

## 2시간 허혈 후 재관류 시점에 따른 흰쥐의 혈청 및 장딴지근의 친염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 변화

김신영

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

(2014년 5월 25일 접수, 2014년 6월 23일 수정접수, 2014년 6월 26일 게재승인, Published Online 30 June 2014)

**간추림** : 본 연구는 허혈 후 재관류 시점에 따라 혈청과 뼈대근육에서 나타나는 친염증성 및 항염증성 사이토카인(pro- and anti-inflammatory cytokine)의 변화 양상을 비교 분석하여 뼈대근육의 허혈 후 재관류 시점에 따라 나타나는 염증성 반응의 변화와 이를 대표할 수 있는 표지인자를 확인하는 데 목적이 있다.

실험동물은 12주령 ICR계 수컷 생쥐를 사용하여 대조군과 허혈 후 재관류 시간에 따라 재관류 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24시간군으로 분류하였고, 허혈 처치는 왼은엉덩동맥(left common iliac artery)을 2시간 동안 혈관집게로 차단하였다. 재관류 시간경과에 맞추어 실험동물을 마취시킨 후 심장의 오른 심방에서 채취한 혈액의 혈청과 장딴지근 조직액에서 친염증성 사이토카인(Eotaxin, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, TCA-3)과 항염증성 사이토카인(IL-4, IL-10)의 변화를 확인하기 위하여 ELISA 분석을 시행하였다.

연구결과 허혈 후 재관류 시점에 따른 친염증성 사이토카인의 발현은 뼈대근육 내 재관류 0시간군에서, 혈청에서는 대조군과 재관류 0, 1, 2, 4, 8, 16시간군에서 사이토카인들 사이의 발현양의 차이가 유의한 것으로 관찰되었고( $p < .05$ ), 항염증성 사이토카인의 발현은 혈청 내 재관류 4시간군에서 사이토카인들 사이의 발현양의 차이가 유의한 것으로 관찰되었다( $p < .05$ ). 또한 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이는 재관류 시간은 친염증성 사이토카인에서는 혈청 내 재관류 2, 4, 16시간군이었고, 항염증성 사이토카인에서는 혈청 내 재관류 4시간군이였다( $p < .05$ ).

본 연구를 토대로 허혈 후 사이토카인들의 변화 양상은 재관류 시점에 따라 뼈대근육보다는 혈청에서 발현양의 차이가 유의하게 나타났으며, 특히 혈청에서 재관류 4시간군에 관찰되는 IL-6와 재관류 16시간군에 관찰되는 MCP-1은 다른 사이토카인보다 유의하게 높은 농도를 보임에 따라 친염증성 사이토카인을 대표하는 표지인자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

**찾아보기 낱말** : 허혈, 재관류, 친염증성 사이토카인, 항염증성 사이토카인

### 서 론

허혈 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)은 다양한 기전을 수반한 급성 염증반응의 결과로, 주로 허혈 기간에 따라 재관류 시 조직에서 발생되며 이때 발생하는 생리적, 생화학적, 면역학적 변화는 국소조직에 영향

을 줄 뿐만 아니라 계통 전체에도 영향을 주게 된다[1].

허혈 재관류 손상의 주된 원인인 활성산소기(reactive oxygen species)는 세포의 신호전달과정에 중요한 전사인자 역할을 하는 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)를 활성화시켜 염증 매개인자인 부착분자 및 사이토카인의 분비를 조절하는 역할을 한다[2].

허혈 손상 후 초기단계에서 활성화되는 친염증성 사이토카인은 면역반응 및 염증반응을 유발하고 과잉 축적 시 조직의 손상을 초래한다. 친염증성 사이토카인에는 Eotaxin, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, TCA-3 등이

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.  
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.  
교신저자: 김신영(한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)  
전자우편: 72shin02@hanmail.net

있으며 이들은 조직의 손상과 병변 발생 시 염증매개물질들을 활성화시켜 염증반응을 증진 및 지속시키는 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[3-5]. 항염증성 사이토카인에는 IL-4와 IL-10 등이 있으며 친염증성 사이토카인의 생성과 유리를 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 친염증성 사이토카인의 발생과 더불어 항염증성 사이토카인의 발생이 유도되며 이들의 균형은 염증의 진행 혹은 완화에 중요한 역할을 한다. 조직의 손상은 결국 친염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 균형이 깨지고 조직 내에 친염증성 사이토카인이 증가될 때 발생된다[8]. 또한 조직 내에 증가된 사이토카인은 조직뿐만 아니라 말초 혈액 내에 순환하며 직접 통증반응을 증가시키거나 중추신경계통의 사이토카인을 증가시키는 자극 역할을 하게 된다[9].

사이토카인은 다양한 임상적 상황에서 통증을 동반한 기관의 염증반응 및 손상의 정도를 파악할 수 있는 중요한 표지인자로 주목 받고 있으며 특히 혈액 및 조직 내 사이토카인의 농도는 질병의 존재여부뿐만 아니라 치료 여부를 판단할 수 있는 중요한 근거로 인식되어 왔다[10,11]. 그러나 허혈 후 재관류 시점에 따른 사이토카인의 변화에 관한 연구는 여전히 미흡한 실정이며 특히, 어떤 재관류 시점에 가장 높은 염증반응 양상을 나타내는지에 관한 기초자료는 매우 부족하다.

이에 본 연구자는 허혈 후 재관류 시간에 따라 친염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 변화양상을 뼈대근육과 혈청 내에서 비교 분석하여 염증성 반응을 대표할 수 있는 표지인자와 이들이 증가 또는 감소한 재관류 시점을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

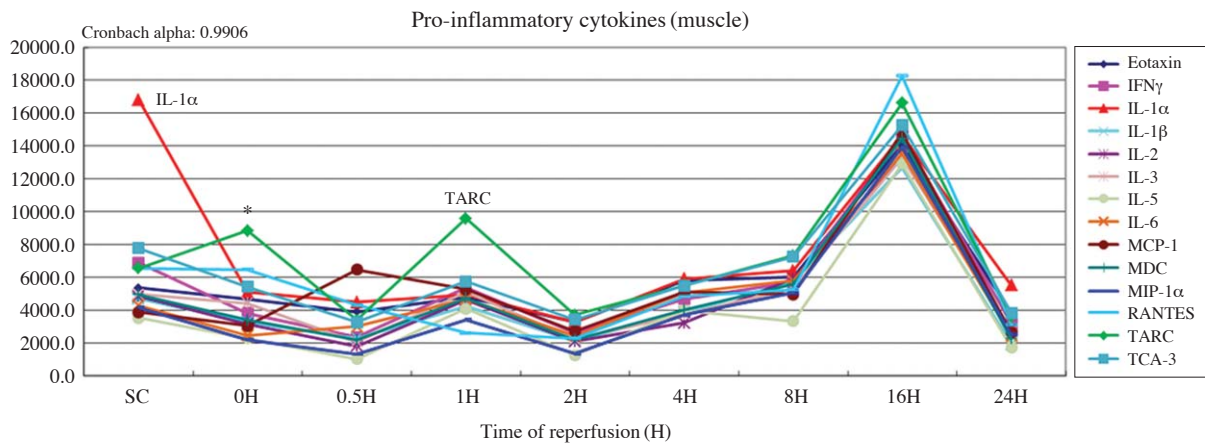
### 1. 재료

실험동물은 12주령 ICR계 수컷 생쥐를 사용하였다. 8주령 생쥐를 (주)오리엔트 바이오에서 구입한 후 한양대학교 특정병원성미생물부재 (SPF) 실험 동물실에서 사료와 물을 공급받으며 4주간 사육하였다. 사육된 건강한 실험동물을 대조군(Sham control), 허혈 후 재관류 시간에 따라 재관류 0시간군, 0.5시간군, 1시간군, 2시간군, 4시간군, 8시간군, 16시간군, 24시간군으로 분류하였다. 각 군당 8마리의 실험동물을 사용하였으며 실험 후 생존한 생쥐 중 무작위순서대로 6마리를 선택하였다.

### 2. 방법

#### 1) 허혈-재관류 방법 및 실험동물 처치

실험동물은 Zoletil® (Virbac, France), Rompun® (Bayer, Korea), 생리식염수를 1:1:8의 비율로 혼합한 후 체중 10g당 0.1mL를 복강 내 주사하여 마취시켰다. 마취가 확인된 실험동물의 복부 털을 제거하고 복벽을 절개한 뒤, 원온영덩동맥을 노출시킨 후 생쥐용 혈관집계를 사용하여 2시간 동안 허혈시켰다. 허혈 처치 동안 과다출혈 및 근육괴사가 있는 부적절한 실험동물은 실험에서 제외시켰다. 허혈 2시간 후 혈관집계를 제거하여 혈류가 재관류되는지 발바닥 색깔을 육안으로 관찰한 뒤 절개된 배의 피부를 봉합하였다. 재관류 0시간, 0.5시간, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간, 24시간에 맞추어 실험동물들을 마취시킨 후 심장의 오른 심방에서 혈액을



**Fig. 1.** The changes of pro-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle. Data are presented as mean (pg/mL). SC : Sham control, H : hour reperfusion after ischemia, \* : p<0.05; The difference in the pro-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing.

채취하고 이후 경추탈골로 희생시켜 장딴지근(gastrocnemius m.)을 적출하였다. 적출한 근육은 액화질소를 이용하여 곧바로 얼린 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 대조군은 허혈군과 동일한 방법으로 2시간 마취 후 복벽을 절개하고 허혈처치 없이 희생시켰다.

## 2) 혈액과 조직 준비

적출한 근육조직은 액화질소와 함께 잘게 부순 후,

인산 완충액 (WEL GEN, Korea)과 단백질 분해효소 억제제 (SIGMA-ALDRICH, USA)를 1 : 100 비율로 혼합한 용해 완충액 (lysis buffer)을 근육조직 1 g당 3 mL씩 첨가하였다.

균질기 (Janke & Kunkel, IKA-Labtechnik, Germany)를 이용하여 얼음 위에서 13,500 rpm으로 10초씩 2회 균질화시키고, 40분 동안 균질액을 얼음 속에 보관한 뒤 원심분리기 (MICRO17TR, Hanil Science Industrial Co.,

**Table 1.** The changes of pro-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (unit: pg/mL)

Muscle	SC (n=6)	0H (n=6)	0.5H (n=6)	1H (n=6)	2H (n=6)	4H (n=6)	8H (n=6)	16H (n=6)	24H (n=6)
Eotaxin	5355.8 $\pm$ 3605.3	4645.7 $\pm$ 2524.1	3891.6 $\pm$ 1867.1	4788.4 $\pm$ 3064.8	3272.7 $\pm$ 645.3	5814.7 $\pm$ 3583.2	5994.3 $\pm$ 3557.1	14080.5 $\pm$ 7928.0	3803.3 $\pm$ 1166.2
IFN $\gamma$	6865.8 $\pm$ 6098.5	3800.0 $\pm$ 2718.3	2355.4 $\pm$ 2023.2	5373.4 $\pm$ 6012.4	2611.7 $\pm$ 1115.8	4676.8 $\pm$ 3564.7	5713.7 $\pm$ 3947.3	14601.8 $\pm$ 9264.1	3174.2 $\pm$ 1807.8
IL-1 $\alpha$	16816.3 $\pm$ 17432.4	5098.5 $\pm$ 3141.1	4481.0 $\pm$ 3170.5	4921.8 $\pm$ 2964.2	3283.0 $\pm$ 1318.7	5891.0 $\pm$ 4175.0	6404.0 $\pm$ 3824.9	14649.8 $\pm$ 9078.3	5511.0 $\pm$ 3858.6
IL-1 $\beta$	4706.3 $\pm$ 3627.1	3287.3 $\pm$ 3129.7	2289.2 $\pm$ 1689.0	4218.6 $\pm$ 3299.2	2158.5 $\pm$ 818.8	3849.3 $\pm$ 3348.7	5756.0 $\pm$ 4672.0	12690.8 $\pm$ 7779.5	1910.0 $\pm$ 1436.8
IL-2	4826.3 $\pm$ 4332.7	3141.7 $\pm$ 3313.5	1802.2 $\pm$ 1451.9	4611.6 $\pm$ 4485.0	2089.0 $\pm$ 973.2	3213.5 $\pm$ 2567.8	5914.5 $\pm$ 4563.0	13434.2 $\pm$ 9169.1	2683.8 $\pm$ 1893.9
IL-3	4968.5 $\pm$ 3698.9	4424.5 $\pm$ 3193.3	2062.0 $\pm$ 1574.6	5104.0 $\pm$ 5118.1	2218.0 $\pm$ 762.6	3749.5 $\pm$ 2749.8	5299.3 $\pm$ 3796.2	13310.0 $\pm$ 8435.3	2671.7 $\pm$ 1426.4
IL-5	3525.0 $\pm$ 2882.8	2271.7 $\pm$ 2655.6	1025.2 $\pm$ 623.8	4090.8 $\pm$ 4531.9	1245.0 $\pm$ 724.4	3979.2 $\pm$ 4424.1	3314.5 $\pm$ 2391.3	12903.2 $\pm$ 9161.9	1715.3 $\pm$ 1064.7
IL-6	4293.0 $\pm$ 3366.6	2458.2 $\pm$ 3446.3	3003.8 $\pm$ 2392.6	4682.8 $\pm$ 4720.9	2460.2 $\pm$ 1470.9	5057.8 $\pm$ 4411.4	5803.3 $\pm$ 4423.2	13557.7 $\pm$ 9218.8	2399.8 $\pm$ 1606.4
MCP-1	3877.5 $\pm$ 2995.5	3031.3 $\pm$ 1631.4	6456.2 $\pm$ 9065.4	5273.6 $\pm$ 4226.8	2713.2 $\pm$ 406.7	5091.8 $\pm$ 3260.4	4964.5 $\pm$ 3287.7	14797.5 $\pm$ 9430.7	2620.5 $\pm$ 1776.5
MDC	4943.5 $\pm$ 3968.0	3398.0 $\pm$ 2629.3	2175.8 $\pm$ 1860.5	4727.2 $\pm$ 4796.8	2185.2 $\pm$ 938.9	4001.2 $\pm$ 3349.2	5567.3 $\pm$ 4238.2	14466.0 $\pm$ 9659.9	2228.2 $\pm$ 1427.9
MIP-1 $\alpha$	4153.0 $\pm$ 3537.4	2183.2 $\pm$ 2285.9	1313.0 $\pm$ 756.2	3421.0 $\pm$ 4229.7	1347.3 $\pm$ 1021.9	3700.8 $\pm$ 4691.1	5048.8 $\pm$ 3519.2	13940.0 $\pm$ 9999.1	2526.0 $\pm$ 1446.2
RANTES	6550.8 $\pm$ 4359.9	6459.0 $\pm$ 4012.9	4301.8 $\pm$ 4296.5	2614.4 $\pm$ 2439.4	2285.2 $\pm$ 1640.8	4819.0 $\pm$ 5363.7	5249.7 $\pm$ 4499.8	18274.3 $\pm$ 13564.0	3127.7 $\pm$ 1328.4
TARC	6550.5 $\pm$ 1098.3	8837.0 $\pm$ 3236.4	3392.0 $\pm$ 2107.3	9583.2 $\pm$ 9939.9	3705.7 $\pm$ 3526.0	5500.2 $\pm$ 5482.8	7313.0 $\pm$ 7885.9	16623.7 $\pm$ 9041.6	3607.2 $\pm$ 2112.1
TCA-3	7780.3 $\pm$ 7018.2	5420.3 $\pm$ 3929.3	3249.2 $\pm$ 1653.6	5736.8 $\pm$ 5618.3	3421.0 $\pm$ 2068.7	5484.8 $\pm$ 5201.8	7240.5 $\pm$ 5912.8	15257.8 $\pm$ 10769.0	3827.5 $\pm$ 2641.2
p-value <sup>1)</sup>	0.9867	<b>*0.0067</b>	0.1112	0.9126	0.0696	0.6933	0.9463	0.9980	0.2650
p-value <sup>2)</sup>		0.8682	0.7724	0.5444	0.5684	0.6854	0.5576	0.3954	0.9190

SC : Sham control, H : hour reperfusion after ischemia

IL : interleukin, INF $\gamma$  : interferony, MDC : macrophage derived chemokine

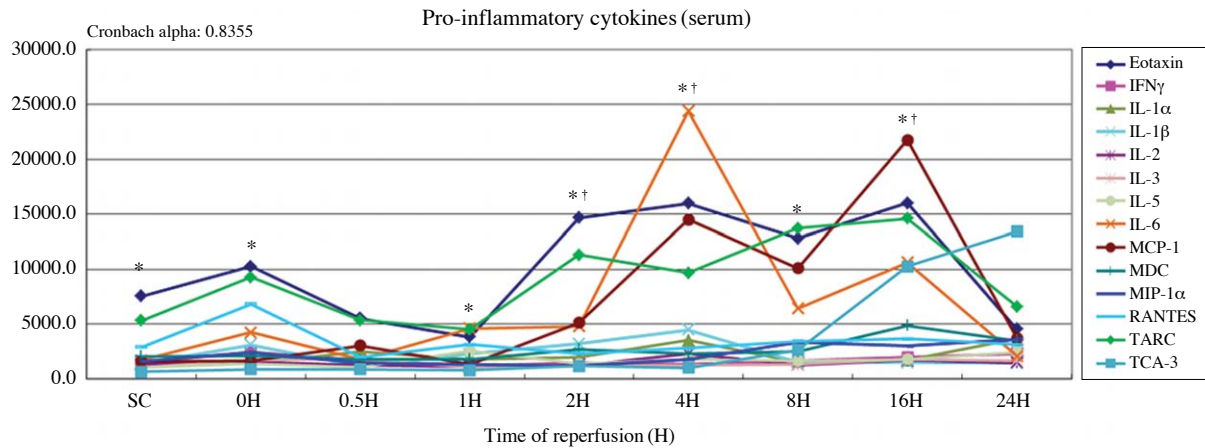
MIP-1 $\alpha$  : macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

TCA-3 : T-cell activation protein-3, TARC : thymus and activation regulated chemokine

RANTES : regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

p-value<sup>1)</sup> : The difference in the pro-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing. Kruskal-Wallis test used. \* : p < 0.05.

p-value<sup>2)</sup> : Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group. Repeated Measured ANOVA test used. † : p < 0.05.



**Fig. 2.** The changes of pro-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the serum. Data are presented as mean (unit: pg/mL). H : hour reperfusion after ischemia, SC : Sham control, \* :  $p < 0.05$ ; The difference in the pro-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing. † :  $p < 0.05$ ; Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group.

Korea)를 이용하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 수집하였다. 혈액은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 7,500 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상층액인 혈청만을 모아 분석 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3) 효소결합면역흡착분석법 (ELISA)

ELISA kit (Q-Plex™ Array, Quansysbio, USA)를 사용하여 뼈대근육과 혈청에서 나타나는 사이토카인을 분석하였다. 실험 절차는 제공된 시약과 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다.

혈청표본을 사이토카인에 특이 반응하도록 처리된 미량역가판 (microtiter plate)의 각 웰 (well)에  $50\ \mu\text{L}$ 씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 교반기 (plate shaker)에서 반응시켰다. 3회 세척 후 각 웰에 검출혼합용액  $50\ \mu\text{L}$ 씩을 분주하고 실온에서 1시간 동안 교반기에서 반응시켰다. 3회 세척 후 Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase)용액  $50\ \mu\text{L}$ 씩을 분주하고 실온에서 15분 동안 교반기에서 반응시켰다. 다시 6회 세척 후 제공된 물질 (substance) A와 물질 B 용액을 자외선을 차단한 상태에서 각각  $3\ \text{mL}$ 씩 혼합하였다.

혼합한 기질 (substrate)을 각 웰에  $50\ \mu\text{L}$ 씩 분주하고 15분 안에 판영상 (plate image)을 ChemiDoc XRS Plus System (Bio-Rad, USA)으로 촬영하였다.

촬영된 결과의 표준곡선 및 데이터 용량은 Q-Plex™ SOFTWARE (Quansysbio, USA)로 분석하였다.

### 4) 통계분석

친염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 통계 분석을 위하여 SAS 9.2 version을 사용하였다. 허혈 후 재관류 시점에 따른 사이토카인들의 내적 일관성을 알

아보기 위하여 Cronbach's alpha 분석을 하였다. 동일한 재관류 시점에서 사이토카인의 농도 사이의 차이는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석하였고, 대조군과 비교한 재관류 시점별 사이토카인의 차이는 Repeated Measured ANOVA test를 이용하여 분석하였다. Cronbach's alpha 값은  $0 \sim 1$ 로,  $\alpha \geq 0.9$  매우 높음 (excellent),  $0.7 \leq \alpha < 0.9$  높음 (good),  $0.6 \leq \alpha < 0.7$  보통 (acceptable),  $0.5 \leq \alpha < 0.6$  관계 적음 (poor),  $\alpha < 0.5$  관계없음 (unacceptable)으로 해석하였다. 분석을 통해 얻은 모든 결과 값은 평균 (mean)과 표준편차 (S.D)로 나타내었고, 통계적 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 정하였다.

## 결 과

### 1. 친염증성 사이토카인

본 실험에서 친염증성 사이토카인에 해당하는 것은 Eotaxin,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-3}$ ,  $\text{IL-5}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{MDC}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{RANTES}$ ,  $\text{TARC}$ ,  $\text{TCA-3}$ 이다.

허혈 후 재관류 시점에 따른 뼈대근육 내 친염증성 사이토카인의 변화 양상은 유사하게 나타났다 (Cronbach's alpha : 0.9905, Fig. 1). 재관류 0시간군에서는 사이토카인의 농도사이의 차이가 유의한 것으로 나타났고 ( $p < 0.05$ , Table 1). 대조군과 비교한 재관류 시점별 사이토카인의 차이는 통계적 유의성은 없었으나  $\text{IL-1}\alpha$ 를 제외한 모든 사이토카인들이 재관류 16시간군에서 가장 높게 증가되었다가 24시간군에서 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

허혈 후 재관류 시점에 따른 혈청 내 친염증성 사이

**Table 2.** The changes of pro-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the serum. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (unit: pg/mL)

Serum	SC (n=6)	0H (n=6)	0.5H (n=6)	1H (n=6)	2H (n=6)	4H (n=6)	8H (n=6)	16H (n=6)	24H (n=6)
Eotaxin	7542.0 $\pm$ 2899.2	10243.4 $\pm$ 4024.0	5505.7 $\pm$ 3210.0	3820.8 $\pm$ 1963.7	14658.5 $\pm$ 8776.2	15972.2 $\pm$ 6749.7	12796.8 $\pm$ 6053.1	15991.5 $\pm$ 16850.5	4537.0 $\pm$ 2751.0
IFN $\gamma$	1512.0 $\pm$ 686.2	2438.6 $\pm$ 3444.6	1727.7 $\pm$ 1429.7	1171.5 $\pm$ 1182.8	1446.7 $\pm$ 851.5	1322.2 $\pm$ 593.1	1621.0 $\pm$ 1003.2	1933.0 $\pm$ 865.7	2317.4 $\pm$ 1874.9
IL-1 $\alpha$	1345.2 $\pm$ 488.0	1404.0 $\pm$ 818.3	2488.3 $\pm$ 2763.7	1797.2 $\pm$ 1318.8	1952.5 $\pm$ 805.9	3520.7 $\pm$ 1883.9	1528.0 $\pm$ 995.1	1692.5 $\pm$ 383.9	3632.8 $\pm$ 4797.0
IL-1 $\beta$	1401.8 $\pm$ 541.6	3100.0 $\pm$ 4161.4	1129.3 $\pm$ 269.0	2265.7 $\pm$ 1667.6	3197.5 $\pm$ 2246.6	4467.5 $\pm$ 3739.7	1514.2 $\pm$ 653.0	1506.5 $\pm$ 817.6	1415.0 $\pm$ 861.0
IL-2	1283.8 $\pm$ 455.4	1517.8 $\pm$ 1519.5	1255.3 $\pm$ 894.5	1100.2 $\pm$ 543.8	1194.0 $\pm$ 257.9	2266.5 $\pm$ 1527.8	1267.2 $\pm$ 453.6	1676.0 $\pm$ 349.3	1463.2 $\pm$ 1109.8
IL-3	1050.6 $\pm$ 415.3	1681.2 $\pm$ 2252.2	1772.5 $\pm$ 2375.6	1039.5 $\pm$ 1017.0	1163.5 $\pm$ 505.4	1223.7 $\pm$ 316.2	1299.4 $\pm$ 763.0	1742.2 $\pm$ 496.1	1665.0 $\pm$ 1445.4
IL-5	1053.0 $\pm$ 216.1	1355.6 $\pm$ 1226.2	1026.7 $\pm$ 595.2	2533.0 $\pm$ 3548.5	1371.2 $\pm$ 411.7	1743.2 $\pm$ 773.4	1663.0 $\pm$ 550.7	1785.2 $\pm$ 513.0	2449.4 $\pm$ 1810.5
IL-6	1682.6 $\pm$ 656.0	4246.2 $\pm$ 6621.1	1780.3 $\pm$ 1000.6	4579.3 $\pm$ 6700.8	4798.0 $\pm$ 1661.5	24400.7 $\pm$ 23397.2	6437.2 $\pm$ 3430.9	10598.3 $\pm$ 14229.4	2087.4 $\pm$ 1637.4
MCP-1	1586.8 $\pm$ 911.9	1617.4 $\pm$ 1360.3	3012.2 $\pm$ 2879.2	1329.0 $\pm$ 1263.7	5114.3 $\pm$ 4899.8	14502.3 $\pm$ 11530.0	10089.8 $\pm$ 11807.5	21765.5 $\pm$ 13875.0	3717.0 $\pm$ 2475.1
MDC	2040.2 $\pm$ 812.8	2093.4 $\pm$ 1074.4	1766.8 $\pm$ 1645.1	1776.5 $\pm$ 1413.5	2702.5 $\pm$ 1694.9	2291.5 $\pm$ 944.6	2483.2 $\pm$ 819.2	4868.8 $\pm$ 2084.3	3495.0 $\pm$ 1780.5
MIP-1 $\alpha$	1580.0 $\pm$ 798.4	2398.0 $\pm$ 3295.3	1423.3 $\pm$ 980.1	1317.7 $\pm$ 1058.9	1164.5 $\pm$ 461.1	1780.8 $\pm$ 668.0	3327.4 $\pm$ 4239.6	2990.3 $\pm$ 597.9	3608.8 $\pm$ 2925.6
RANTES	2886.4 $\pm$ 469.8	6833.8 $\pm$ 9372.5	1969.3 $\pm$ 2011.2	3138.5 $\pm$ 2761.9	2310.8 $\pm$ 1298.7	2799.5 $\pm$ 1244.6	3404.0 $\pm$ 2533.9	3631.5 $\pm$ 781.8	3140.0 $\pm$ 1504.9
TARC	5307.4 $\pm$ 2803.6	9273.0 $\pm$ 4167.1	5361.7 $\pm$ 5386.2	4513.5 $\pm$ 3615.6	11280.0 $\pm$ 10017.6	9664.2 $\pm$ 2512.2	13702.6 $\pm$ 10561.8	14599.0 $\pm$ 8972.2	6587.2 $\pm$ 2872.1
TCA-3	647.6 $\pm$ 317.6	858.4 $\pm$ 755.7	857.5 $\pm$ 575.4	759.5 $\pm$ 525.6	1157.8 $\pm$ 928.7	1016.7 $\pm$ 514.2	2640.6 $\pm$ 2003.0	10256.5 $\pm$ 10267.0	13404.2 $\pm$ 20570.2
p-value <sup>1)</sup>	<b>*0.0001</b>	<b>*0.0114</b>	0.1541	<b>* 0.0330</b>	<b>*&lt;.0001</b>	<b>*&lt;.0001</b>	<b>*0.0005</b>	<b>*&lt;.0001</b>	0.1384
p-value <sup>2)</sup>		0.7364	0.6146	0.0854	<b>†0.0088</b>	<b>†&lt;.0001</b>	0.0666	<b>†0.0123</b>	0.0853

SC : Sham control, H : hour reperfusion after ischemia

IL : interleukin, IFN $\gamma$  : interferony, MDC : macrophage derived chemokineMIP-1 $\alpha$  : macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

TCA-3 : T-cell activation protein-3, TARC : thymus and activation regulated chemokine

RANTES : regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

p-value<sup>1)</sup> : The difference in the pro-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing. Kruskal-Wallis test used. \* : p<0.05.p-value<sup>2)</sup> : Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group. repeated Measured ANOVA test used.

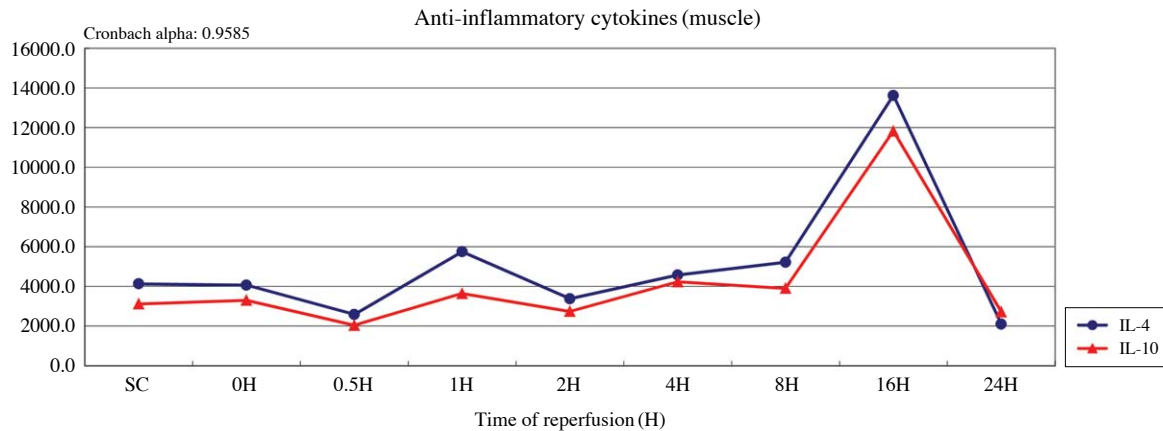
† : p&lt;0.05.

토카인의 변화 양상은 유사하게 나타났다(Cronbach's alpha : 0.8355, Fig. 2). 반면 대조군, 재관류 0, 1, 2, 4, 8, 16시간군에서 사이토카인의 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났다. 또한 재관류 2, 4, 16시간군에서 대조군과 비교한 재관류 시점별 사이토카인의 차이가 유의한 것으로 나타났다(p<0.05, Table 2). 혈청에서 IL-6는 재관류 4시간군에서, Eotaxin, MCP-1, TARC는 재관류 16시간군에서, TCA-3는 재관류 24시간군에서 가장 높

게 증가되었을 뿐만 아니라 다른 사이토카인보다 유익하게 높은 농도로 관찰되었다(Fig. 2).

## 2. 항염증성 사이토카인

본 실험에서 항염증성 사이토카인에 해당하는 것은 IL-4와 IL-10이다. 허혈 후 재관류 시점에 따른 뼈대근육 내 항염증성 사이토카인의 변화 양상은 유사하게 나



**Fig. 3.** The changes of anti-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle. Data are presented as mean (unit: pg/mL). H : hour reperfusion after ischemia, SC : Sham control.

**Table 3.** The changes of anti-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (unit : pg/mL)

Muscle	SC (n=6)	0H (n=6)	0.5H (n=6)	1H (n=6)	2H (n=6)	4H (n=6)	8H (n=6)	16H (n=6)	24H (n=6)
IL-4	4128.0 $\pm$ 2972.2	4062.5 $\pm$ 3143.5	2581.8 $\pm$ 1671.7	5747.0 $\pm$ 4355.2	3375.2 $\pm$ 3066.6	4572.8 $\pm$ 3127.3	5212.5 $\pm$ 4796.1	13618.7 $\pm$ 7745.0	2096.0 $\pm$ 1272.2
IL-10	3115.5 $\pm$ 2101.5	3298.7 $\pm$ 2528.1	2036.2 $\pm$ 1024.9	3639.0 $\pm$ 3170.9	2736.2 $\pm$ 2753.6	4227.3 $\pm$ 4084.6	3899.7 $\pm$ 2282.1	11821.8 $\pm$ 7535.3	2713.2 $\pm$ 749.6
p-value <sup>1)</sup>	0.6650	0.6889	0.6761	0.5309	0.2980	0.8102	1.0000	0.6889	0.5752
p-value <sup>2)</sup>		0.9752	0.9356	0.7168	0.8504	0.9798	0.7925	0.5770	0.4967

SC : Sham control, H : hour reperfusion after ischemia, IL : interleukin

p-value<sup>1)</sup> : The difference in the anti-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing. Wilcoxon rank sum test used.

p-value<sup>2)</sup> : Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group. Repeated Measured ANOVA test used.

타났다 (Cronbach's alpha : 0.9585, Fig. 3). 또한 동일한 재관류 시점에서 사이토카인 사이의 농도에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 3). 대조군과 비교한 재관류 시점별 사이토카인의 차이는 통계적 유의성은 없었으나 재관류 16시간군에서 가장 높게 증가되었다가, 24시간군에서 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

허혈 후 재관류 시점에 따른 혈청 내 항염증성 사이토카인의 변화 양상은 유사성이 없는 것으로 나타났다 (Cronbach's alpha : 0.1223, Fig. 4). 재관류 4시간군에서 사이토카인의 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났다, 대조군과 비교한 재관류 시점별 사이토카인의 차이 또한 유의한 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ , Table 4).

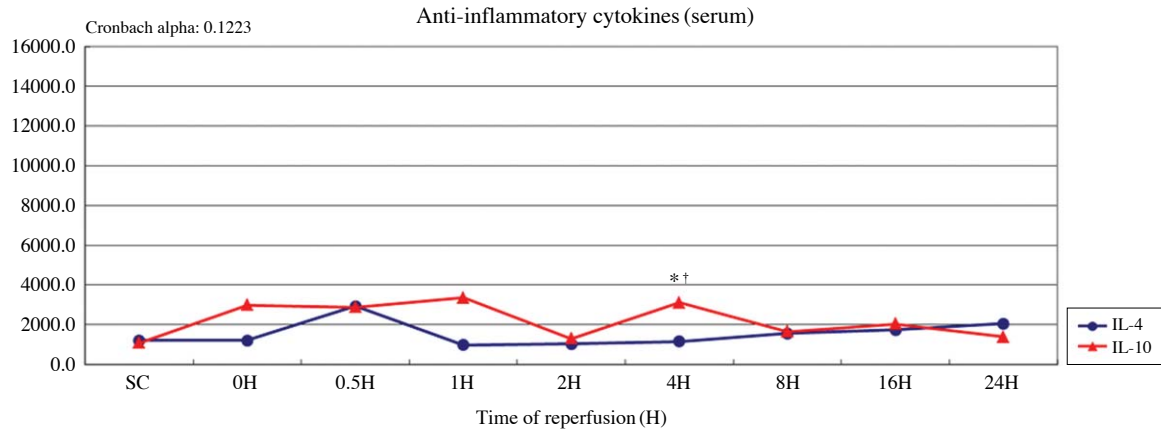
## 고 찰

뼈대근육의 허혈 재관류 손상은 각종 사고, 격렬한 운

동 그리고 외과 수술 시 주로 발생된다. Chen 등 (1998)은 뼈대근육의 허혈은 세포질 내 사립체와 근육세포질 세망을 손상시키고 근육원섬유를 형태학적으로 변형시킨다고 하였고 [12], Filosto 등 (2003)은 조직의 손상은 증가된 활성산소기 (reactive oxygen species, ROS)가 사이토카인의 분비를 조절하여 염증 관련 인자들의 활동을 증가시켰기 때문이라고 하였다 [2].

허혈 재관류 손상은 뼈대근육섬유의 종류와 허혈시간에 따라서 다르게 나타나고 허혈 후 회복과정에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 빠른 수축 섬유에 해당하는 type II 섬유는 느린 수축 섬유에 해당하는 type I 섬유보다 허혈 손상에 더 민감하고 회복속도도 더 느린 것 [13]으로 보고되었고, 2시간 허혈은 가역적인 손상을 주지만 장시간의 허혈은 심한 손상을 줄 뿐만 아니라 피사 및 세포자멸사 (apoptosis)를 유발할 수 있다고 하였다 [14].

친염증성 사이토카인은 호산구 작용을 활성화하여



**Fig. 4.** The changes of anti-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the serum. Data are presented as mean (unit: pg/mL). H : hour reperfusion after ischemia, SC : Sham control, \* :  $p < 0.05$ ; The difference in the anti-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing, † :  $p < 0.05$ ; Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group.

**Table 4.** The changes of anti-inflammatory cytokines after ischemia-reperfusion injury in the serum. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (unit: pg/mL)

Serum	SC (n=6)	0H (n=6)	0.5H (n=6)	1H (n=6)	2H (n=6)	4H (n=6)	8H (n=6)	16H (n=6)	24H (n=6)
IL-4	1206.6 $\pm$ 645.2	1208.2 $\pm$ 1189.5	2934.3 $\pm$ 4736.9	980.2 $\pm$ 791.1	1038.3 $\pm$ 567.5	1162.7 $\pm$ 577.7	1557.2 $\pm$ 1176.2	1739.3 $\pm$ 744.8	2050.6 $\pm$ 2120.2
IL-10	1081.6 $\pm$ 434.4	2986.2 $\pm$ 4747.0	2871.3 $\pm$ 5336.8	3361.0 $\pm$ 6299.4	1288.3 $\pm$ 475.7	3112.0 $\pm$ 1167.2	1655.0 $\pm$ 555.4	2037.3 $\pm$ 603.2	1389.6 $\pm$ 912.0
p-value <sup>1)</sup>	0.8345	0.8340	0.6889	1.0000	0.4712	<b>*0.0051</b>	0.6761	0.4712	1.0000
p-value <sup>2)</sup>		0.3901	0.4609	0.3291	0.1367	<b>†0.0047</b>	0.6706	0.2350	0.4869

SC : Sham control, H : hour reperfusion after ischemia, IL : interleukin

p-value<sup>1)</sup> : The difference in the anti-inflammatory cytokines at the same reperfusion timing. Wilcoxon rank sum test used. \* :  $p < 0.05$ .

p-value<sup>2)</sup> : Differences of cytokines in the time period of reperfusion compared with the sham control group. Repeated Measured ANOVA test used.

† :  $p < 0.05$ .

알레르기 반응을 유도한다. 이 중 Eotaxin은 주로 급성기 알레르기 반응이나 천식 발생 시 활동하여 호산구를 집결시키는 역할을 한다[15]. 허파에서 과잉 생성된 IL-3와 IL-5는 호산구 및 골수세포를 활성화하고 기도 내 침윤을 증가시켜 천식을 일으킨다고 하였다[16].

MDC와 TARC는 주로 섬유아세포와 상피세포에서 생성되고 조직 내 Th2세포의 유입을 증진시키며, 안구 표면, 피부, 허파, 기관지 등에 알레르기성 질환을 일으킨다[17]. Holzheimer와 Steinmetz (2000)에 의하면 조직 손상을 동반한 외상이나 수술 후 해당부위에 지속적으로 나타나는 통증은 염증반응을 일으키는 사이토카인이 지속적으로 생성되었기 때문으로, 외과적 수술 전·후 국소조직 및 전신에서 사이토카인의 농도를 관찰한 결과 국소조직의 농도가 전신의 농도보다 현저하게 높게 나타났다고 하였다[18]. Leung 등 (2000)은 수술 후 IL-1 $\beta$ 가 수술부위 및 혈장에서 유의하게 증가되

었다고 하였고[19], 특히 MIP-1 $\alpha$ 는 허혈 재관류 손상 시 증가되어 염증세포의 침윤과 조직 파괴를 유도한다고 알려져 있다[20].

친염증성 사이토카인은 장기 이식 시 거부반응과도 관련된 다. IL-2는 대표적인 자가분비 (autocrine) 기능을 가진 사이토카인이며 장기 이식과 관련하여 IL-2와 IFN $\gamma$ 의 발현 감소는 거부반응을 감소시키는 것으로 알려져 있다[21]. Nagano 등 (1997)은 이식 후 초기에 증가된 RANTES가 급성 거부반응과 밀접한 관계가 있다고 하였고[22], Kimura 등 (2013)도 허혈 조직에서 RANTES가 증가하면 혈류 회복이 지연된다고 보고 하였다[23]. TCA-3는 T세포, 비만세포, 내피세포 등에서 생성되고, 이식에 따른 허혈 손상의 발병기전에 중요한 역할을 하며, 전체 이식보다는 부분 이식 시 더 증가되어 허혈 손상을 일으킨다고 하였다[24].

친염증성 사이토카인은 또한 뼈대근육과도 관련되어

영향을 미친다.

IFN $\gamma$ 는 직·간접적으로 대식세포를 활성화시켜 염증 반응을 증진시키고, 만성염증 및 자가 면역 질환 그리고 손상된 뼈대근육에서 발현을 한다[25].

IL-6는 대표적인 염증성 사이토카인으로 뼈대근육 내 자극에 따라 신속히 발현을 하여 운동하는 동안 간에서 포도당 생성을 증진시키거나 지방조직에서 지방 분해를 한다고 보고된 바 있다[26].

Steensberg 등(2000)은 육체적 활동 반응에 의하여 뼈대근육에서 유도된 IL-6의 혈장수준이 상승되고, 이때 분비된 IL-6는 대사와 염증과정에 영향을 줄 수 있다고 하였다[27]. MCP-1은 뼈대근육의 급성손상 시 활동하는 인자이며[28], 혈액 내 증가 시 죽상경화증과 같은 혈관 질환과 급성 및 만성 바이러스 감염을 일으킨다[29].

본 연구에서 친염증성 사이토카인을 분석한 결과, 뼈대근육에서 각 사이토카인의 변화 양상은 재판류 시점에 따라 모두 유사하게 나타났으며(Cronbach's alpha : 0.9906), 재판류 0시간군에서 친염증성 사이토카인의 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 1). 대조군과 비교한 재판류 시점별 사이토카인은 통계적 유의성은 없었으나, IL-1 $\alpha$ 를 제외한 뼈대근육 내 친염증성 사이토카인은 모두 재판류 16시간군에서 가장 높게 증가되었다가 24시간군에서 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1).

혈청에서 각각의 친염증성 사이토카인의 변화 양상 역시 유사하게 나타났지만(Cronbach's alpha : 0.8355), 대조군, 재판류 0, 1, 2, 4, 8, 16시간군에서 친염증성 사이토카인의 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 2). 또한 대조군과 비교하여 재판류 2, 4, 16시간군에서 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 2). 특히 IL-6는 재판류 4시간군에서 대조군의 14.5배이었으며, MCP-1은 재판류 16시간군에서 대조군의 13.7배 증가된 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 허혈 후 재판류 시 나타나는 뼈대근육 손상은 근육에서 혈관 투과성이 증가되면서 조직 내 호중구의 활성이 높아지고[30], 활성화된 호중구의 조직 내 침윤이 증가됨에 따라 염증을 일으키는 사이토카인의 분비가 증가된 결과[1]라고 생각된다.

본 연구에서 가장 큰 농도차이를 보였던 IL-6와 MCP-1은 재판류 4시간군에서 크게 증가한 뒤, 8시간군에서 감소하고 16시간군에 다시 증가한 뒤 24시간군에 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). IL-6는 재판류 시 생성되는 활성산소기(ROS)에 영향을 받는 NF-kappaB의 활성화와 밀접한 관련이 있으며 이러한 활성은 저산소증에 의해 서서히 영향을 받는다[31]는 연구결과에

따라 재판류 4시간군에서 상승된 것으로 생각된다.

또한 항염증성 사이토카인은 친염증성 사이토카인의 생성과 유리를 억제하여 염증반응을 완화시키는 것[6,7]으로 알려져 있다. 본 실험에서 재판류 4시간군에서 대조군과 비교하여 유의한 농도차이를 보였던 항염증성 사이토카인의 영향에 의해 IL-6는 감소 및 재증가 되었을 것으로 생각되며, 뼈대근육의 손상 초기에 반응하는 MCP-1 역시 IL-6과 비슷한 양상을 보이는 것으로 생각된다. 본 실험에서 IL-6 변화는, 3시간 부분 허혈 후 재판류 0, 4, 24시간군에서 IL-6를 비교한 Conard 등(2005)의 실험과 유사하게 나타났다[11].

항염증성 사이토카인에 해당하는 IL-4는 B세포로부터 IgE 생성을 촉진시키는 역할을 하고, 자가 분비 작용을 통하여 Th2세포의 성장을 유도하며 알레르기 반응 시 빠르게 증가한다[32]. 림프절에서 발현된 IL-10 또한 염증반응을 조절하고, 혈액응고를 억제하는 항염증성 사이토카인의 역할을 한다[33,34].

본 실험에서 항염증성 사이토카인의 발현 양상은 허혈 후 재판류 시점에 따라 뼈대근육에서 유사하게 나타났다(Cronbach's alpha : 0.9585). 대조군과 비교한 재판류 시점별 사이토카인은 통계적 유의성은 없었으나 재판류 16시간군에서 가장 높게 증가되었다가 24시간군에서 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 혈청에서 항염증성 사이토카인의 변화 양상은 유사성이 없는 것으로 나타났다(Cronbach's alpha : 0.1223). 재판류 4시간군에서 사이토카인의 농도 사이의 차이가 유의한 것으로 나타났고, 대조군과 비교한 재판류 시점별 사이토카인의 차이 또한 유의한 것으로 나타났다( $p < 0.05$ , Fig. 4).

조직손상의 발생은 친염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인 사이의 균형유지가 중요한 것으로 알려져 있다[35]. 허혈 후 재판류 손상으로 혈액 내 증가된 급성 염증반응 및 통증을 일으키는 인자들과 균형 활동을 이루기 위하여 친염증성 사이토카인이 증가한다[7]는 연구 보고를 고려할 때, 본 실험에서 IL-4와 IL-10의 발현 증가는 염증과 통증억제에 연관이 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합하면, 뼈대근육에서 대부분의 사이토카인이 일관되게 재판류 16시간에서 증가됨에 따라 허혈 후 재판류 16시간이 뼈대근육의 염증반응을 확인할 수 있는 가장 적절한 시간이라는 것을 알 수 있었고, 염증반응에 민감한 재판류 시간이 확인됨에 따라 향후 허혈 재판류 동물실험에서 불필요한 재판류 시간 설정으로 인한 동물의 희생을 줄이는 데 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 혈청에서 재판류 4시간과 16시간에서 높은 발현 농도로 나타난 IL-6, Eotaxin, MCP-

1, TARC는 뼈대근육의 손상을 혈청 내에서 예측할 수 있는 유용한 표지인자가 될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구를 토대로 허혈 후 사이토카인들의 변화 양상은 재관류 시점에 따라 뼈대근육보다는 혈청에서 발현양의 차이가 유의하게 나타났으며, 특히 혈청에서 재관류 4시간군에 관찰되는 IL-6와 재관류 16시간에 관찰되는 MCP-1은 다른 사이토카인보다 유의하게 높은 농도로 발현됨에 따라 친염증성 사이토카인의 표지인자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

그러나 뼈대근육 허혈 후 재관류 시점에 따른 사이토카인의 변화양상을 비교한 선행연구의 부족으로 다양한 사이토카인을 본 실험과 비교할 수 없는 연구의 한계가 있었으며 앞으로 계속된 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 실험을 바탕으로 허혈 손상 시 혈청에서 높게 나타나는 염증관련 사이토카인들이 환자들에서 뼈대근육의 손상과 관련된 급성 염증반응을 예측할 수 있는 적절한 표지인자로 활용될 수 있음을 비교하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*. 2012; 43:670-5.
- Filosto M, Tonin P, Vattemi G, Savio C, Rizzuto N, Tomelleri G. Transcription factors c-Jun/activator protein-1 and nuclear factor-kappa B in oxidative stress response in mitochondrial diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003; 29: 52-9.
- Peterson JM, Pizza FX. Cytokines derived from cultured skeletal muscle cells after mechanical strain promote neutrophil chemotaxis in vitro. *J Appl Physiol*. 2009; 106(1): 130-7.
- Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 2001; 169(2):386-91.
- Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock*. 2003; 19:538-46.
- Giannoudis PV. Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury*. 2003; 34:397-404.
- Koch A, Zacharowski K, Boehm O, Stevens M, Lipfert P, von Giesen H, et al. Nitric oxide and pro-inflammation cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflamm Res*. 2007; 56:32-7.
- Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol*. 1999; 87:1360-7.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammation cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*. 1995; 63:289-302.
- Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S, et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma*. 1997; 42:446-54.
- Conrad MF, Stone DH, Albadawi H, Hua HT, Entabi F, Stoner MC, et al. Local inflammatory and thrombotic responses differ in a murine model of partial and complete hindlimb ischemia-reperfusion. *Surgery*. 2005; 138:375-81.
- Chen J, Akyurek LM, Fellstrom B, Hayry P, Paul LC. Eotaxin and capping protein in experimental vasculopathy. *Am J Pathol*. 1998; 153:81-90.
- Woitasko MD, McCarter RJ. Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102:2052-63.
- Sakai T, Takaya S, Fukuda A, Harada O, Kobayashi M. Evaluation of warm ischemia-reperfusion injury using heat shock protein in the rat liver. *Transpl Int*. 2003; 16:88-99.
- Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today*. 2000; 6:20-7.
- Zarogiannis S, Gourgouliannis KI, Kostikas K. Anti-interleukin-5 therapy and severe asthma. *N Engl J Med*. 2009; 360: 2576.
- Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Kumagai N, Nishida T. Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111:520-6.
- Holzheimer RG, Steinmetz W. Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res*. 2000; 5:347-55.
- Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock*. 2003; 19:538-46.
- Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-

- reperfusion injury. *Crit Care Med.* 2006; 34:2447-55.
21. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, Paineau J, Chabannes D, Souillou JP. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats-characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation.* 1992; 54:219-25.
  22. Nagano H, Nadeau KC, Takada M, Kusaka M, Tilney NL. Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation.* 1997; 63:1101-8.
  23. Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, et al. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived MSC to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 2013; 23(5):488-501.
  24. Xie JF, Wang G, Debonera F, Han R, Dorf ME, Hancock W, et al. Selective neutralization of the chemokine TCA-3 reduces the increased injury of partial versus whole liver transplants induced by cold preservation. *Transplantation.* 2006; 82:1501-9.
  25. Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, Koh TJ. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294:C1183-91.
  26. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008; 88(4):1379-406.
  27. Steensberg A, Van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 2000; 529 Pt 1:237-42.
  28. Lu H, Huang D, Ransohoff RM, Zhou L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* 2011; 25: 3344-55.
  29. Klinghammer L, Urschel K, Cicha I, Lewczuk P, Raaz-Schrauder D, Achenbach S, et al. Impact of telmisartan on the inflammatory state in patients with coronary atherosclerosis-influence on IP-10, TNF-alpha and MCP-1. *Cytokine.* 2013; 62:290-6.
  30. Seekamp A, Ward PA. Ischemia-reperfusion injury. *Agents Actions Suppl.* 1993; 41:137-52.
  31. Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Zhang YK, Tani T, Hashimoto T, et al. Hypoxia, but not reoxygenation, induces interleukin 6 gene expression through NF-kappa B activation. *Transplantation.* 1997; 63(3):466-70.
  32. Cooney LA, Fox DA. Regulation of Th17 maturation by interleukin 4. *Crit Rev Immunol.* 2013; 33:379-87.
  33. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008; 180:5771-7.
  34. Kamimura M, Viedt C, Dalpke A, Rosenfeld ME, Mackman N, Cohen DM, et al. Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. *Circ Res.* 2005; 97:305-13.
  35. Schotte H, Schluter B, Willeke P, Mickholz E, Schora A, Domschke W, et al. Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of pro-inflammatory cytokine secreting peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2004; 4:200-8.

# The Changes of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Both Serum and Gastrocnemius Muscle of Mice after 2-hour Postischemic Reperfusion Injury

Shin-Young Kim

*Department of Anatomy and Cell Biology, Hanyang University*

**Abstract** : This study aimed to investigate the inflammatory changes and their main indicators according to the time-period of postischemic reperfusion injury confirmed by analyzing changes of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the skeletal muscle and serum.

By using 12-week-old male ICR strain mice were grouped into sham control and 8 different time-periods of reperfusion groups (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 hours). Left common iliac artery of each mice in the reperfusion group was devascularized by a vascular clamp for 2 hours. Once anesthesia was applied to the experimental animals, blood serum was obtained from right heart atrium on the difference time-period of reperfusion (0-, 0.5-, 1-, 2-, 4-, 8-hour, respectively). Then, tissue fluid was collected in calf muscles (gastrocnemius muscle) after the mice were sacrificed by cervical dislocation. By using these serum and tissue fluids, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze both pro-inflammatory cytokines (Eotaxin,  $IFN\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, TCA-3) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10). Consequently, there were significant differences of pro-inflammatory cytokines levels in the skeletal muscle of 0-hour reperfusion group ( $p < .05$ ) and those in the serum of 0-, 1-, 2-, 4-, 8-, 16-hour reperfusion groups ( $p < .05$ ). In the serum of 4-hour reperfusion group, the presence of anti-inflammatory cytokines was significant from other groups ( $p < .05$ ). By the comparison with the control group, furthermore, pro-inflammatory cytokines in the serum of 2-, 4-, 16-hour reperfusion group and anti-inflammatory cytokines in the serum of 4-hour reperfusion group were considerably different ( $p < .05$ ).

To sum up, changes of cytokine levels according to the time-period of reperfusion were considerably different in the serum rather than the tissue fluids from the skeletal muscle. In particular, IL-6 and MCP-1 in the serum showed higher density in 4- and 16-hour reperfusion groups so that they could be considered as the main indicator of pro-inflammatory cytokines.

**Keywords** : Ischemia, Reperfusion, Pro-inflammatory cytokine, Anti-inflammatory cytokine