염증반응과 손상을 감소시킨다고 하였고, Lochner 등(2002)은 허혈양상화 후 재관류 24시간에 증가되는 nNOS가 재관류 후기에 일어나는 허혈손상을 감소시킨다고 하였다. Seo 등(2006)은 흰쥐 다리에서 짧은 허혈과 재관류를 반복하면, 넵다리골근에서 관찰된 nNOS가 허혈양상화 10회군에서 3회 또는 6회군보다 감소된다고 하였고, Koh 등(2007)은 짧은 허혈과 재관류를 3회 실시

했을 때 흰쥐의 앞정강근에서 관찰된 nNOS가 10회군보다 증가된다고 하였다.

본 실험에서 허혈양상화 후 증가된 nNOS는 Tidball 등(1998)의 의견처럼 조직의 염증반응과 허혈손상을 감소시킬 것으로 생각된다. Seo 등(2006)과 Koh 등(2007)의 다리 허혈양상화 실험처럼 본 실험에서도 비록 통계적인 유의성은 없었으나, 10회군보다 3회군에서 nNOS가 더 증가된 것으로 보아 10회의 허혈양상화는 nNOS의 유도에 효과적이지 않은 것으로 생각된다. 3회의 허혈양상화 뒤 재관류 초기에 증가한 nNOS는 허혈손상을 감소시킬 것으로 생각되며, 또한 SHR에서 WKY보다 nNOS가 적게 관찰된 것은, 허혈과 재관류의 반복으로 유도되는 허혈손상이 SHR에서 더 민감하게 작용하는 것으로 생각된다.

둘째, iNOS는 허혈양상화 3회군에서 재관류 후 대조군보다 감소 또는 비슷한 수준으로 관찰되었고, 10회군에서 iNOS는 재관류 초기와 3시간, 24시간에 증가되었다. iNOS는 10회군에서 3회군보다 더 증가되었고, SHR에서 WKY보다 증가되는 것을 알 수 있었다. Zhang 등(2003)은 흰쥐의 고환올림근을 허혈시킬 때 iNOS를 억제하면 근육괴사와 부종, 염증반응, 혈관손상이 감소된다고 하였으며 또한, Chou 등(1998)은 정상혈압을 유지하는 4주령된 WKY와 SHR 대동맥에서 iNOS 단백질의 양과 효소의 활성에는 차이가 없으나, 혈압이 상승된 14주령 SHR 대동맥에서 iNOS 단백질 양과 효소의 활성은 WKY보다 증가되며, 이들은 iNOS가 고혈압을 발현시키는 중요 인자라고 하였다. 또한 Quadrilatero와 Rush(2008)는 SHR의 가자미근에서 procaspase-8의 양과, caspase-8의 활성화도, DNA 분질이 WKY보다 증가된다고 하였다.

본 실험에서 허혈양상화 후 앞정강근에서 증가된 iNOS는 Zhang 등(2003)의 의견처럼 허혈 뒤 뼈대근육의 손상을 유도할 것으로 생각되고, 10회군에서 재관류 3시간 및 24시간까지 지속적으로 발현된 iNOS가 재관류 후기까지 뼈대근육 손상을 유도할 것으로 생각된다. 또한 iNOS가 WKY보다 SHR에서 더 증가된 것은 Chou 등(1998)의 의견과 비슷하고,

SHR의 앞정강근이 허혈손상에 더 민감할 것으로 생각된다.

셋째, eNOS는 허혈양상화 3회군에서 재판류 초기에 증가하였으나, 후기에 감소하였고, 10회군에서 eNOS는 재판류 초기에 감소되었다. eNOS는 3회군에서 10회군보다 증가되었고, WKY에서 SHR보다 증가되었다. Muscari 등(2004)은 허혈양상화가 흰쥐 심장에서 eNOS를 증가시켜 허혈된 심장근육의 괴사를 감소시킨다고 하였고, Tsui 등(2008)은 다리절단술을 받은 환자의 장딴지근에서 증가된 eNOS가 재판류를 증진시키고, 조직의 손상을 감소시킨다고 하였다. 또한, Lockette 등(1986)은 고혈압의 발병과 eNOS의 감소가 관련이 있다고 하였으며, Chou 등(1998)도 고혈압이 발병된 14주령 SHR의 대동맥에서 eNOS는 WKY보다 감소한다고 하였다.

본 실험에서 허혈양상화 후 증가된 eNOS가 Muscari 등(2004)과 Tsui 등(2008)의 의견처럼 허혈 손상을 감소시킬 것으로 생각되고, eNOS가 허혈양상화 3회군에서 10회군보다 증가된 것으로 보아 3회군에서 허혈손상이 적게 일어날 것으로 생각된다. 또한 Lockette 등(1986)과 Chou 등(1998)의 의견처럼 허혈양상화 뒤 SHR의 eNOS는 WKY보다 감소되었으며, 감소된 eNOS는 허혈로 유도되는 산화자극에서 SHR의 뼈대근육을 효과적으로 보호하지 못할 것으로 생각된다.

넷째, Akt는 허혈양상화 3회군과 10회군에서 재판류 초기에 증가, 후기에 감소하였다. Akt는 3회군에서 10회군보다 증가되었으나 통계적 유의성은 없었으며, WKY에서 SHR보다 증가되었다. Akt가 serine 473 부위에서 인산화되면 Bad와 caspase-9을 억제하여 세포를 보호한다고 알려져 있다(Fujio 등 2000, Brazil과 Hemmings 2001). Ushio-Fukai 등(1999)은 과산화수소를 처리하면 흰쥐 혈관의 민무늬근육에서 Akt가 증가되어 세포를 보호한다고 하였다. 그러나, Kelly 등(1994)은 과도한 산화자극은 Akt 활성을 억제한다고 하였다.

본 실험에서 재판류 초기에 증가된 Akt는 Ushio-Fukai 등(1999)의 의견처럼 허혈과 재판류로 생성된 활성산소기에 반응하여 생성된 것으로 생각되며, 허

혈양상화 3회군의 Akt는 10회군보다 증가되었는데, 이는 Kelly 등(1994)의 의견처럼 짧은 허혈과 재판류를 10회 반복하는 것은 과도한 자극으로 작용하여 Akt의 증가를 유도하지 못한 것으로 생각된다. 또한 재판류 1시간까지 WKY의 Akt는 대조군과 비슷한 수준 또는 증가된 반면, SHR의 Akt는 재판류 1시간 또는 3시간까지 감소되었다. 허혈손상은 재판류 초기 3시간 이내에 주로 발생하는데, Akt의 발현이 재판류 3시간 이후에 증가되는 SHR은 WKY보다 재판류 초기에 활성산소기가 많이 생성된 것으로 생각되며, WKY에서 증가된 Akt가 Brazil과 Hemmings (2001), Fujio 등(2000)의 의견처럼 허혈손상에서 효과적으로 뼈대근육세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다.

앞으로, 허혈양상화가 SHR과 WKY의 뼈대근육에 미치는 영향, 그리고 허혈양상화 횟수에 따른 산화질소농도의 변화를 확인하고, 세포자멸사 또는 DNA 분절을 확인하여 뼈대근육에서 허혈손상을 확인해야 할 것이다. 고혈압의 발병초기 모델로 사용되는 9주령을 대상으로 실험한 결과, 허혈양상화 횟수와 재판류 경과시간에 따른 iNOS의 발현은 SHR에서 증가되었고, eNOS의 발현은 SHR에서 감소되었으나 통계적 유의성을 갖는 군은 적었다. 고혈압이 발생하고 유지되는 14~17주령은 되어야(Chou 등 1998) SHR과 WKY의 iNOS와 eNOS의 발현에 통계적 유의성이 있을 것으로 생각되며, 추가적인 실험을 통하여 산화자극이 고혈압 환자의 뼈대근육에서 주는 영향을 확인할 수 있을 것이며, 고혈압 환자의 외과적 수술시 허혈손상을 감소시킬 수 있는 중재법을 연구해야 할 것이라 생각된다.

본 실험에서 반복적인 허혈양상화는 WKY보다 SHR의 뼈대근육에서 허혈손상을 유도하는 iNOS를 증가시키며, 산화자극에서 세포를 보호하는 eNOS와 Akt를 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과를 종합하면, SHR의 앞정강근이 WKY의 앞정강근보다 허혈에 쉽게 손상 받을 수 있으며, 3회보다 10회의 허혈양상화를 실시했을 때 손상요인이 더 증가될 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.
- Ameen M, Davies JE, Ng LL : A comparison of free intracellular calcium and magnesium levels in the vascular smooth muscle and striated muscle cells of the spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto normotensive rat. *Ann NY Acad Sci* 639: 550-553, 1991.
- Brazil DP, Hemmings BA : Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26: 657-664, 2001.
- Chen II, Prewitt RL, Dowell RF : Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle. *Am J Physiol* 241: H306-H310, 1981.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA : Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31: 643-648, 1998.
- Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, Russe R : Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 58: 531-538, 1986.
- 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.
- Gray SD, Carlsen RC, Deng J : Soleus muscle contractile properties in hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: 735-739, 1994.
- Kelly KA, Hill MR, Youkhana K, Wanker F, Gimble JM : Dimethyl sulfoxide modulates NF-kappa B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. *Infect Immun* 62: 3122-3128, 1994.
- 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.
- Koh BC, Seo YK, Shin CO, Chun SK, Paik DJ : Effects of repetitive ischemic preconditioning on the expression of nitric oxide synthases in tibialis anterior and soleus muscles of rat. *Korean J Phys Anthropol* 20: 213-224, 2007. (in Korean)
- Krotkiewski M, Lithell H, Shono N, Wysocki M, Holm G : High blood pressure and muscle morphology/metabolism-causal relationship or only associated factors? *Clin Physiol* 18: 203-213, 1998.
- Lochner A, Marais E, Toit ED, Moolman J : Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann NY Acad Sci* 962: 402-414, 2002.
- Lockette W, Otsuka Y, Carretero O : The loss of endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Hypertension* 8(suppl II): 61-66, 1986.
- Muscari C, Bonafe' F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, Guarnieri C, Caldarera 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.
- 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.
- Quadrilatero J, Rush JWE : Evidence for a pro-apoptotic phenotype in skeletal muscle of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 168-174, 2008.
- Quadrilatero J, Rush JWE : Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 101: 1149-1161, 2006.
- Seo YK, Jeon SK, Park HJ, Lee SW, Koh BC, Lee DK, Chang NJ, Paik DJ, Lee WH : Expression pattern of nitric oxide synthases in rat skeletal muscle after cyclic episodes of short ischemia and reperfusion. *Korean J Phys Anthropol* 19: 125-136, 2006. (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, 2003. (in Korean)
- Smith LM, Barbee RW, Ward KR, Pittman RN : Decreased supply-dependent oxygen consumption in the skeletal muscle of the spontaneously hypertensive rat during acute hypoxia. *Shock* 25: 618-624, 2006.
- 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: 260-266, 1998.

- Tolins JP, Palmer RMJ, Moncada S, Rajj L : Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol* 258: 655-662, 1990.
- Tsui JC, Baker DM, Shaw SG, Shi-Wen X, Dashwood MR : Nitric oxide synthase in critically ischaemic muscle and alterations in isoform expression during revascularization surgery. *Br J Surg* 95: 72-79, 2008.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK : Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274: 22699-22704, 1999.
- Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR : Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol* 94: 1473-1478, 2003.
- Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN : Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151: 483-494, 2000.

**Abstract**

**Expressions of Nitric Oxide Synthases and Akt in the Tibialis Anterior Muscle of the Spontaneously Hypertensive Rat after Ischemic Preconditioning**

Sung-Wook Choi, Youn-Kyoung Seo<sup>1</sup>, Doo-Jin Paik<sup>1</sup>, Tai-Seung Kim

*Department of Orthopedics, College of Medicine, Hanyang University*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

---

Nitric oxide (NO) generated during ischemic-reperfusion phase is known to activate various transcriptional factors. NO is generated by 3 nitric oxide synthase (NOS) isoforms, nNOS, iNOS, eNOS. Akt plays a important role of the cell survival. Ischemic preconditioning (IP) reduces ischemic injury by changing of the expression of the NOSs and Akt. The alterations of the NOSs is related to the development of hypertension, and hypertension has been known to induce the skeletal muscle changes including decreased fatigue resistance and contractile force.

The purpose of this study was to observe the effect of IP on the expressions of the NOSs and Akt in the skeletal muscle of the spontaneously hypertensive rat (SHR).

Nine weeks old male normotensive rat (Wistar-Kyoto rat, WKY) and SHR were divided into control and IP groups. The IP group was further divided into 3 or 10 cycles of IP. For IP, left common iliac artery was occluded 3 or 10 cycles of 5 min of ischemia/5 min of reperfusion using rodent vascular clamp. The animals were sacrificed at 0, 0.5, 1, 3 and 24 hours after reperfusion and the tibialis anterior muscles were removed. The expressions of nNOS, iNOS, eNOS, and Akt were examined with immunohistochemical methods and Western blot analysis.

In the SHR, the expression of nNOS was decreased, iNOS was increased and the expressions of eNOS and AKT were decreased, compare to WKY. The expression of iNOS was increased, and nNOS, eNOS and Akt were decreased in SHR by 10IP.

In summary, IP increased the expression of iNOS, and decreased the expression of eNOS and Akt in the SHR. It is suggested that hypertension may aggravate injury of the tibialis anterior muscle induced by repetitive ischemic conditioning.

---

**Key words :** Hypertension, Ischemic preconditioning, Tibialis anterior muscle, NOS, Akt