

## 허혈양상화 후 본태성고혈압 흰쥐의 뼈대근육에서 관찰되는 iNOS와 SOD의 발현

이 준 희, 서 윤 경, 백 두 진  
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 활성산소기의 생성과 제거 사이의 균형은 심혈관계 항상성 유지에 중요하며, 이들의 균형은 고혈압 발병에 영향을 준다고 알려져 있다. 산화자극이 세포에 가해질 때 증가되는 산화질소합성효소(inducible NOS, iNOS)는 허혈-재관류 손상을 유도할 뿐 아니라 고혈압의 발생과도 연관이 있다. 뼈대근육의 허혈-재관류 손상 역시 활성산소기에 의해서 일어나며, iNOS의 과도한 증가는 근육세포의 허혈손상을 증가시킬 수 있다. 항산화효소(superoxide dismutase, SOD)는 활성산소기를 제거하는 강력한 효소로 알려져 있다.

본 연구에서는 반복적인 허혈양상화가 정상혈압 흰쥐와 본태성고혈압 흰쥐의 백색근육과 적색근육에서 iNOS와 CuZnSOD 및 MnSOD의 발현에 영향을 주는지 알아보았다.

9주령의 정상혈압 흰쥐(WKY)와 본태성고혈압 흰쥐(SHR)를 대조군과 허혈양상화군으로 나누었고, 짧은 허혈과 재관류 반복 횟수에 따라 허혈양상화 3회군과 10회군으로 나누었다. 허혈양상화는 흰쥐용 혈관집계를 이용하여 왼손엉덩동맥에 각각 5분 허혈-5분 재관류를 3회 및 10회 반복하여 실시하였고, 마지막 허혈 후 재관류 0시간과 0.5시간, 1시간, 3시간에 실험동물을 희생하여 앞정강근과 가자미근을 적출하였다. iNOS와 CuZnSOD 및 MnSOD를 면역조직화학염색과 Western blot assay 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

허혈양상화 처치 후, iNOS는 앞정강근에서 발현되었으나, 가자미근에서는 발현되지 않았다. 앞정강근에서 iNOS는 WKY와 SHR 모두에서 증가되었고, SHR에서 WKY보다 더 높았다. 허혈양상화 처치 후, CuZnSOD와 MnSOD는 앞정강근과 가자미근에서 모두 관찰되었으며, 가자미근에서 더 높았다. CuZnSOD와 MnSOD는 WKY와 SHR에서 모두 증가하였고, WKY에서 SHR보다 더 높았다.

iNOS의 높은 발현과 SOD의 낮은 발현을 고려할 때, 고혈압과 백색근육섬유는 뼈대근육에 가해지는 허혈손상에 더 민감할 것이라 생각되었다.

(2009년 5월 25일 접수, 2009년 6월 19일 수정접수, 2009년 6월 22일 게재승인)

**찾아보기 낱말** : 고혈압, 허혈양상화, 앞정강근, 가자미근, iNOS, SOD

### 서 론

허혈과 재관류가 반복되는 근육세포에서는 활성산소기(reactive oxygen species, ROS)가 계속 만들어지며, 생성되는 활성산소기와 제거되는 활성산소기 사이에 균형이 맞아야 근육세포의 정상적인 기

능이 유지될 수 있다. 산화자극은 빠르게 산화질소합성효소 inducible nirtic oxide synthase (iNOS)를 활성화시켜 다량의 산화질소를 생성시키며, 산화질소는 superoxide ( $O_2^-$ )와 반응하여 peroxinitrite (ONOO<sup>-</sup>)로 전환되어(Beckman과 Koppenol 1996), 지질인산화를 증가시키고 세포막 통합성을 감소시킨다(Kaur와 Halliwell 1994). 또한 Chou 등(1998)은 산화질소합성효소의 증가 또는 감소가 혈압의 항상성을 변화시키며 이로 인해 고혈압이 유발된다고 하였다.

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

뼈대근육은 활성산소기의 손상을 감소시키기 위해 Akt같은 보호단백질의 발현을 증가시켜 세포내 단백질 변성을 방지하고 산화자극에 적응하도록 돕는다(Bakau와 Horwich 1998). 또한 뼈대근육에는 활성산소기를 제거하는 강력한 항산화효소 superoxide dismutase (SOD)가 존재한다.

SOD는 superoxide를 과산화수소(hydrogen peroxide)와 산소로 전환시키는 효소로, superoxide가 peroxinitrite로 전환되는 것을 방지한다(Park 등 2005). SOD는 세포질에 존재하는 CuZnSOD와 사립체에 존재하는 MnSOD, 세포사이기질에 존재하는 extracellular SOD 등 세 종류가 알려져 있다. Noshita 등 (2003)은 CuZnSOD가 발현되는 흰쥐의 대뇌에서 허혈손상이 감소된다고 하였고, MnSOD 역시 뼈대근육의 피로를 감소시킨다고 알려져 있다(Bruton 등 2008). 한편, Nakazono 등(1991)과 Umemoto 등 (2004)은 고혈압의 병태생리와 CuZnSOD가 관련이 있다고 하였으며, Ülker 등(2003)과 Umemoto 등 (2004)은 MnSOD가 고혈압의 발병과 관련이 있다고 하였다.

고혈압은 만성 성인병의 하나로 세동맥(arteriole)의 구조적 이상과 기능적 이상이 동반되며, 이로 인해 미세순환(microvascular circulation)의 장애가 생기고, 이러한 미세순환의 장애는 허혈손상을 일으키는 원인이 되며 심장과 혈관뿐 아니라 뼈대근육에도 영향을 줄 수 있다(Gray 등 1994). 또한 Chou 등 (1998)은 iNOS의 활성화와 단백질의 증가가 고혈압의 발병과 관련이 있다고 하였다.

이에 본 연구자들은 iNOS의 증가로 산화질소의 생성이 많아지면 뼈대근육세포에 가해지는 산화자극도 함께 증가할 것이며, 근육세포는 증가되는 산화질소 또는 활성산소기를 처리하기 위해 항산화효소의 발현을 변화시킬 것이라 생각되었다. 이러한 현상을 확인하기 위해 정상혈압 흰쥐(Wista-Kyoto rat, WKY)와 본태성고혈압 흰쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)의 앞정강근과 가자미근에서 짧은 허혈과 재관류를 반복하였을 때 관찰되는 iNOS와 항산화효소 CuZnSOD, MnSOD의 발현을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

9주령의 본태성고혈압 흰쥐(SHR)와 정상혈압 흰쥐(WKY)를 사용하여 정상대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군은 짧은 허혈과 재관류 반복 횟수에 따라 허혈양상화 3회군과 10회군으로 나누었고, 마지막 처치 후 재관류 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간군으로 세분하였다. 정상대조군은 군당 3마리씩, 허혈양상화군은 군당 5마리씩 사용하여, SHR 43마리와 WKY 43마리, 총 86마리의 실험동물을 사용하였고, 실험동물은 Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)에서 구입하였다.

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

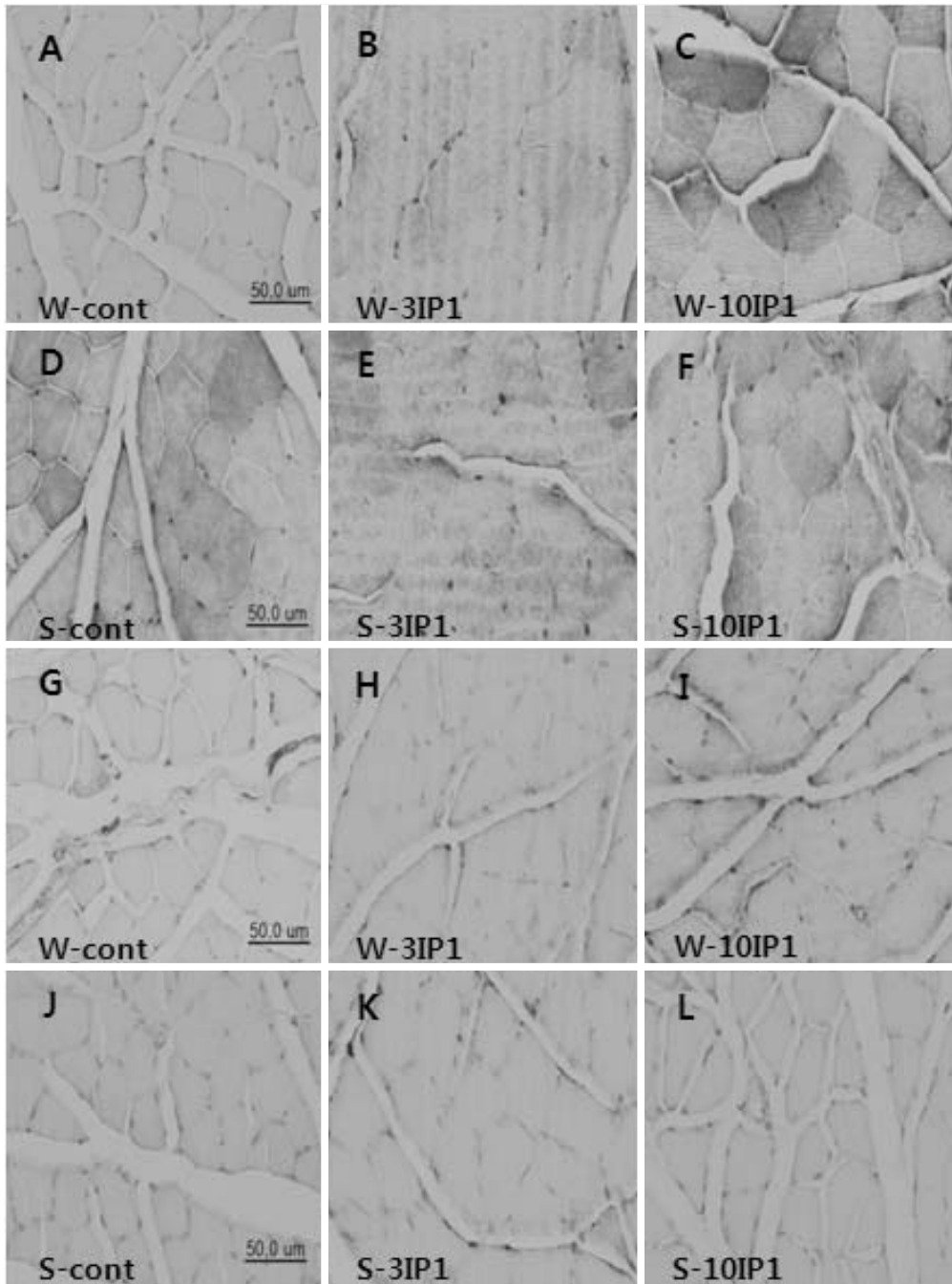
### 2. 실험동물 처치

우레탄(urethane)을 15분 간격으로 배안에 2회 주사하여 (1.15 g/kg) 실험동물을 마취시킨 뒤, 왼은엉덩

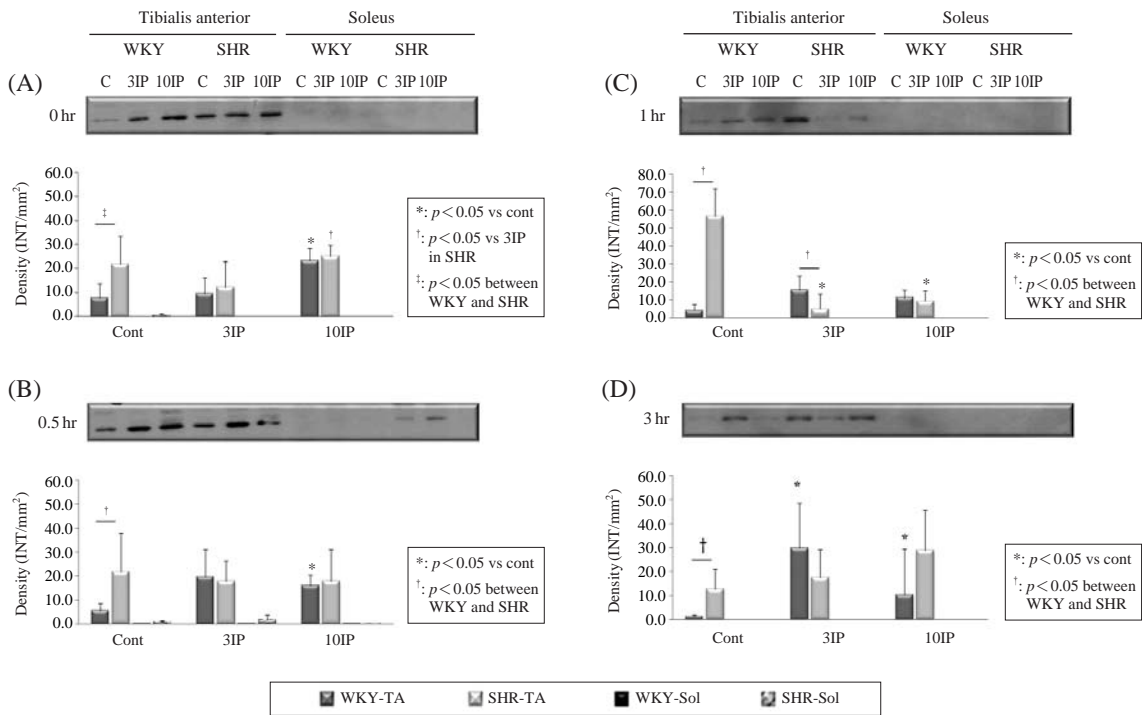
Table 1. Immunoreactivities of iNOS in the rat skeletal muscles

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

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



**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of iNOS in the rat skeletal muscles, 1 hour after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 1. In Tibialis anterior, iNOS was stonger in SHR (D~F), compared to WKY (A~C). In Soleus, iNOS was trace in both WKY (G~I) and SHR (J~L). Tibialis anterior: A~F, Soleus: G~L, W: WKY, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: SHR ( $\times 400$ ).



**Fig. 2.** Western blot analysis of iNOS in the rat skeletal muscles. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 0.5 hr after IP, C: 1 hr after IP, D: 3 hr after IP. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, C: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

동맥 (left common iliac artery)을 흰쥐용 혈관집게로 5분 동안 묶은 뒤 5분 동안 풀어주는 과정을 3회 또는 10회 반복하여 허혈양상화를 실시하였고, 정상 대조군의 실험동물은 배안을 연 후 아무런 처치를 하지 않았다.

실험처치가 끝난 뒤에 혈관집게를 제거하였고, 재 관류 0시간과 0.5시간, 1시간, 3시간 뒤에 목척추뼈탈 골방법으로 실험동물을 희생시킨 뒤 왼쪽의 앞정강근과 가자미근을 척출하였다. 근육의 몸쪽부위 (proximal part)는 Western blot analysis를, 먼쪽부위 (distal part)는 면역조직화학염색을 실시하였다.

### 3. 면역조직화학염색

탈파라핀 및 흡수시킨 파라핀절편을 인산화완충생 리식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)와

증류수로 세척한 뒤 3% 과산화수소와 메탄올 혼합 용액으로 6분 처리한 후 PBS로 세척하였고, 0.4% pepsin 용액 (Sigma, USA)으로 실온에서 8분 반응시켰다. Blocking 용액으로 37°C에서 40분 처리한 뒤, rabbit anti-iNOS 항체 (1 : 100, assay design, USA), sheep anti-CuZnSOD 또는 sheep anti-MnSOD 항체 (1 : 100, Calbiochem, USA)를 4°C에서 16시간 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체, goat anti-rabbit IgG 항체 또는 rabbit anti-sheep 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. 실험동물 근육의 중심부를 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 5장씩 사진촬영 하였고, 관찰자 2명이 면역염색반응 강도와 크기에 따라, 음성반응

(-), 미약한 양성반응(±), 정도의 양성반응(+), 중등도 양성반응(++), 강한 양성반응(+++)으로 정하여 Table 1과 2, 3에 정리하였다.

#### 4. Western blot analysis

40 µg의 단백질을 8%, 10% 또는 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond<sup>TM</sup>-P membrane (Amersham Biosciences, 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 rabbit anti-iNOS 항체 (1 : 1,000, Assay designs), rabbit anti-CuZnSOD 항체와 rabbit anti-MnSOD 항체 (1 : 2,000, Assay designs)를 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 2차 항체 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG 항체 또는 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 항체 (1 : 1,000, Amersham Biosciences)를 실온에서 1시간 반응시키고, TBST로 세척한 뒤 enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences)용액으로 1분 처리한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다. Quantity one<sup>®</sup> 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. 허혈양상화 후 뼈대근육에서 관찰되는 iNOS

#### 1) 면역조직화학염색

iNOS는 앞정강근 근육섬유의 세포질과 혈관에서 관찰되었고, iNOS의 면역반응은 SHR에서 WKY보다 강하게 관찰되었다. 가자미근에서 iNOS 면역반응은 거의 관찰되지 않았다(Table 1, Fig. 1).

#### 2) Western blot 분석

iNOS는 SHR에서 WKY보다 증가( $p < 0.05$ )되었

고, 허혈양상화는 iNOS를 정상대조군보다 증가시켰다. 가자미근에서 iNOS는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

### 2. 허혈양상화 후 뼈대근육에서 관찰되는 CuZnSOD

#### 1) 면역조직화학염색

CuZnSOD의 면역반응은 WKY보다 SHR에서 약하게 관찰되었고, 가자미근에서 앞정강근보다 강하게 관찰되었다(Table 2, Fig. 3).

#### 2) Western blot 분석

CuZnSOD는 WKY보다 SHR에서 증가되었고, 허혈양상화는 CuZnSOD를 대조군보다 증가시켰다. 가자미근에서 앞정강근보다 많이 관찰되었다(Fig. 4).

### 3. 허혈양상화 후 뼈대근육에서 관찰되는 MnSOD

#### 1) 면역조직화학염색

MnSOD의 면역반응은 WKY보다 SHR에서 약하게 관찰되었으나 큰 차이는 없었으며, 앞정강근에서 가자미근보다 높게 관찰되었다(Table 3, Fig. 5).

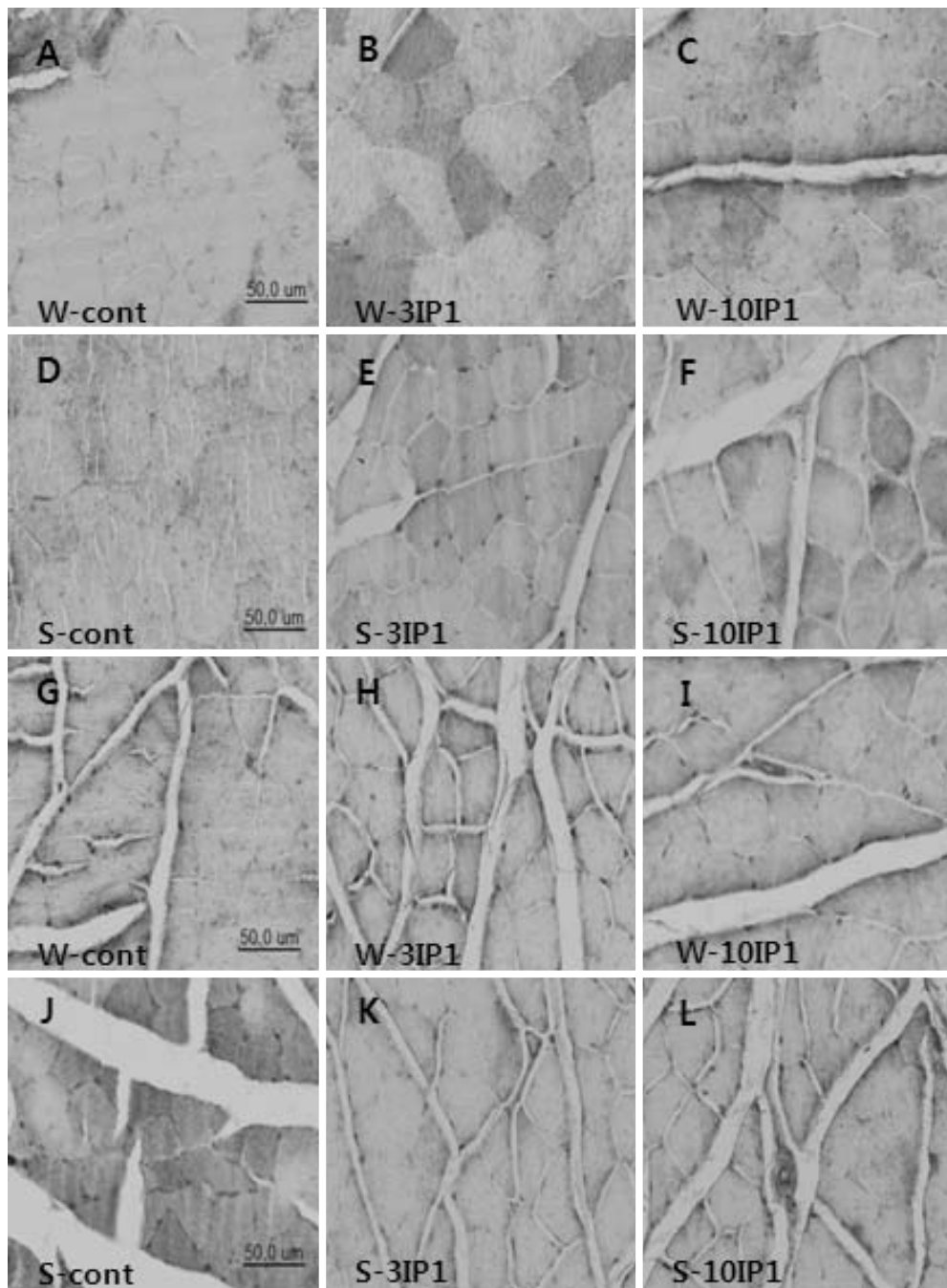
#### 2) Western blot 분석

MnSOD는 WKY보다 SHR에서 증가되었고, 허혈양상화는 MnSOD를 정상대조군보다 증가시켰다.

**Table 2.** Immunoreactivities of CuZnSOD in the rat skeletal muscles

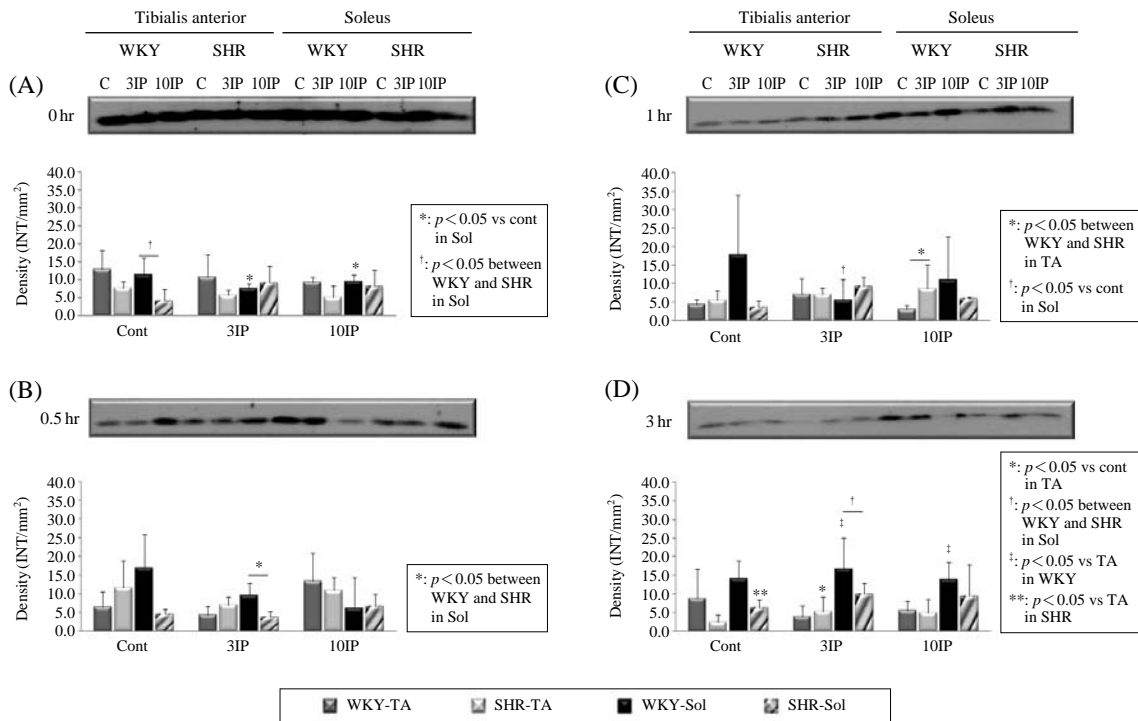
			Time of reperfusion				
			Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr
TA	WKY	3IP	+	+	++	+++	+
		10IP		+++	++	++	+
	SHR	3IP	++	+	+	+++	+++
		10IP		++	++	++	+++
Sol	WKY	3IP	++	+	++	++	±
		10IP		+	++	++	++
	SHR	3IP	++	++	++	++	++
		10IP		+	+++	++	++

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



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of CuZnSOD in the rat skeletal muscles, 1 hour after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 2. IP increased CuZnSOD, compared to the control. In both Tibialis anterior and Soleus, CuZnSOD was stronger in WKY (A~C, G~I) than that in SHR (D~F, J~L). Tibialis anterior: A~F, Soleus: G~L, W: WKY, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: SHR ( $\times 400$ ).

— 허혈양상화 후 고혈압 흰쥐의 뼈대근육에서 iNOS와 SOD 발현 —



**Fig. 4.** Western blot analysis of CuZnSOD in the rat skeletal muscle. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 0.5 hr after IP, C: 1 hr after IP, D: 3 hr after IP. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, C: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

MnSOD는 가자미근에서 앞정강근보다 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).

### 고찰

고혈압은 뼈대근육의 피로를 증가시키고(Gray 등 1994) 근육세포에서 칼슘 유리를 증가시키며(Ameen 등 1991), 백색근육섬유의 비율을 증가시킨다고 알려져 있다(Krotkiewski 등 1998). 본 실험에서는 본태성고혈압 흰쥐(SHR)와 정상혈압 흰쥐(WKY)를 이용하여, 짧은 허혈과 재관류의 반복이 백색근육섬유가 85%를 차지하는 앞정강근과 적색근육섬유가 98%를 차지하는 가자미근(Amstrong과 Phelps 1984)에서 발현되는 iNOS와 SOD에 미치는 영향을 비교

관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, 짧은 허혈과 재관류는 앞정강근의 iNOS를 정상대조군보다 증가시켰으며, iNOS는 앞정강근에서 3회군보다 10회군에서, SHR에서 WKY보다 더 증가되는 것을 알 수 있었다. 가자미근에서 iNOS는 거의 관찰되지 않았다.

정상 뼈대근육에서 iNOS 단백질과 mRNA는 낮은 수준으로 발현된다(Hussain 등 1997). 그러나 흰쥐의 뼈대근육에 내독소(리포폴리사카라이드, lipopolysaccharide)를 처리하면, 근육세포와 혈관의 내피세포에서 iNOS mRNA와 단백질 발현이 증가되어 손상이 일어나며(Thompson 등 1996), iNOS를 억제하면 허혈 후 재관류된 흰쥐의 뼈대근육에서 부종과 염증반응이 감소된다(Zhang 등 2003).

한편, Krotkiewski 등(1998)은 고혈압 환자의 뼈대

**Table 3.** Immunoreactivities of MnSOD in the rat skeletal muscles

			Time of reperfusion				
			Cont	0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr
TA	WKY	3IP	+	+	++	++	+++
		10IP		+	++	++	++
	SHR	3IP	+	+	++	++	+++
		10IP		++	+++	+++	++
Sol	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, TA: Tibialis anterior, Sol: Soleus, ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

근육에서 백색근육섬유가 증가된다고 하였고, Quadrilatero와 Rush 등(2008)은 SHR의 뼈대근육에서 caspase-8의 활성화와 DNA 분절이 증가된다고 하였다.

SHR의 앞정강근에서 관찰된 iNOS가 WKY보다 증가되고, 가지미근에서는 iNOS가 거의 관찰되지 않았는데, 이는 Krotkiewski 등(1998)과 Quadrilatero와 Rush 등(2008)의 의견처럼 SHR이 WKY에 비해 산화자극에 더 민감하게 반응하고 쉽게 손상 받을 수 있다고 생각되었다.

허혈 및 재관류로 증가된 iNOS는 백색근육섬유가 많이 포함된 앞정강근에서 증가된 반면, 가지미근에서는 미약한 양성반응으로 거의 관찰되지 않았다. Seo 등(2003a, b)은 4시간 허혈시킨 앞정강근에서 가지미근보다 세포자멸사가 증가된다고 하였고, Koh 등(2007)도 허혈과 재관류 횟수가 증가될수록 흰쥐의 앞정강근에서 iNOS가 증가된다고 하였다. iNOS가 허혈손상을 감소시킨다는 연구도 있으나 (Kane 등 2001; Li 등 2004), 10회군과 손상에 민감한 앞정강근에서 iNOS가 더 많이 증가된 것으로 보아, 증가한 iNOS는 허혈손상에 관여할 것으로 생각된다.

둘째, 짧은 허혈과 재관류는 CuZnSOD를 정상대조군보다 증가시켰다. WKY의 CuZnSOD가 SHR보다 증가되었고, 가지미근에서 앞정강근보다 증가되

었으나, 통계적 유의성을 갖는 군은 적었다.

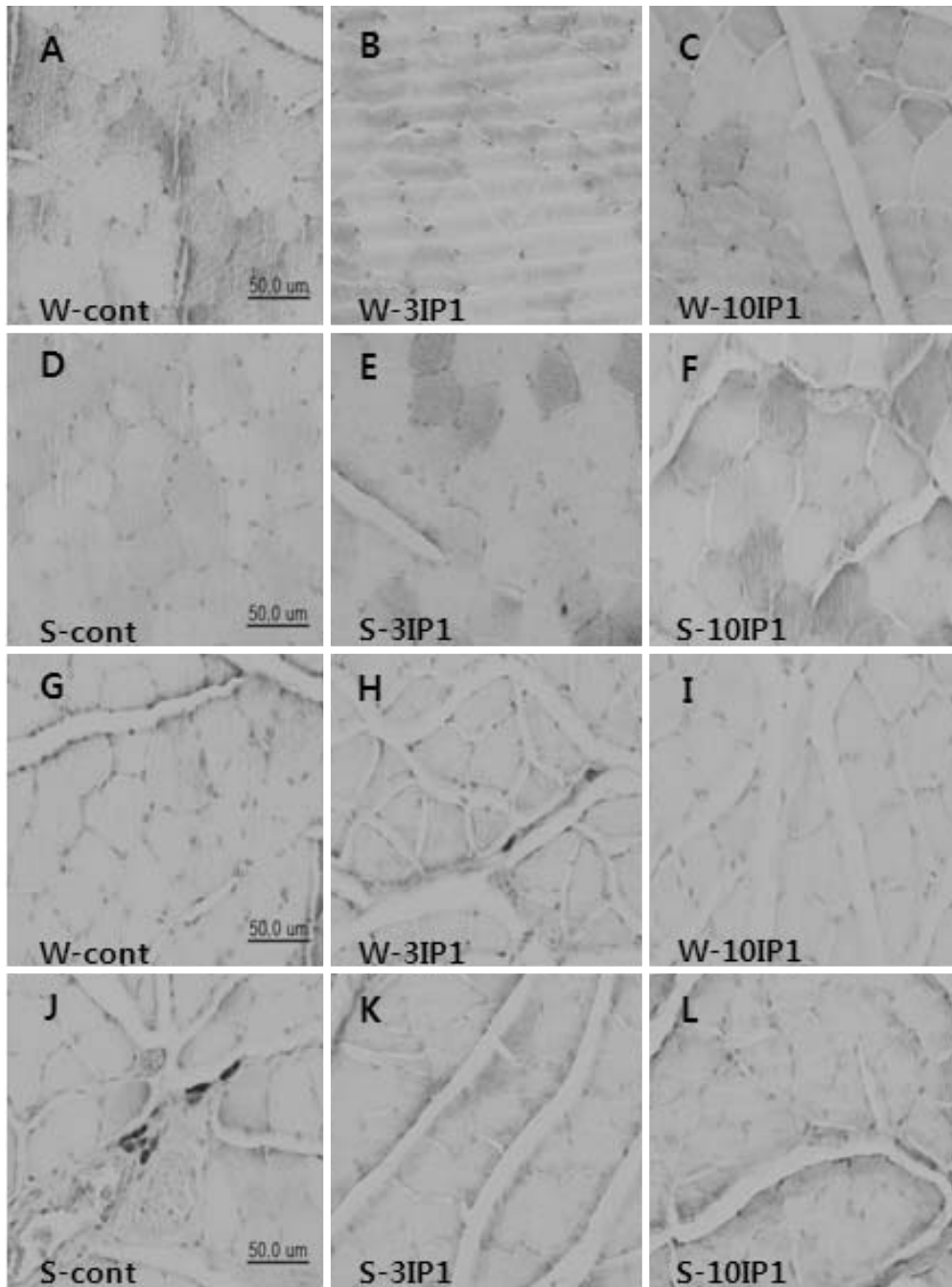
Wang 등(1998)은 CuZnSOD가 과발현된 생쥐의 허혈된 심장에서 세포자멸사는 감소된다고 하였고, Noshita 등(2003)도 CuZnSOD가 과발현된 생쥐의 대뇌를 허혈시키면 세포자멸사와 superoxide가 감소된다고 하였다. Hollander 등(2000)은 흰쥐의 뼈대근육에서 CuZnSOD는 장딴지근과 가자미근에서 높게 관찰된다고 하였다.

허혈과 재관류의 반복은 WKY뿐 아니라 SHR에서도 CuZnSOD 증가를 유도하나 iNOS 발현이 SHR에서 더 증가된 것으로 미루어, 허혈시 SHR의 뼈대근육에서 더 많은 활성산소기가 생성된 것으로 생각되며, SHR에서 증가된 CuZnSOD는 활성산소기를 효과적으로 제거하지는 못할 것으로 생각된다.

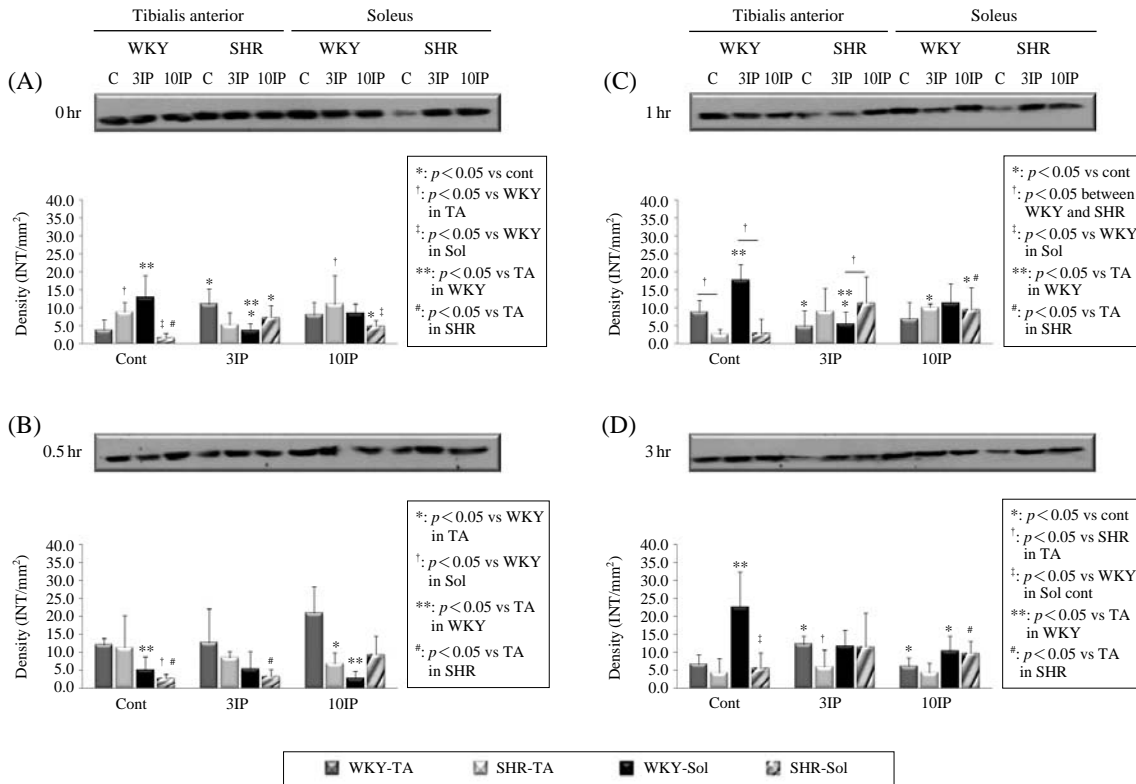
허혈에 내성이 있다고 알려진 가자미근에서 앞정강근보다 CuZnSOD가 높게 관찰되었다. 이는 Wang 등(1998)과 Noshita 등(2003)의 의견처럼, 증가된 CuZnSOD가 활성산소기를 제거하여 허혈손상을 감소시킬 것으로 생각된다. 또한 재관류 0시간과 0.5시간에 관찰된 CuZnSOD는 3회군보다 10회군에서 증가하였는데, 이는 10회군에서 더 많이 생성된 활성산소기를 처리하기 위해 CuZnSOD가 증가된 것으로 생각된다. 그러나 SHR의 경우 10회의 허혈에도 불구하고 재관류 초기에 WKY에서 CuZnSOD가 더 높게 증가되는 것으로 보아 Zhan 등(2004)의 의견처럼 생성된 활성산소기의 양만큼 비례하여 CuZnSOD의 발현이 증가되는 것은 아니라고 생각되었다.

셋째, 짧은 허혈과 재관류는 MnSOD를 정상대조군보다 증가시켰다. WKY의 MnSOD가 SHR보다 증가하였고, 가지미근에서 앞정강근보다 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

Chen 등(1998)은 MnSOD를 과발현시킨 생쥐의 심장은 허혈손상이 적고, 회복도 빠르다고 하였고, Bruton 등(2008)은 MnSOD가 과발현된 생쥐의 짧은발가락굽힘근에 반복적인 수축자극(tetany)을 주면 피로도가 적게 나타나는데, 이는 MnSOD가 근육섬유에서 생성되는 superoxide를 효과적으로 처리하기 때문이라고 하였다. 한편, Umemoto 등(2004)은 MnSOD의 증가 감소가 고혈압의 발병과 관련 없다



**Fig. 5.** Immunohistochemical staining of MnSOD in the rat skeletal muscles, 1 hour after ischemic preconditioning (IP). Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 3. IP increased MnSOD, compared to the control. Tibialis anterior: A~F, Soleus: G~L, W: WKY, cont: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP, S: SHR ( $\times 400$ ).



**Fig. 6.** Western blot analysis of MnSOD in rat skeletal muscles. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 0.5 hr after IP, C: 1 hr after IP, D: 3 hr after IP. WKY: Wistar-Kyoto rat, SHR: spontaneously hypertensive rat, C: control, 3IP: 3 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

고 하였으나, Ito 등(1995)은 SHR의 비대된 심장근육에서 MnSOD 활성이 감소하고 superoxide 생성이 증가된다고 하였다.

본 실험에서 SHR에서 관찰된 MnSOD는 WKY보다 적었으나, 허혈 뒤 SHR과 WKY에서 증가된 MnSOD는 활성산소기를 제거하여 세포손상을 감소시킬 것으로 생각된다. SHR의 경우 정상대조군보다 증가되는 MnSOD의 폭이 WKY보다 더 컸다. 이는 SHR의 뼈대근육에서 다량의 활성산소기가 발생하고 이에 반응하여 빠르게 MnSOD의 증가가 일어났다고 생각한다(Zhang 등 2003). 이러한 결과는 본 실험의 SHR에서 iNOS의 발현이 더 많이 된 것과 관련이 있다고 생각한다.

또한 Western blot 분석결과에서 MnSOD는 앞정

강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었는데, 이는 적색근육섬유에 사립체가 더 많이 존재하기 때문이라고 생각되며, 흰쥐의 뼈대근육에서 MnSOD는 가자미근에서 높게 관찰되고, 백색근육섬유로 이루어진 가쪽넓은근은 장딴지근이나 가자미근보다 MnSOD가 감소된다고 한 Hollander 등(2000)의 결과와 일치한다. 허혈양상화 후 증가된 MnSOD는 허혈자극에서 뼈대근육세포를 보호할 수 있을 것이라 생각되었다.

허혈양상화 후 변화된 iNOS와 CuZnSOD 그리고 MnSOD는 재관류 초기에는 대조군보다 증가 또는 감소하였으며, 재관류 시간이 지남에 따라 대조군 수준으로 회복되는 경향으로 관찰되었다. 이는 허혈양상화 3회 또는 10회를 실시했을 때 근육세포에

가해지는 산화자극의 정도가 다르기 때문에 생기는 현상이며, 재관류 뒤에 대조군과 비슷한 수준 또는 증가하는 것은 허혈자극이 감소하며, 허혈손상에서 회복되는 것과 관련 있다고 생각되었다. 본 실험을 통하여, 반복적인 허혈 및 재관류가 SHR과 WKY의 뼈대근육에서 iNOS와 CuZnSOD와 MnSOD를 증가시키는 것을 알았다. iNOS가 더 많이 증가된 SHR이 WKY보다 산화자극을 더 많이 받을 것으로 생각되었고, 항산화효소가 적게 발현된 SHR이 WKY보다 활성산소기를 효과적으로 제거하지 못할 것으로 생각되었다. 또한 앞정강근은 가자미근보다 iNOS가 더 많이 증가되고 CuZnSOD와 MnSOD가 적게 관찰된 것으로 보아, 허혈손상을 쉽게 받을 것으로 생각되었다. 이상을 종합하면 허혈 및 재관류시 증가된 CuZnSOD와 MnSOD는 산화자극을 감소시켜 근육세포를 보호할 것으로 생각되며, 본태성고혈압 흰쥐와 백색근육섬유로 구성된 앞정강근이 산화자극에 손상받기 쉬운 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 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.
- Amstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171: 259-272, 1984.
- Bakau B, Horwich AL : The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines? *Cell* 92: 351-366, 1998.
- Beckman JS, Koppenol WH : Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
- Bruton JD, Place N, Yamada T, Silva JP, Andrade FH, Dahlstedt AJ, Zhang SJ, Katz A, Larsson NG, Westerblad H : Reactive oxygen species and fatigue-induced prolonged low-frequency force depression in skeletal muscle fibres of rats, mice and SOD2 overexpressing mice. *J Physiol* 586: 175-184, 2008.
- Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chau CC, Hamdy RC, Chua BH : Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2281-2289, 1998.
- 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.
- Gray SD, Carlsen RC, Deng J : Soleus muscle contractile properties in hypertensive rats. *Am J Physiol* 267: 735-739, 1994.
- Hollander J, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL : Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech Ageing Dev* 116: 33-45, 2000.
- Hussain SN, Giaid A, El Dawiri Q, Sakkal D, Hattori R, Guo Y : Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 173-180, 1997.
- Ito H, Torii M, Suzuki T : Decreased SOD activity and increased  $O_2^-$  production in cardiac hypertrophy of SHR. *Clin Exp Hypertens* 17: 803-816, 1995.
- Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DR, Romero R, Messina A, Wagh M, Fraulin FO, Morrison WA, Stewart AG : Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 132: 1631-1638, 2001.
- Kaur H, Halliwell B : Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 350: 9-12, 1994.
- 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.
- 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 Cardiothoracic Surg* 26: 968-973, 2004.
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M : Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10045-10048, 1991.

- 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.
- Park JW, Qi WN, Liu JQ, Urbaniak JR, Folz RJ, Chen LE : Inhibition of iNOS attenuates skeletal muscle reperfusion injury in extracellular superoxide dismutase knockout mice. *Microsurgery* 25: 606-613, 2005.
- Quadriatero J, Rush JWE : Evidence for a pro-apoptotic phenotype in skeletal muscle of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 168-174, 2008.
- Seo YK, Kim JH, Lim HS, Shin CS, Paik DJ : Age-related alterations of Bcl-2, Bax and apoptosis in ischemic-reperfused rat tibialis anterior muscles. *Korean J Phys Anthropol* 16: 97-107, 2003a. (in Korean)
- Seo YK, Shin CS, Kim JH, You YJ, Paik DJ : Age-related alterations of apoptosis in ischemic-reperfused rat tibialis anterior and soleus muscles. *Korean J Phys Anthropol* 16: 291-299, 2003b. (in Korean)
- Thompson M, Becker L, Bryant D, Williams G, Levin D, Margraf L, Giroir BP : Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81: 2415-2420, 1996.
- Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U : Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 59: 488-500, 2003.
- Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umeji K, Hashimoto R, Matsuzaki M : Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 27: 877-885, 2004.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL : Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4556-4560, 1998.
- Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdai A, Vaziri ND : Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens* 22: 2025-2033, 2004.
- 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.

**Abstract**

**Expressions of iNOS and Superoxide Dismutase  
in the Skeletal Muscle of the Spontaneously Hypertensive Rat  
after Ischemic-preconditioning**

Jun-Hee Lee, Youn-Kyoung Seo, Doo-Jin Paik

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

---

A balance between production and degradation of reactive oxygen species has an important role in the cardiovascular homeostasis, and is known to contribute to hypertension. Under oxidative stress, an upregulation of inducible NOS (iNOS) induces ischemic-reperfusion injury, and is involved in the pathophysiology of the hypertension. Ischemic-reperfusion injury of the skeletal muscle results from reactive oxygen species, and overexpression of iNOS in the skeletal muscle increases the ischemic injury. Superoxide dismutase (SOD), antioxidant, is a major enzyme for degradation of reactive oxygen species (ROS).

The purpose of this study was to observe the effect ischemic preconditioning (IP) of the lower limb on the expression of iNOS, CuZnSOD and MnSOD in the white and red 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 (3IP) and 10 (10IP) times of IP. Left common iliac artery was occluded 3 and 10 times for 5 min of ischemia-5 min of reperfusion using rodent vascular clamp. The animals were sacrificed at 0, 0.5, 1, and 3 hours after reperfusion and the Tibialis anterior and Soleus were removed. The expressions of iNOS, CuZnSOD and MnSOD in the skeletal muscle were examined with immunohistochemical methods and Western blot analysis.

iNOS was expressed in Tibialis anterior, but in Soleus after IP. The expression of iNOS was increased in both WKY and SHR, it was higher in SHR than WKY. CuZnSOD and MnSOD were expressed in Tibialis anterior and Soleus, higher in Soleus, after IP. The expression of CuZnSOD and MnSOD were increased in both WKY and SHR, higher in WKY than SHR.

It is consequently suggested that hypertensive individual and white muscle are more sensitive to ischemic injury of the skeletal muscle as considering their high expression of iNOS and low expression of SODs.

---

**Key words :** Hypertension, Ischemic preconditioning, Tibialis anterior, Soleus, iNOS, SOD