

허혈양상화가 허혈된 흰쥐 뼈대근육의 Akt 인산화와 SOD-1 발현에 미치는 영향

서 윤 경, 백 두 진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 세포의 성장과 생존에 중요한 Akt가 인산화되면 여러 세포보호인자들이 유도되어 세포를 보호한다. 허혈양상화는 Akt 인산화를 증가시켜 허혈손상과 세포자멸사를 감소시킨다고 알려져 있다. 또한, 항산화효소 SOD-1은 허혈 및 재관류시 발생하는 활성산소기를 제거하고, Akt 인산화를 증가시켜 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서는 허혈양상화가 허혈 및 재관류시 흰쥐의 뼈대근육에서 발현되는 Akt 인산화와 SOD-1에 어떤 영향을 주는지 알아보았다.

30주령의 SD계 수컷 흰쥐를 사용하여 대조군과 허혈양상화군, 허혈군, 허혈양상화 후 허혈군으로 나누었다. 허혈양상화는 온영덩동맥을 혈관집게로 5분 폐색, 5분 재관류를 3회 반복하였고, 허혈은 온영덩동맥을 4시간 동안 폐색하였다. 재관류 직후와 1시간, 3시간, 24시간 경과시 실험동물을 희생시켜 앞정강근과 가자미근을 적출하였다. Akt 인산화(Ser473)와 SOD-1의 발현은 면역조직화염색과 Western blot 분석을 이용하여 관찰하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

허혈양상화는 Akt 인산화와 SOD-1을 대조군보다 증가시켰다. 허혈시 Akt 인산화와 SOD-1은 대조군보다 감소되었고, 재관류 시간이 지남에 따라 증가되었다. 허혈양상화는 허혈 후 재관류된 뼈대근육에서 Akt 인산화와 SOD-1을 허혈군보다 증가시켰다. Akt 인산화와 SOD-1은 앞정강근보다 가자미근에서 더 많이 증가되었다.

이상의 실험결과로, 흰쥐의 뼈대근육에서 허혈양상화는 허혈 후 재관류시 나타나는 Akt의 인산화와 SOD-1의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 이러한 허혈양상화 효과는 백색근육인 앞정강근보다 적색근육인 가자미근에서 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

(2009년 5월 25일 접수, 2009년 6월 22일 수정접수, 2009년 6월 23일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 허혈양상화, 허혈, 앞정강근, 가자미근, Akt, SOD-1

서 론

Akt는 serine-threonine kinase의 하나로 세포의 생존을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다. Akt는 성장호르몬이나 (Fujio 등 2000), 산화자극이 있을 때 (Ushio-Fukai 등 1999) phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) 의존경로를 통해 활성화된다. Serine 473 (Ser 473)의 인산화로 활성화된 Akt는 Bad와 eNOS

등을 인산화시킴으로 세포의 성장을 유도하고, 세포자멸사를 억제한다 (Scheid와 Duronio 1998).

허혈손상을 감소시키기 위해서는 과도한 활성산소기를 제거해야 하는데, 비타민 E와 C, 카탈라제 (catalase), superoxide dismutase (SOD) 등은 활성산소기를 제거하여 허혈손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Krishna 등 1998). 또한 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 허혈양상화 (ischemic preconditioning)도 심장과 뼈대근육에서 세포자멸사와 허혈손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다. Das와 Maulik (2003)은 허혈양상화가 활성산소기의 세포손상 신호를 세포의 생

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

존을 유도하는 신호로 바꿀 수 있는 잠재력이 있다고 하였다. Kis 등(2003)도 허혈양상화가 Akt 인산화를 증가시켜 심장의 허혈손상을 감소시킨다고 하였다.

폐대근육은 비교적 허혈에 내성이 있는 조직으로 알려져 있으나, 4시간 이상의 허혈은 근육세포의 자멸사와 괴사 같은 비가역적 손상을 일으킨다(Blaisdell 2002). 또한, 폐대근육은 근육섬유의 조성 비율에 따라 생리적 특성이 다르며, 근육섬유의 종류에 따라 에너지를 이용하는 방법과 모세혈관 및 사립체의 분포에 차이가 있고(Lindsay 등 1990), 허혈자극에 손상을 입는 정도와 회복하는 정도도 다르다고 알려져 있다.

이에 저자들은 흰쥐의 온엉덩동맥을 허혈시킬 때, 백색근육섬유로 구성된 앞정강근과 적색근육섬유로 구성된 가자미근에서 발현되는 Akt (Ser473) 인산화와 SOD-1의 변화를 비교하고자 하였으며, 허혈전에 허혈양상화를 실시하는 것이 Akt 인산화와 SOD-1 발현을 증가시키는지 알아보려고 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

30주령의 SD계 수컷 흰쥐(대한바이오링크, 대한민국)를 정상대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군은 허혈양상화군, 허혈군, 허혈양상화 및 허혈군으로 나누었고, 재관류 시간에 따라 재관류 직후, 1시간, 3시간, 24시간 경과군으로 세분하였고, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

2. 실험동물 처치

우레탄(urethane, 1.15 g/kg)을 2회 복막안에 주사하여 실험동물을 마취시켰다. 정상대조군은 복강을 연 후 아무런 처치를 하지 않았다. 허혈양상화는 복강을 연 후 흰쥐용 혈관집게를 이용하여 왼온엉덩동맥을 5분 폐색-5분 재관류 과정을 3회 반복하였고, 허혈은 왼온엉덩동맥을 4시간 동안 폐색하였다. 허혈양상화 및 허혈군은 허혈양상화 조작 후 바로 4시간 허혈을 시행하였다. 실험처치가 끝난 뒤, 재관류 직후와 1시간, 3시간, 24시간 뒤에 실험동물을 회

생시켜 앞정강근과 가자미를 적출하였다. 적출한 근육을 이용하여 면역조직화염색과 Western blot 분석을 실시하였다.

3. 면역조직화염색

Xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 함수시킨 뒤 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 세척하였다. 3% 과산화수소가 들어 있는 메탄올혼합용액을 5분 동안 처리 후 PBS로 세척하고 0.4% pepsin 용액을 실온에서 8분 동안 반응시킨 뒤 PBS로 세척하였다. Blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 2차 항체 숙주의 정상혈청 15 μ L/mL)을 37°C에서 1시간 처리한 뒤, 일차항체 rabbit anti-phospho-Akt 항체 (Ser 473, 1 : 30, Santa Cruz Biotechnology, USA)와 sheep anti-SOD-1 항체 (1 : 100, Calbiochem, USA)를 4°C에서 16시간 반응시켰다. PBS로 세척한 후, 실온에서 biotinylated horse anti-mouse IgG 항체와 biotinylated rabbit anti-sheep IgG 항체 (Vector Laboratories, USA)를 40분, ABC 용액 (Vector Laboratories)을 30분 반응시킨 뒤, DAB kit (Vector Laboratories)을 이용하여 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색하였다. 근육 중심부를 광학현미경으로 사진촬영한 뒤 ($\times 400$), 3명의 관찰자가 면역반응의 분포와 정도를 0점~12점으로 점수화하여 Table 1과 2에 정리하였다.

4. Western blot analysis

50 μ g의 단백질을 취하여 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond™-P membrane (Amserham pharmacia biotech., England)에 이동시켰다. Membrane을 5% blocking 용액 (TBST; 25mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20, 5% non-fat dry milk)으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, 일차 항체 anti-p-Akt 항체 (Ser 473, 1 : 1,000, Cell Signaling Technology, USA)와 anti-SOD-1 항체 (1 : 700, Santa Cruz Biotechnology)를 4°C에서 16시간 처리하였다. 2차 항체 biotinylated horse anti-mouse IgG 항체와 biotinylated rabbit anti-goat IgG 항체 (1 : 1,000, Vector

Laboratories)를 실온에서 1시간 반응시키고, TBST로 세척하였다. 3차 항체 streptavidin-HRP conjugated-항체 (1:1,000, BD Phamingen, USA)를 실온에서 30분 처리한 뒤, TBST로 세척하였고 enhanced chemiluminescence 용액 (Santa Cruz Biotechnology)을 1분간 처리한 뒤 X-ray film에 노출시켰다. Quantity one® 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 band의 농도(density)를 측정하였고, student *t*-test를 실시하였다.

결 과

1. 허혈양상화가 허혈 후 Akt 인산화(p-Akt)에 미치는 영향

1) 정상대조군

p-Akt는 근육세포의 세포막 주변과 세포질에서

관찰되었고, 혈관에서 관찰되었다. 앞정강근과 가자미근에서 관찰된 p-Akt는 큰 차이가 없었다(Table

Table 1. Immunoreactivities of p-Akt in the rat skeletal muscles, value determined by 3 observers were averaged and expressed as Mean $\pm$ S.D.

		Time of reperfusion (h)			
		0	1	3	24
TA	Cont	2.0 $\pm$ 0.8			
	IP	2.3 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.5
	4H	3.0 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.8	5.0 $\pm$ 0.8
	IP4H	4.0 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 1.0	5.8 $\pm$ 0.5
SOL	Cont	2.5 $\pm$ 0.6			
	IP	3.3 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 0.6
	4H	3.0 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.8
	IP4H	4.5 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.8

Abbreviations: TA: Tibialis anterior, SOL: Soleus, IP: ischemic preconditioning, 4H: ischemia for 4 hours, IP4H: ischemia for 4 hours after ischemic preconditioning

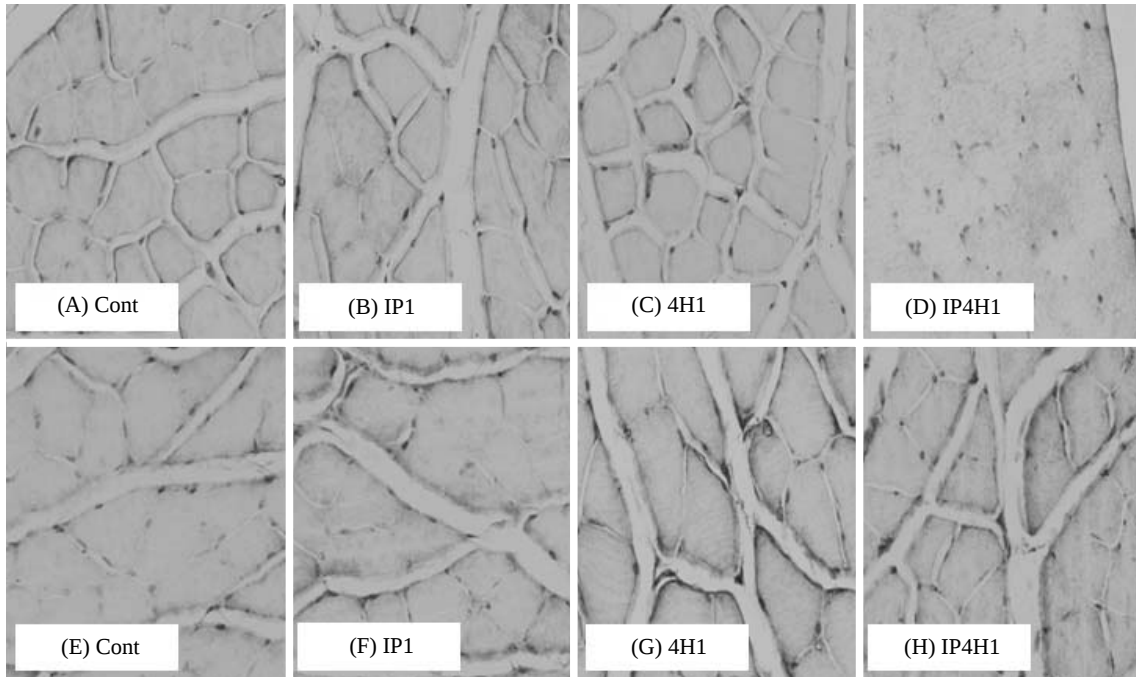


Fig. 1. Immunohistochemical staining of p-Akt in the rat skeletal muscles, 1 hour after ischemic preconditioning or ischemia. Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 1. The expression of p-Akt was in sarcolemma, sarcoplasm, and blood vessels. Intensity of p-Akt was mild or moderate in both Tibialis anterior (A ~ D) and Soleus (E ~ H). cont: control, IP: ischemic preconditioning, H: ischemia, IP4H: 4 hr ischemia with IP ($\times$ 400).

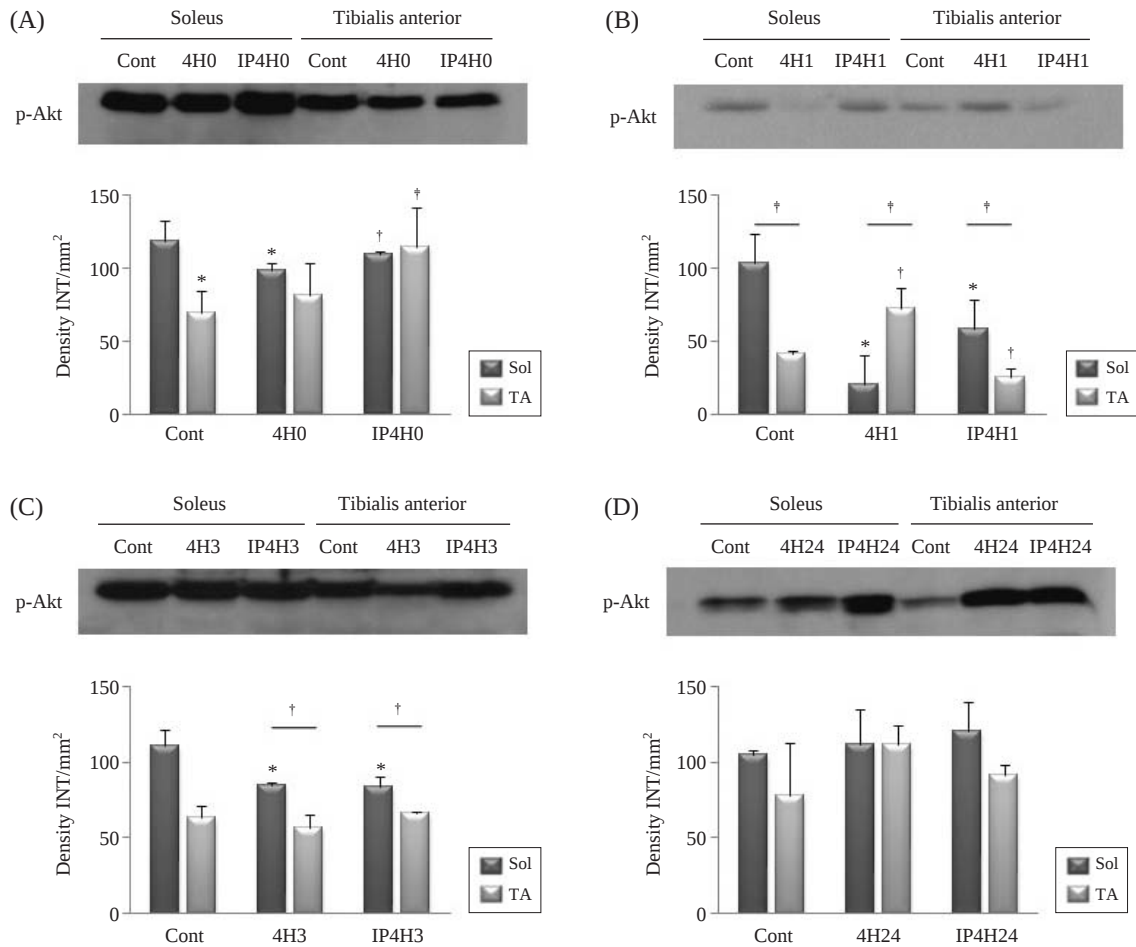


Fig. 2. Western blot analysis of p-Akt in rat skeletal muscles. A: 0 hr after IP. IP increased p-Akt compared to ischemia group ($p < 0.05$). *: $p < 0.05$ vs. cont of Sol, †: $p < 0.05$ vs. 4H in Sol, ‡: $p < 0.05$ vs. 4H in TA. B: 1 hr after IP. In Soleus, IP increased p-Akt compared to ischemia group ($p < 0.05$). *: $p < 0.05$ vs. cont in Sol, †: $p < 0.05$ vs. cont in TA, ‡: $p < 0.05$ Sol vs. TA. C: 3 hr after IP. *: $p < 0.05$ vs. cont in Sol, †: $p < 0.05$ Sol vs. TA. D: 24 hr after IP. Sol: Soleus, TA: Tibialis anterior, cont: control, IP: ischemic preconditioning, 4H: 4 hr ischemia, IP4H: 4 hr ischemia with IP.

1, Figs. 1, 2).

2) 허혈양상화군

허혈양상화 직후 앞정강근과 가자미근에서 p-Akt는 대조군보다 증가되었으나 재관류 시간이 경과됨에 따라 감소하였다(Fig. 1). p-Akt는 재관류 직후와 1시간, 3시간에는 앞정강근보다 가자미근에서 증가되었다(Table 1).

3) 허혈군

4시간 허혈 직후와 재관류 3시간까지, 앞정강근과 가자미근에서 p-Akt는 대조군과 비슷하거나 감소되었으나, 재관류 24시간에는 대조군 수준으로 회복되었다($p < 0.05$). p-Akt는 재관류 1시간을 제외하고는 앞정강근보다 가자미근에서 더 높게 관찰되었다(Table 1, Fig. 2).

4) 허혈양상화 및 허혈군

허혈양상화는 p-Akt를 허혈군보다 증가시켰다 (Table 1, Figs. 1, 2). 재관류 직후와 1시간에 p-Akt는 4시간 허혈군보다 증가되었으나 ($p < 0.05$), 대조군보다는 감소하였다 ($p < 0.05$, Fig. 2). p-Akt는 앞정강근보다 가자미근에서 더 많이 발현되었으나, 재관류 1시간 ($p < 0.05$)과 3시간 ($p < 0.05$)을 제외하고는 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

2. 허혈양상화가 허혈 후 SOD-1에 미치는 영향

1) 정상대조군

앞정강근과 가자미근에서 관찰된 SOD-1은 큰 차이가 없었다 (Table 2, Figs. 3, 4).

2) 허혈양상화군

허혈양상화는 앞정강근과 가자미근에서 SOD-1을

대조군보다 증가시켰고, SOD-1은 가자미근에서 앞정강근보다 높게 증가되었다 (Table 2, Fig. 3).

Table 2. Immunoreactivities of SOD-1 in the rat skeletal muscles, value determined by 3 observers were averaged and expressed as Mean $\pm$ S.D.

		Time of reperfusion (h)			
		0	1	3	24
TA	Cont	2.0 $\pm$ 0.8			
	IP	6.3 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 1.0
	4H	5.0 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 0.8	5.0 $\pm$ 0.8
	IP4H	5.3 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 1.0
SOL	Cont	2.3 $\pm$ 1.0			
	IP	7.3 $\pm$ 1.7	6.5 $\pm$ 1.3	6.3 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.8
	4H	3.0 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.5
	IP4H	11.3 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 1.0	5.8 $\pm$ 0.5

Abbreviations: TA: Tibialis anterior, SOL: Soleus, IP: ischemic preconditioning, 4H: ischemia for 4 hours, IP4H: ischemia for 4 hours after ischemic preconditioning

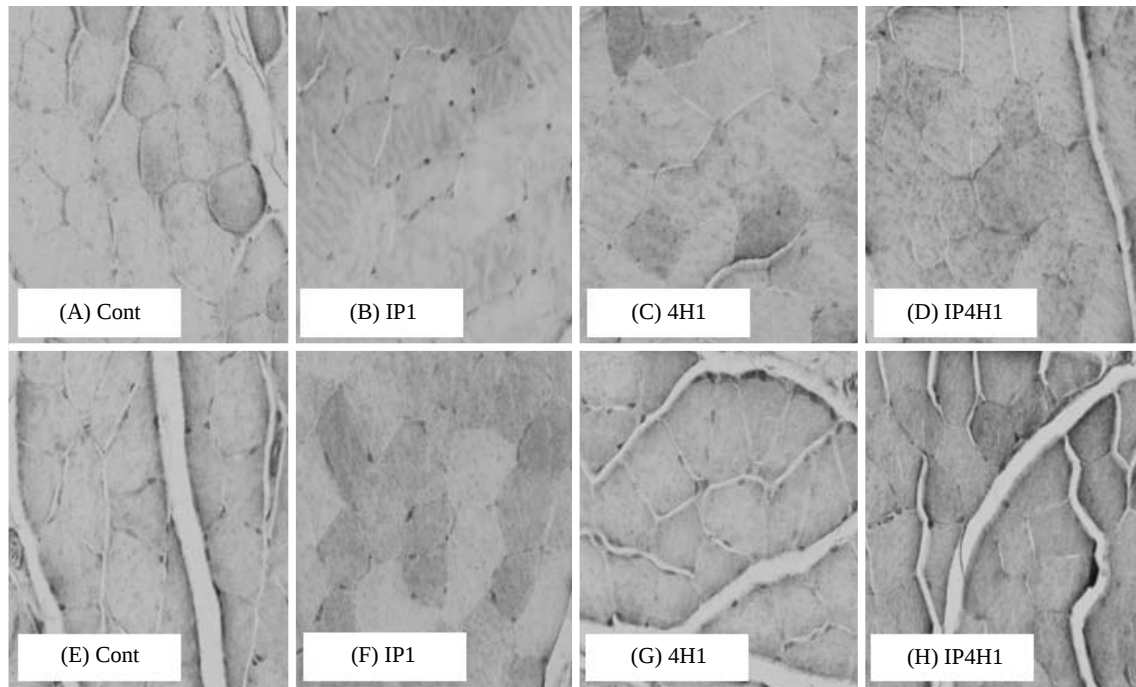


Fig. 3. Immunohistochemical staining of SOD-1 in the rat skeletal muscles, 1 hour after ischemic preconditioning or ischemia. Intensity of the immunoreactivities is shown in Table 2. The expression of SOD-1 was in sarcolemma and sarcoplasm. IP (D and H) increased SOD-1 compared to ischemia groups (C and G), and SOD-1 was stronger in Soleus (E ~ H), compared to Tibialis anterior (A ~ D). cont: control, IP: ischemic preconditioning, H: ischemia, IP4H: 4 hr ischemia with IP ($\times 400$).

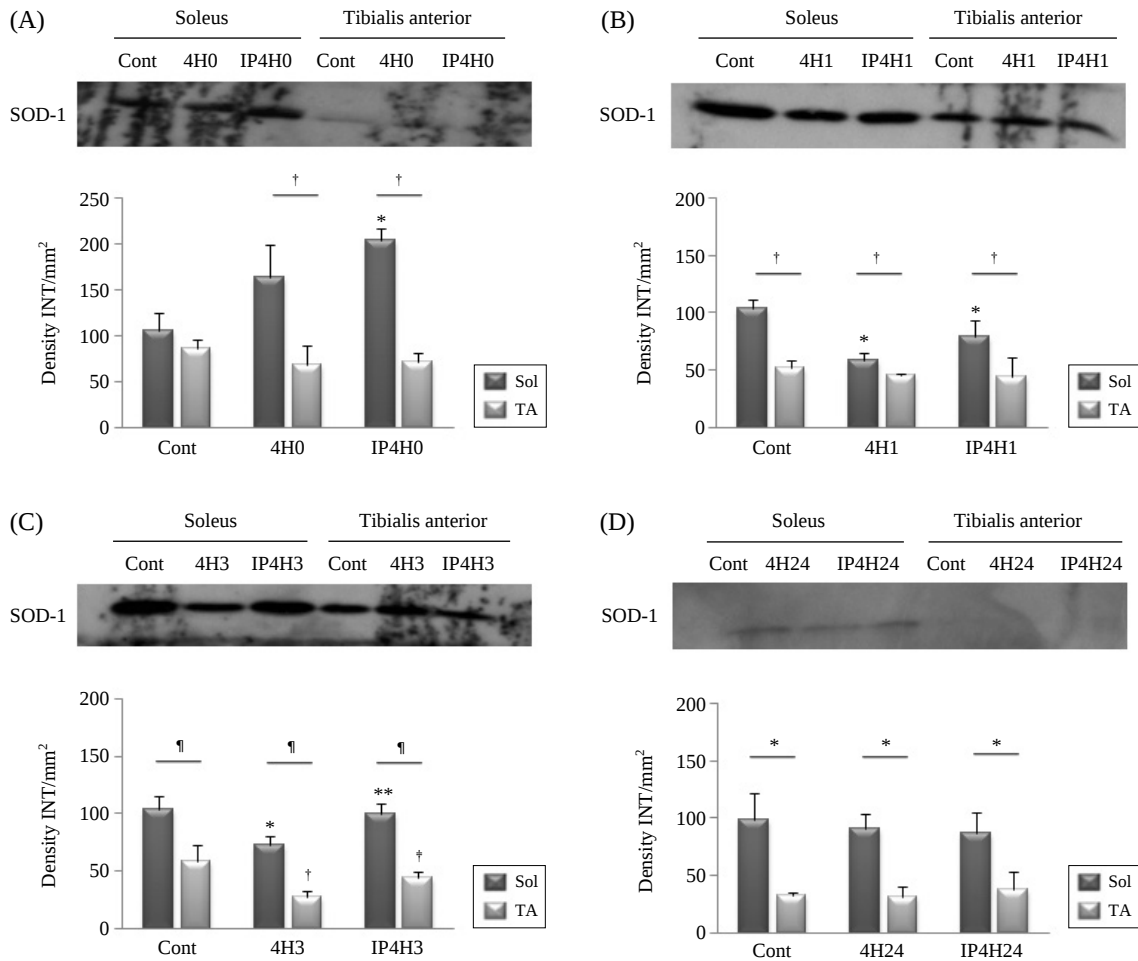


Fig. 4. Western blot analysis of SOD-1 in rat skeletal muscles. A: 0 hr after IP. In Sol, IP increased SOD-1 compared to ischemia group. *: $p < 0.05$ vs. cont in Sol, †: $p < 0.05$ Sol vs. TA. B: 1 hr after IP. *: $p < 0.05$ vs. cont in Sol, †: $p < 0.05$ Sol vs. TA. C: 3 hr after IP. *: $p < 0.05$ vs. cont in Sol, †: $p < 0.05$ vs. cont in TA, **: $p < 0.05$ vs. 4H in Sol, †: $p < 0.05$ vs. 4H in TA, ‡: $p < 0.05$ Sol vs. TA. D: 24 hr after IP. *: $p < 0.05$ Sol vs. TA. Sol: Soleus, TA: Tibialis anterior, cont: control, 4H: 4 hr ischemia, IP: ischemic preconditioning, IP4H: 4 hr ischemia with IP.

3) 허혈군

허혈군에서 SOD-1은 대조군보다 증가 또는 비슷한 수준으로 유지되었으나, 허혈양상화군보다 감소되었다. 앞정강근에서 SOD-1은 재관류 초기에, 가자미근에서는 재관류 3시간 이후에 증가되었다 (Table 2, Fig. 4).

4) 허혈양상화 및 허혈군

허혈양상화는 SOD-1을 허혈군보다 증가시켰으며,

SOD-1은 앞정강근보다 가자미근에서 증가되었다 (Table 2, Figs. 3, 4).

고 찰

허혈 및 재관류시 생성되는 산화질소와 초산소기 (superoxide anion)는 Akt (Ser 473)를 활성화시킨다 (Klotz 등 2000). Ushio-Fukai 등(1999)은 SD 흰쥐의

가슴대동맥 민무늬근육세포에 과산화수소를 처리하면 Akt 인산화(p-Akt)가 증가되며, 과산화수소 농도를 증가시키면 p-Akt도 증가된다고 하였다. 이들은 과산화수소 처리로 생성된 활성산소기가 Akt를 활성화시켜 민무늬근육세포를 보호한다고 하였다. 그러나, 과도한 과산화수소는 Akt 활성을 억제시킨다고 하였다. Matsui 등(2001)은 Akt 활성이 증가된 생쥐의 심장을 허혈시키면 대조군보다 세포자멸사가 적게 일어난다고 하였다. Markuns 등(1999)은 Akt 활성이 뼈대근육세포에서 당합성(glucose uptake) 및 당대사를 조절하여 세포를 보호한다고 하였고, Rommel 등(2001)은 뼈대근육의 증식에 Akt가 중요한 역할을 한다고 하였다.

뼈대근육은 구성된 근육섬유의 종류에 따라 허혈 손상의 정도가 다르다고 알려져 있다. 앞정강근은 당원대사를 이용하고 쉽게 피로해지는 백색근육섬유로, 가자미근은 산화대사를 이용하고 피로에 대한 저항력이 큰 적색근육섬유로 주로 이루어져 있다(Lindsay 등 1990). Woitaske와 McCarter (1998)는 허혈된 생쥐의 긴발가락편근이 가자미근보다 사립체와 근육원섬유 손상이 크며, 근육섬유의 종류가 허혈손상에 중요하다고 하였다. Seo 등(2003)은 4시간 허혈된 흰쥐 앞정강근에서 가자미근보다 세포자멸사가 더 증가된다고 하였다.

본 실험에서 앞정강근에서 p-Akt는 허혈양상화 직후 대조군과 비슷하게 관찰되어 재관류시간이 경과됨에 따라 감소하였다. 가자미근에서 p-Akt는 허혈양상화 후 재관류 3시간까지 증가한 뒤 감소되었다. 이는 허혈양상화 후 생성되는 활성산소기가 p-Akt를 증가시키며, 재관류 시간이 지나면서 활성산소기가 감소됨에 따라 p-Akt도 감소되는 것으로 생각된다. p-Akt는 가자미근보다 앞정강근에서 적게 관찰되었는데, p-Akt의 발현이 활성산소기의 양에 의존적이라는 Ushio-Fukai 등(1999)의 의견을 고려하면, 허혈양상화가 앞정강근에서 더 많은 활성산소기를 생성시킴으로 p-Akt의 발현이 적은 것으로 생각되었다.

4시간 허혈 직후 p-Akt는 대조군과 비슷하게 관찰되었고, 재관류 1시간에는 대조군보다 감소하였

다. 허혈 후 감소하였던 p-Akt는 재관류 3시간에 증가하여 24시간까지 대조군과 비슷하거나 증가되었다. 이는 뼈대근육세포를 손상시킬 수 있는 4시간의 허혈로 다량의 활성산소기가 생성되며, 이로 인해 재관류 초기에 p-Akt가 일시적으로 감소된 것으로 생각된다. 재관류시간이 지남에 따라 p-Akt가 증가하는 것으로 보아, 활성산소기가 감소되며 세포가 손상에서 회복된다고 생각할 수 있었다. Noshita 등(2003)은 생쥐 대뇌의 허혈중심부에서 p-Akt는 재관류 1시간부터 24시간까지 감소되나, 허혈손상이 상대적으로 적은 겉질에서는 감소되었던 p-Akt가 재관류 4시간에 다시 증가한다고 하였다. 이처럼 p-Akt는 대뇌의 허혈 구역에 따라 차이가 있는데, 이는 허혈 자극의 강도와 손상정도에 따라 Akt 인산화가 다르게 나타날 수 있다는 것을 시사한다. Kelly 등(1994)도 활성산소기가 전사인자 등을 활성화시키는 신호전달자의 역할을 하나, 과도한 활성산소기는 세포에 해롭게 작용한다고 하였다. 허혈 후 재관류 초기에 앞정강근보다 가자미근에서 p-Akt가 더 증가되었고 대조군과 비슷한 수준으로 관찰된 것으로 보아 가자미근이 앞정강근보다 허혈에 대해 내성을 갖는 것으로 생각할 수 있었다.

Tong 등(2000)은 허혈양상화가 허혈된 흰쥐의 심실기능 회복과 p-Akt를 증가시킨다고 하였고, 허혈양상화 보호효과에 Akt가 중요한 역할을 한다고 하였다. Schroeder 등(1996)은 허혈양상화가 1시간 허혈된 흰쥐 긴발가락편근의 수축력과 ATP를 증가시킨다고 하였다. Mattei 등(2000)도 허혈양상화가 뼈대근육의 허혈손상을 감소시킨다고 하였다.

본 실험에서 허혈양상화는 허혈 직후 p-Akt를 허혈군보다 증가시켰다. 허혈양상화가 허혈 후 p-Akt를 증가시켜 허혈손상을 감소시켜 준다는 Mocanu 등(2002)과 Kis 등(2003) 그리고 Tong 등(2000)의 실험결과를 고려하면, 본 실험에서 허혈양상화로 증가된 p-Akt가 허혈손상을 감소시킬 것으로 생각되었다. 또한 앞정강근보다 가자미근에서 p-Akt가 빠르게 증가하고, 발현이 많이 되는 것으로 보아 앞정강근보다 허혈양상화의 보호효과가 더 효과적일 것으로 생각된다.

한편, SOD는 초산소기를 물과 산소분자로 전환시키는 항산화효소로, CuZn-SOD (SOD-1)와 Mn-SOD (SOD-2), extracellular SOD (EC-SOD)가 알려져 있다. Noshita 등(2003)은 SOD-1이 지속적으로 발현되는 생쥐의 대뇌를 허혈하면 대조군보다 신경세포의 세포자멸사가 적게 관찰되며, 재관류 초기에 p-Akt가 빠르게 증가된다고 하였다. Wang 등(1998)도 SOD-1이 발현되는 생쥐의 심장을 허혈시키면 대조군보다 경색의 크기가 감소하며, ATP가 2.1배 증가된다고 하였다.

SOD-1이 활성산소기를 제거하고 생성을 억제시킬 수 있으며, 대뇌나 심장에서 허혈손상을 감소시킨다는 여러 실험결과를 고려하면, 본 실험에서 허혈양상화를 함께 실시한 허혈군에서 허혈군보다 SOD-1이 증가된 것은 뼈대근육에서도 허혈양상화가 허혈 후 SOD-1을 증가시키며, 이로 인해 세포손상이 감소될 것이라 생각하였다. 또한 SOD-1이 더 많이 증가된 가자미근에서 허혈손상이 적을 것이라 생각된다. 허혈양상화만 시행한 가자미근에서는 p-Akt가 앞정강근보다 감소된 것으로 관찰되었는데, 이는 SOD-1이 더 많이 분포하는 가자미근에서 활성산소기가 적게 생성되고 빨리 제거되므로 p-Akt가 적게 관찰된다고 생각되었다. 또한 허혈 직후 앞정강근에서 p-Akt가 증가된 것도 이와 같은 이유로 설명할 수 있다.

허혈양상화는 허혈된 가자미근에서 p-Akt와 SOD-1을 허혈군보다 증가시켰으며, p-Akt와 SOD-1은 앞정강근보다 높게 관찰되었다. 또한 p-Akt와 SOD-1은 재관류 직후 증가되어 3시간까지 높게 유지되었는데, 뼈대근육의 허혈손상이 재관류 3시간에 시작되어 재관류 6시간에 대부분 끝난다는 Blaisdell (2002)의 의견을 고려하면 재관류 초기에 높게 유지되었던 Akt와 SOD-1이 초기에 주로 일어나는 허혈손상에 대해 효과적으로 작용할 것이라고 생각된다.

이상의 실험결과로, 흰쥐의 뼈대근육에서 허혈양상화는 허혈 후 재관류시 나타나는 p-Akt와 SOD-1의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 이러한 허혈양상화 효과는 백색근육인 앞정강근보다 적색근육인 가자미근에서 더 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. 앞으로 DNA 분절이나 세포자멸사를 확인하

여 Akt와 SOD-1의 증가가 세포손상에 직접적으로 어떤 영향을 주는지 확인하고, Akt 신호전달의 아래 경로인 Bad와 허혈손상을 감소시키는 eNOS 등에 대한 실험을 계속하여 허혈양상화가 뼈대근육에서 어떤 보호효과를 유도하는지 더 연구해야 될 것이라고 생각하였다.

참 고 문 헌

- Blaisdell FW : The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 10: 620-630, 2002.
- Das DK, Maulik N : Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signaling into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 15: 305-311, 2003.
- 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.
- 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.
- Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook NJ : Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J* 352: 219-225, 2000.
- Krishna MC, DeGraff W, Hankovszky OH, Sar CP, Kalai T, Jeko J, Russo A, Mitchell JB, Hideg K : Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. *J Med Chem* 41: 3477-3492, 1998.
- 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.
- Markuns JF, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ : Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by differ-

- ent mechanisms in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 274: 24896-29900, 1999.
- Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A : Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104: 330-335, 2001.
- Mattei A, Sutter PM, Marx A, Stierli P, Heberer M, Gurke L : Preconditioning with short cycles improves ischemic tolerance in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Eur Surg Res* 32: 297-304, 2000.
- 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.
- 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.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ : Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3: 1009-1013, 2001.
- Scheid MP, Duronio V : Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7439-7444, 1998.
- Schroeder CA Jr, Lee HT, Shah PM, Babu SC, Thompson CI, Belloni FL : Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscle from ischemic tissue reperfusion injury. *J Surg Res* 63: 29-34, 1996.
- 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)
- Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E : Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 87: 309-315, 2000.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending 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.
- 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.
- Woitasko MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 102: 2052-2063, 1998.

Abstract

**Effects of Ischemic Preconditioning on the Phosphorylation
of Akt and the Expression of SOD-1
in the Ischemic-reperfused Rat Skeletal Muscles**

Youn-Kyoung Seo, Doo-Jin Paik

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

Akt, a key protein of cell survival, can promote cell growth and survival by activations of various cellular protective factors. Ischemic preconditioning (IP) has been known to reduce ischemic injury through upregulation of phosphorylation of Akt (p-Akt). CuZn-superoxide dismutase (SOD-1), an antioxidant enzyme, scavenges reactive oxygen species and protects cell from oxidative stress by increasing the activation of Akt.

The present study was performed to examine the effects of IP on the expression of p-Akt and SOD-1 in the ischemic-reperfused rat skeletal muscles.

Thirty weeks old male SD rats were divided into 4 groups, such as controls, IP, 4 hour ischemia and 4 hour ischemia with IP. For IP, common iliac artery was occluded three times for 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion using rodent vascular clamps. Ischemia was induced by occlusion on the same artery for 4 hours. The Tibialis anterior and Soleus were removed at 0, 1, 3, and 24 hours of reperfusion. The expressions of p-Akt (Ser 473) and SOD-1 were examined with immunohistochemistry and Western blot analysis.

In the IP group, the p-Akt and SOD-1 were increased, compared to the control group. In the ischemia group, the p-Akt and SOD-1 were decreased, compared to the control group, and were more abundant when reperfusion time were increased. IP increased the p-Akt and SOD-1 after 4 hour ischemia, and the p-Akt and SOD-1 were higher in Soleus compared to Tibialis anterior.

These findings suggest that IP increases p-Akt and expression of SOD-1 in the ischemic-reperfused rat skeletal muscles, and that upregulations of p-Akt and SOD-1 induced by IP were higher in the red muscle fiber, Soleus, than the white muscle fiber, Tibialis anterior.

Key words : Ischemic preconditioning, Ischemia, Tibialis anterior, Soleus, Akt, SOD-1