

# 왼손엉덩동맥 허혈 후 재관류 시간경과에 따른 생쥐의 혈청 내 친염증성 cytokine의 변화

박경신<sup>1</sup>, 김성재<sup>1</sup>, 서윤경<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, <sup>2</sup>한양대학교 간호학부

(2015년 11월 23일 접수, 2016년 3월 15일 수정접수, 2016년 3월 18일 게재승인, Published Online 30 March 2016)

**간추림** : 허혈 재관류 손상은 허혈이 이루어진 후 재관류되면서 일어난다. 허혈 재관류 손상의 주요 원인은 활성산소기와 활성화된 면역세포가 분비하는 cytokine이다. Cytokine은 감염이나 면역반응, 염증 등의 반응을 조절하는 세포 사이의 신호전달물질로, 염증반응을 증가시키는 것을 친염증성 cytokine이라 한다. 본 실험에서 저자들은 허혈 후 재관류 경과에 따른 친염증성 cytokine인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, eotaxin, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, IFN $\gamma$ 의 변화를 알아보았다.

12주령의 수컷 생쥐를 이용하여 정상대조군과 2시간 허혈군, 4시간 허혈군, 6시간 허혈군으로 구분하였고, 총 96마리의 생쥐를 사용하였다. 허혈처치는 왼손엉덩동맥을 혈관집계를 이용하여 차단하였고, 각 허혈군은 재관류 경과에 따라 0시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간으로 재분류하였다. 재관류 시간에 따라 생쥐를 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈청을 분리한 후 ELISA 분석방법을 이용하여 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, eotaxin, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, IFN $\gamma$ 의 농도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

13개의 cytokine 농도는 허혈시간에 따라 그리고 재관류 시간에 따라 유의한 차이가 있었다. 허혈 2시간군에서 IL-1 $\alpha$ 와 IL-3는 정상대조군보다 유의성 있게 증가되었고, 재관류 후 MIP-1 $\alpha$ 를 제외한 모든 cytokine들은 증가하였으며, MCP-1과 TARC은 재관류 16시간에 가장 높은 농도로 관찰되었다. 허혈 4시간군에서 TARC만이 정상대조군보다 유의성 있게 증가되었으며, 재관류 후 모든 cytokine들은 재관류 4시간 이후에 감소하는 경향으로 관찰되었다. 허혈 6시간군에서 IL-2, IL-3, MCP-1, TARC은 정상대조군보다 유의성 있게 증가되었고, 재관류 16시간에 IL-3와 MCP-1이 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과를 종합하면, 허혈은 친염증성 cytokine을 정상대조군보다 증가시키는 것을 알 수 있었고, 특히 2시간과 6시간 허혈군에서 관찰된 IL-1 $\alpha$ , IL-3, MCP-1, TARC은 재관류 후기까지 비교적 높은 농도로 유지되는 것을 알 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : 생쥐, 왼손엉덩동맥, 허혈, 재관류 손상, 친염증성 cytokine

## 서 론

허혈 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)은 허혈 후 혈류가 재관류 되면서 발생하는 것으로 사고 또는 외과

적 수술 과정에서 흔하게 발생한다[1]. 또한 급성 혈관 폐색으로 인한 뇌졸중, 심근경색증, 사지 허혈 후에도 국소적인 조직 손상이 유발된다[2]. 질병과 사망의 원인이 되기도 하는 허혈 재관류 손상의 주요 원인은 염증반응이다[3]. 염증반응을 촉진 또는 가중시키는 매개물질은 과산화음이온(superoxide anion), 과산화수소, 초산소기(peroxyl radical), 수산기(hydroxyl radical) 등과 같은 활성산소기(reactive oxygen species)와 활성화된 백혈구이다[1,4]. 활

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.  
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.  
교신저자 : 서윤경(한양대학교 간호학부)  
전자우편 : seoyk75@hanyang.ac.kr

성화된 백혈구는 면역반응에 관여하는 세포들을 자극하여 cytokine을 분비하게 한다[5].

Cytokine은 세포 표면에 있는 수용체와 상호작용하여 세포의 특수 반응을 이끌어내는 폴리펩타이드 분자로 [6], 염증반응과 면역반응을 조절한다 [7]. 친염증성 cytokine (pro-inflammatory cytokine)은 염증반응을 촉진시켜 질병을 악화시키는 데 영향을 주는 반면 항염증성 cytokine (anti-inflammatory cytokine)은 염증을 감소시키고 치유를 촉진시키는 역할을 한다 [8]. Koh 등 [9]은 건강한 상태에서는 친염증성 cytokine과 항염증성 cytokine이 서로 균형을 잘 이루고 있어 항상성이 유지되지만 둘 사이의 균형이 깨지게 되면 염증반응이 발생하는 것이라고 하였다. 친염증성 및 항염증성 cytokine 간의 조절은 염증반응 조절에 영향을 준다. 따라서 허혈 재관류 손상이 일어날 때 발현되는 cytokine의 수치는 염증과 손상의 정도를 판단하는 지표로 이용될 수 있다고 알려져 있다 [10,11].

Zhang 등 [7]은 쥐의 넓다리동맥과 넓다리정맥을 허혈한 뒤, 발현되는 cytokine의 농도에 차이가 있다고 하였고, Gravante 등 [12]은 쥐의 허파를 허혈과 재관류 한 뒤 발현되는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 interleukin (IL)-1 $\beta$ 가 혈관투과성에 영향을 준다고 하였다. Yassin 등 [13]은 하지 허혈 재관류 손상이 친염증성 cytokine을 발현시켜 염증반응을 증가시키고 간, 허파, 콩팥 등에 장애를 일으킨다고 하였다. 그러나 기존의 연구는 몇몇 cytokine만을 다루었고, 허혈시간 및 재관류 시간에 따른 여러 친염증성 cytokine의 변화를 확인한 논문은 적은 편이다.

이에 저자들은 생쥐의 원온영양동맥을 2시간, 4시간, 6시간으로 나누어 허혈시킨 후 0시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간에 재관류 하였을 때, 혈청에서 친염증성 cytokine인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, eotaxin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage derived chemokine (MDC), macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), thymus and activation regulated chemokine (TARC), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )의 변화를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

한양대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인 (HY-IACUC-14-0071)을 받은 후, (주)오리엔트 바이오(Orient

Co., Seongnam, Korea)에서 8주령 ICR계 수컷 생쥐를 구입하여 specific pathogen free (SPF) 실험동물실에서 4주 동안 사육하였다. 실험동물이 12주령이 되었을 때, 정상대조군과 허혈시간에 따라 2시간, 4시간, 6시간군으로 구분하여, 각각 재관류 0시간군, 2시간군, 4시간군, 8시간군, 16시간군으로 무작위로 분류하였다. 각 군당 6마리씩 총 96마리를 사용하였다.

### 2. 실험동물 처치

Zoletil® (Virbac, France)과 Rompun® (Bayer, Korea)을 1:1 비율로 혼합한 용액을 생리식염수와 1:9 비율로 희석하였다. 혼합한 마취약을 실험동물 체중 10 g당 0.1 mL로 복강주사하여 마취시켰다. 복부를 개복한 뒤, 원온영양동맥을 생쥐용 혈관집게로 각각 2시간, 4시간, 6시간 동안 허혈시켰으며, 허혈과정 동안 항온패드로 체온을 유지시켰다. 허혈 후 혈관집게를 제거하여 재관류시키고 절개된 복부의 피부를 봉합하였다. 재관류 0시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간에 실험동물들을 다시 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채취하였다. 정상대조군의 실험동물은 마취 후 아무런 처치를 하지 않았으며, 심장에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 7500 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 3. ELISA 분석방법

혈청의 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, eotaxin, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, IFN $\gamma$ 의 농도 변화를 측정하기 위해 ELISA kit (Q-Plex™ Array, Quansysbio, USA)를 사용하였다.

모든 시약과 혈청을 실온에 꺼내둔 뒤 antigen standard powder에 sample diluent 500  $\mu$ L를 넣어 희석하였다. 96 well에 혈청과 희석한 standard를 50  $\mu$ L씩 넣은 후, 실온에서 500 rpm 속도로 1시간 동안 교반기 위에서 혼합시켰다. Wash buffer로 3회 세척 후 detection mix용액을 50  $\mu$ L씩 넣은 후 실온에서 500 rpm 속도로 1시간 동안 교반기 위에서 반응시켰다. 3회 세척 후 streptavidin-HRP용액을 50  $\mu$ L씩 넣은 뒤 실온에서 500 rpm 속도로 15분 동안 교반기위에서 반응시켰다. 6회 세척 후 A와 B용액을 혼합하여 50  $\mu$ L씩 넣고 15분 내에 ChemiDoc XRS Plus System (Bio-Rad, USA)으로 촬영하였다. 촬영된 결과는 Q-Plex™ SOFTWARE (Quansysbio, USA)로 분석하였다.

### 4. 자료분석

측정된 cytokine 농도는 이상치(outlier)를 이용하여 정

상범주에서 벗어난 값을 제한 뒤, IBM SPSS statistics 21 ver. (SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하여 분석하였다. 전체 허혈 시간에 따른 cytokine의 농도차이와 각 허혈 시간(2시간, 4시간, 6시간)에서 재관류 시간에 따른 cytokine의 농도차이는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석하였고, 정상대조군과 비교하여 허혈시간에 따른 cytokine의 농도차이는 Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였다. 분석을 통해 얻은 모든 결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의수준은 Kruskal-Wallis test는  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test는  $p < 0.0125$ 로 정하였다.

### 결 과

정상대조군과 허혈군을 비교하였을 때, 13개의 cytokine 농도는 허혈을 시킨 시간에 따라 차이가 있었다. 정상대조군과 허혈군을 비교하였을 때, 허혈 2시간군에서는 IL-1 $\alpha$ , IL-3가 유의성이 있었으며, 허혈 4시간군에서는 TARC, 허혈 6시간군에서는 IL-2, IL-3, MCP-1, TARC에서 유의성이 관찰되었다. 허혈 2시간군과 허혈 4시간군을 비교하였을 때 cytokine들의 농도에는 유의성이 없었으며, 허혈 2시간군에서 관찰된 IL-1 $\alpha$ 는 허혈 6시간군보다 유의성 있게 감소되었고, TARC은 허혈 6시간군보다 유의성 있게 증가하였다. 허혈 4시간군과 허혈 6시간군을 비교하였을 때는 cytokine들의 농도에는 유의성이 없었다(Table 1).

허혈 2시간군 내에서 재관류 시간에 따른 cytokine들의 증가 또는 감소는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, eotaxin, MCP-1, MDC, RANTES, TARC, IFN $\gamma$ 에서 유의성이 있었으며, MIP-1 $\alpha$ 은 유의성이 없었다. MIP-1 $\alpha$ 을 제외한 12개의 cytokine들은 재관류 2시간에 재관류 0시간의 농도보다 유의성 있게 증가되었고, 재관류 4시간, 8시간, 16시간에는 재관류 2시간군과 비슷하거나 감소되는 경향을 보였다. Eotaxin과 MCP-1, TARC은 재관류 16시간에 농도가 다시 증가하는 경향을 보이기도 하였다(Fig. 1a).

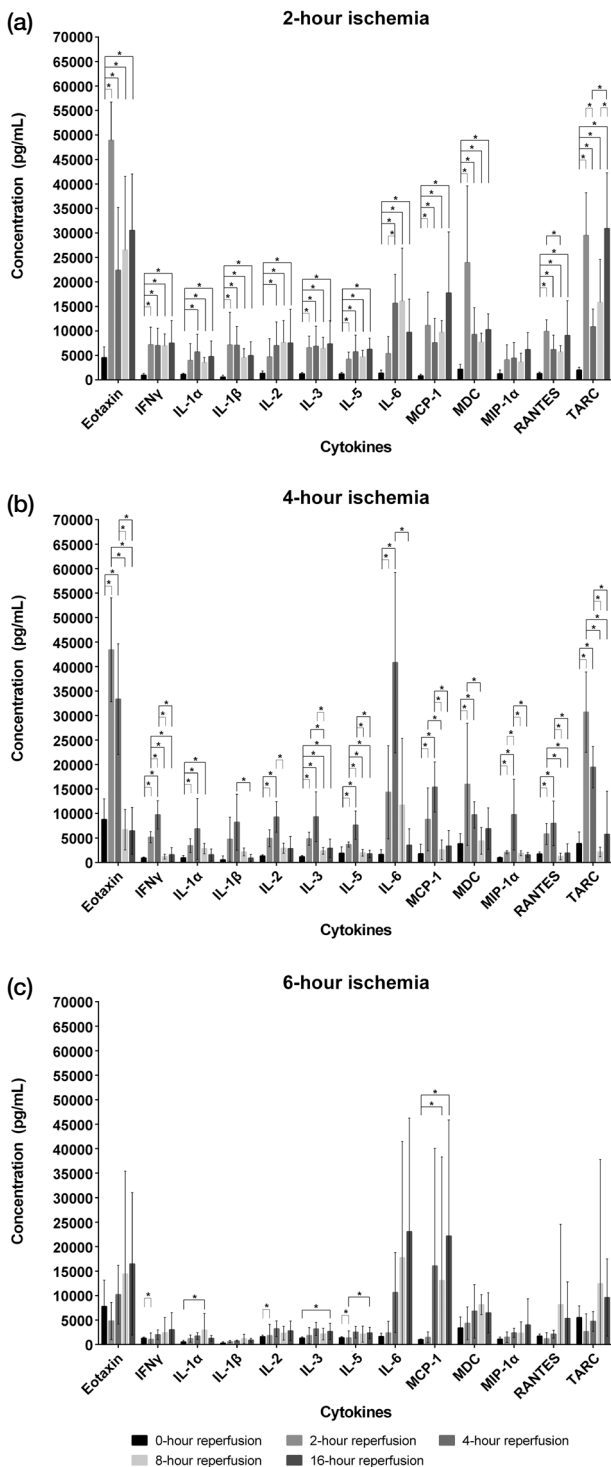
허혈 4시간군 내에서 재관류 시간에 따른 cytokine들의 증가 또는 감소는 모든 cytokine들에서 유의성 있게 관찰되었다. IL-1 $\beta$ 를 제외한 12개의 cytokine들은 재관류 2시간에 재관류 0시간의 농도보다 유의성 있게 증가되었다. IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, IFN $\gamma$ 는 재관류 4시간까지 증가되었고, eotaxin과 MDC, TARC은 재관류 2시간 이후 감소되는 경향으로 관찰되었다(Fig. 1b).

허혈 6시간군 내에서 재관류 시간에 따른 cytokine들의 증가 또는 감소는 IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-5, MCP-1, IFN $\gamma$ 에

**Table 1.** Mean levels of cytokine concentration in serum according to the ischemia time.

| Groups <sup>a</sup>               | Cytokines         | 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              |
| Control                           | Normal            | 4620.4<br>±1866.9 | 915.8<br>±310.5   | 587.9<br>±277.9  | 309.6<br>±255.9 | 1004.0<br>±336.3 | 840.6<br>±189.4  | 1059.9<br>±209.8  | 1338.4<br>±514.8 | 577.1<br>±204.1   | 4505.1<br>±2334.8 | 1230.1<br>±740.5 | 1370.1<br>±365.9 | 1640.9<br>±629.1  |
| Ischemia                          | 2-hour            | 4530.2<br>±2192.8 | 963.2<br>±336.9   | 1146.8<br>±215.4 | 579.5<br>±374.5 | 1340.5<br>±510.4 | 1251.0<br>±280.6 | 1222.3<br>±330.3  | 1384.5<br>±601.8 | 829.3<br>±345.1   | 2155.2<br>±1012.6 | 1254.5<br>±751.4 | 1325.5<br>±277.1 | 1991.5<br>±594.0  |
|                                   | 4-hour            | 8779.2<br>±4208.3 | 903.3<br>±206.5   | 943.8<br>±451.4  | 558.8<br>±757.8 | 1306.5<br>±234.7 | 1168.2<br>±242.2 | 1868.0<br>±1311.7 | 1631.3<br>±979.4 | 1776.5<br>±1945.9 | 3830.8<br>±2044.1 | 959.5<br>±168.3  | 1729.8<br>±415.3 | 3866.0<br>±2355.7 |
|                                   | 6-hour            | 7798.0<br>±5335.8 | 1297.5<br>±2289.0 | 542.5<br>±325.3  | 286.3<br>±298.8 | 1601.5<br>±318.2 | 1325.5<br>±243.7 | 1391.2<br>±207.7  | 1655.2<br>±681.9 | 1003.8<br>±137.1  | 3401.5<br>±2256.3 | 1095.7<br>±440.2 | 1732.5<br>±416.3 | 5519.5<br>±2395.2 |
| H-statistics <sup>b</sup>         |                   | 4.641             | 6.546             | <b>11.191*</b>   | 3.874           | <b>7.954*</b>    | <b>11.536**</b>  | 6.267             | 1.184            | <b>9.962*</b>     | 4.524             | 6.433            | <b>16.128**</b>  |                   |
| Multiple comparisons <sup>c</sup> |                   |                   |                   |                  |                 |                  |                  |                   |                  |                   |                   |                  |                  |                   |
|                                   | Normal vs. 2-hour |                   |                   | <b>-2.84*</b>    | -1.42           | -2.582*          |                  |                   |                  |                   |                   |                  | -1.033           |                   |
|                                   | Normal vs. 4-hour |                   |                   | -1.549           | -1.807          | -2.324*          |                  |                   |                  |                   |                   |                  | -2.489           |                   |
|                                   | Normal vs. 6-hour |                   |                   | -0.258           |                 |                  |                  |                   |                  |                   |                   |                  | <b>-3.098*</b>   |                   |
|                                   | 2-hour vs. 4-hour |                   |                   | -0.801           | -0.32           | -0.241           |                  |                   |                  |                   |                   |                  | -0.913           |                   |
|                                   | 2-hour vs. 6-hour |                   |                   | <b>-2.722*</b>   | -1.441          | -0.722           |                  |                   |                  |                   |                   |                  | <b>-2.722*</b>   |                   |
|                                   | 4-hour vs. 6-hour |                   |                   | -1.761           | -1.601          | -1.121           |                  |                   |                  |                   |                   |                  | -1.281           |                   |

<sup>a</sup> All descriptive data are expressed as mean  $\pm$  SD.  
<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test was performed to determine any differences between the ischemia groups including normal control group. One asterisk indicates  $p < 0.05$ , and two asterisks indicate  $p < 0.01$ .  
<sup>c</sup> Mann-Whitney test was performed for post hoc comparisons with Bonferroni correction method. Z-scores from pair-wise comparison was presented, and one asterisk indicates an adjusted p-value of 0.0083.  
 \*, Significant values.



**Fig. 1.** The changes in the concentration of cytokine in the serum after of ischemia. Data are presented as mean (Pg/mL). Kruskal-Wallis test was performed to determine any differences between the reperfusion groups including the 0-hour reperfusion group as a control group, and the levels of all cytokines were significantly different between the reperfusion groups. Mann-Whitney test was performed for post-hoc comparisons with Bonferroni correction method, and one asterisk indicates an adjusted p-value of .005.

서 유의성이 있었으며, IL-1 $\beta$ , IL-6, eotaxin, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC에서는 유의성이 없었다. IL-1 $\alpha$ 는 재관류 8시간에 증가하였고, IL-5는 재관류 2시간에 감소한 뒤 재관류 16시간에 증가되었다. IL-3와 MCP-1은 재관류 16시간에 유의성 있게 증가되었다(Fig. 1c).

## 고찰

본 실험에서 관찰된 친염증성 cytokine은 허혈을 유지시킨 시간과 재관류 시간이 지남에 따라 변하는 것으로 확인되었다.

여러 IL 단백질 중 IL-1 $\alpha$ 과 IL-1 $\beta$ 는 단핵구와 대식세포에 의해 생성되며[14], 호중구를 활성화시켜 염증반응을 강화한다[6]. IL-2는 림프구에 의해 생성되며, 자연살해세포의 활성화를 증가시키고[15], T림프구의 확산과 성장을 야기시킨다[16]. Serrick [16]은 개의 허파를 허혈시키면, 재관류 초기에 IL-2가 유의하게 증가된다고 하였다. IL-3는 활성화된 T세포와 비만세포에 의해 생성되어 백혈구의 식균작용과 호산구의 분비기능을 촉진시키며[17], 뇌졸중환자에서 증가되고[18], 출혈손상에서도 유의하게 발현되는 것으로 알려져 있으나[19], Xu 등[20]은 넙다리동맥의 허혈 손상 후 항염증성 cytokine인 GM-CSF가 증가할 때 IL-3가 감소된다고 하였다. 또한 IL-5는 T세포, 림프구, 비만세포, 호중구, 내피세포에 의해 생성되고, 호중구를 발달시킨다[21]. Li 등[22]은 간의 허혈 재관류 손상시 IL-5가 재관류 6시간에 유의하게 증가한다고 하였다. IL-6는 대식세포, 단핵구, 내피세포에 의해 생성되고, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 자극으로도 발현된다고 알려져 있다[23]. Gravante 등[12]은 생쥐 간의 허혈 재관류시 IL-6가 유의하게 증가하며, 특히 재관류 6시간에서 가장 높은 농도로 발현된다고 하였다.

본 실험에서, 허혈 2시간군에서 관찰된 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6은 모두 재관류 직후 유의성 있게 증가되었고, 재관류 8시간 이후에도 비슷한 수준의 농도로 관찰되었다. 허혈 4시간군에서 IL-1 $\beta$ 를 제외한 IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6이 재관류 직후 유의성 있게 증가하여 4시간까지 증가되었으며, 재관류 8시간 이후 감소되었다. 그러나 허혈 6시간군에서는 IL-2와 IL-5만이 재관류 직후 유의성 있게 증가하였다. 허혈 후 증가된 IL들은 단핵구와 대식세포[14], 림프구[16], T세포, 비만세포, 호중구[21,22] 등에 의해서 생성된 것으로 생각되며, 이들 세포들이 허혈 자극이 있는 곳으로 모여들어 염증반응을 강화시키고 허혈손상을 유도하는 데 관여할 것으로[12,16,22,24] 생각된

다. 허혈 2시간과 6시간군에서 재판류 후기까지 비교적 일정한 농도로 관찰된 IL-1 $\alpha$ , IL-3는 재판류 후기의 염증반응을 조절할 것으로 생각되었다.

Eotaxin은 IL-5에 의해 자극되어, 호중구의 화학주성과 내피세포와의 유착을 강화시키고 허혈성 뇌졸중 환자에서 증가되는 것으로 알려져 있다[25]. MCP-1은 림프구와 단핵백혈구, 섬유모세포, 혈관내피세포에서 생성되어 림프구와 단핵백혈구를 활성화시키는 역할을 하며[7], 소뇌 허혈 시 재판류 24시간군에서 유의하게 증가된다고 알려져 있다[26]. MIP-1 $\alpha$ 는 호염구, 상피세포, 섬유모세포, 비만세포, 대식세포, 단핵구, 림프구에 의해 생성되며 호중구의 화학주성을 자극한다고 알려져 있다[27]. MIP-1 $\alpha$ 는 허파의 허혈 재판류 손상에서 증가되며[28], 소뇌의 허혈 재판류 손상시에도 재판류 24시간에 가장 높게 발현된다고 알려져 있다[26].

본 실험에서, 허혈 2시간군과 4시간군에서 관찰된 eotaxin은 재판류 2시간까지 증가한 뒤 감소하는 경향으로 관찰되었는데, 이는 재판류 초기에 빠르게 증가하여 염증반응을 강화시킬 것으로 생각되며[25], MCP-1은 허혈 2시간과 6시간군에서 모두 재판류 후기, 즉 16시간에 가장 높은 농도로 관찰되었다. 이는 소뇌의 허혈 시 재판류 24시간군에서 유의하게 증가된다는 실험결과와[26] 비슷하였으며, 재판류 후기에 염증반응을 강화시켜 손상을 유도할 것으로 생각되었다. MIP-1 $\alpha$ 는 허혈 2시간과 6시간군에서 재판류 시간이 지날수록 증가하였지만 유의성은 없었고, 허혈 4시간군에서 재판류 4시간 이후에는 감소하는 것으로 보아 염증반응의 초기에 주로 작용할 것으로[27,28] 생각되었다.

MDC는 림프구, 단핵구, 가지세포, NK세포에 의해서 발현되어 염증반응을 일으킨다고 알려져 있으며, Richter 등[29]은 출혈로 허파에 염증반응이 생겼을 때 증가된 MDC가 허파에 염증세포의 유입과 침윤을 촉진한다고 하였다. RANTES는 대식세포, 섬유모세포, 내피세포 등에 의해서 생성되며 T세포, 가지세포, 호중구, NK세포, 비만세포, 호염구 등을 활성화시키며[30], 소뇌의 허혈 재판류 손상에서도 유의하게 증가되는 것으로 알려져 있다[31]. TARC는 가지세포, 대식세포, 내피세포, 각질세포 등이 활성화되면서 발현된다[32]. Greaves 등[33]은 TARC는 동맥경화증에서 유의하게 증가하며, 단핵구의 내피세포 침윤을 촉진하여 손상을 유도한다고 하였다. IFN- $\gamma$ 는 림프구와 NK세포에 의해 생성되며[34], TNF- $\alpha$ 와 산화질소의 분비를 활성화시키고, 백혈구의 부착분자를 조절하여 내피세포에 침윤을 증가시키며[8], 콩팥의 허혈 재판류 손상에도 관여하는 것으로 알려져 있다[35].

본 실험에서, 허혈 2시간군과 4시간군, 6시간군에서 관찰된 MDC는 재판류 직후 증가하여 재판류 후기까지 유지되었고, 특히 허혈 2시간군과 4시간군에서는 재판류 2시간에 가장 높은 농도로 관찰된 것으로 보아 MDC가 재판류 초기 빠르게 증가하여 여러 면역세포들의 유입을 유도하고 염증반응을 가중시키는 역할을 할 것으로[29] 생각할 수 있었다. 허혈 2시간군과 4시간군에서 관찰된 RANTES는 재판류 초기에 빠르게 증가한 것으로 보아 재판류 초기 염증반응에 관여하는 것으로[30,31] 생각되었다. TARC는 재판류 초기에 증가되어 재판류 후기까지 비교적 높은 농도로 유지되는 것으로 보아 재판류 후기까지 염증반응을 조절 및 강화하는 것으로[32,33] 생각되었다. 허혈 2시간군과 4시간군에서 관찰된 IFN- $\gamma$  재판류 초기에 증가된 것으로 보아 재판류 초기의 염증반응에 영향을 줄 것으로[8,34,35] 생각되었다.

본 실험에서 허혈 6시간군에서는 재판류 시간에 따라 측정된 cytokine의 농도는 대부분 유의성이 없었다. Sukhotnik 등[36]은 허혈 시간이 2시간에서 3시간, 또는 24시간으로 길어지면 세포의 괴사가 증가된다고 하였는데, 본 실험에서 허혈 6시간군의 실험결과가 유의성이 없었던 것은, 생쥐의 원온영양동맥을 6시간 동안 허혈시킴으로 세포의 손상 또는 괴사가 증가되어 cytokine의 매개체로서 역할을 충분히 하지 못하였기 때문이라고 생각된다.

본 실험에서 확인하지 못하였던, 대표적인 염증반응인자로 알려진 TNF- $\alpha$ 에 대한 추가적인 실험이 보완되어야 할 것으로 생각되며, 허혈시간이 길어짐에 따라 증가되지 않았던 cytokine의 농도가 세포의 괴사 때문인지 확인하는 실험을 추가한다면, 6시간 허혈 시 나타난 실험결과에 대해 더 자세히 논의할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 항염증성 cytokine의 변화도 함께 확인하여 허혈 지속시간에 따라 항염증성 cytokine에 변화가 있는지, 그리고 염증성 cytokine의 변화와 상관관계가 있는지도 확인하여야겠다. 이러한 여러 실험결과들이 보완된다면, 허혈 재판류 시 손상이나 염증의 지표로 cytokine이 사용될 수 있을 것이라 생각하며, 더 나아가 회복 정도를 예상하는 데 도움을 줄 수 있다고 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 허혈은 친염증성 cytokine을 정상대조군보다 증가시키는 것을 알 수 있었으며 증가된 cytokine들은 허혈기간과 재판류시간에 따른 염증반응을 조절하는데 관여할 것이라 생각되었다.

## REFERENCES

- Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia

- reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*. 2012; 43:670-5.
2. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion Injury. *Transplant Proc*. 2006; 38:826-8.
  3. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 298:229-317.
  4. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988; 255: H1269-75.
  5. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:826-37.
  6. Zhang F, Hu EC, Gerzenshtein J, Lei MP, Lineaweaver WC. The expression of proinflammatory cytokines in the rat muscle flap with ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg*. 2005; 54:313-7.
  7. Zhang F, Hu EC, Topp S, Lei M, Chen W, Lineaweaver WC. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg*. 2006; 22:641-7.
  8. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 118:503-8.
  9. Koh H-J, Joo J, Cho M-L, Her Y-M, Hwang J-E, Lee J. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine balance in patients with cirrhotic hepatitis during live-donor liver transplant. *Exp Clin Transplant*. 2013; 11:39-43.
  10. Lange M, Nakano Y, Traber DL, Hamahata A, Traber LD, Enkhbaatar P. Time course of the inflammatory and oxidative stress response to pulmonary infection in mice. *Exp Lung Res*. 2012; 38:157-63.
  11. Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, Toko H, Akazawa H, Qin Y, et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*. 2004; 18:851-3.
  12. Gravante G, Ong S, Metcalfe M, Sorge R, Sconocchia G, Orlando G, et al. Cytokine response to ischemia/reperfusion injury in an ex vivo perfused porcine liver model. *Transplant Proc*. 2009; 41:1107-12.
  13. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg*. 2002; 26:115-21.
  14. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 125:261-72.
  15. Zhang Z, Pan C, Wang HZ, Li YX. Protective effects of osthole on intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Exp Clin Transplant*. 2014; 12:246-52.
  16. Serrick C, La Franchesca S, Giaid A, Shennib H. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152:277-82.
  17. Auclair S, Roth K, Saunders B, Ogborn K, Sheikh A, Naples J, et al. Interleukin-3-deficient mice have increased resistance to blood-stage malaria. *Infect Immun*. 2014; 192:1308-14.
  18. Kamenetz Y, Beloosesky Y, Zeltzer C, Gotlieb D, Magazani A, Fishman P, et al. Relationship between routine hematological parameters, serum IL-3, IL-6 and erythropoietin and mild anemia and degree of function in the elderly. *Aging (Milano)*. 1998; 10:32-8.
  19. Meldrum DR, Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Diltiazem restores IL-2, IL-3, IL-6, and IFN- $\gamma$  synthesis and decreases host susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J Surg Res*. 1991; 51:158-64.
  20. Xu YX, Wichmann MW, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage induces increased thymic apoptosis while decreasing IL-3 release and increasing GM-CSF. *J Surg Res*. 1997; 68:24-30.
  21. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 1992; 79:3101-9.
  22. Li S, Zhu FX, Zhang HB, Li H, An YZ. Pretreatment with interleukin-33 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Chin Med J (Engl)*. 2013; 126:1855-9.
  23. Clementsen T, Reikeras O. Cytokine patterns after tourniquet-induced skeletal muscle ischaemia reperfusion in total knee replacement. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008; 68:154-9.
  24. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol*. 1993; 143:453-63.
  25. Roy S, Das S, Munshi A, Kaul S, Jyothy A. Association of -1382A>G CCL11 gene variant with ischemic stroke, its subtypes and hemorrhagic stroke in a South Indian population. *Neurol India*. 2014; 62:387-92.
  26. Nishi T, Maier CM, Hayashi T, Saito A, Chan PH. Superoxide dismutase 1 overexpression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25:1312-24.
  27. Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, et al. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol*. 2005; 78:167-77.
  28. Naidu BV, Farivar AS, Woolley SM, Grainger D, Verrier ED, Mulligan MS. Novel broad-spectrum chemokine in-

- hibitor protects against lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23:128-34.
29. Richter JR, Sutton JM, Belizaire RM, Friend LA, Schuster RM, Johannigman TA, et al. Macrophage-derived chemokine (CCL22) is a novel mediator of lung inflammation following hemorrhage and resuscitation. *Shock*. 2014; 42:525-31.
30. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2013; 17:1439-60.
31. Levy JA. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. *J Immunol*. 2009; 182:3945-6.
32. Ritter M, Goggel R, Chaudhary N, Wiedenmann A, Jung B, Weith A, et al. Elevated expression of TARC (CCL17) and MDC (CCL22) in models of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 334:254-62.
33. Greaves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, et al. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus and activation-regulated chemokine are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:923-9.
34. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4<sup>+</sup> T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001; 108:1283-90.
35. Daemen MA, van't Veer C, Wolfs TG, Buurman WA. Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. *J Immunol*. 1999; 162:5506-10.
36. Sukhotnik I, Miselevich I, Lurie M, Nativ O, Coran AG, Mogilner JG. The time relationship between ipsilateral testicular ischemia and germ cell apoptosis in the contralateral testis in rat. *Pediatr Surg Int*. 2005; 21:512-6.

# The Changes of Pro-inflammatory Cytokines in Serum according to the Reperfusion Time after Ischemia of Left Common Iliac Artery in Mice

Kyung shin Park<sup>1</sup>, Sung Jae Kim<sup>1</sup>, Younkyoung Seo<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>*College of Nursing, Hanyang University*

---

**Abstract** : Ischemia-reperfusion injury arises from the restoration of blood supply after ischemia. Both reactive oxygen species and various cytokines produced by activated immune cells are the primary causal risk factors for ischemic injury.

Cytokines are intercellular signaling substances for regulating any infection, immune reactions and inflammation, and pro-inflammatory cytokines adversely affect any diseases through an increase in inflammatory reaction. This study was conducted to investigate whether the periods of reperfusion after ischemia result in any changes of pro-inflammatory cytokines in the serum, including IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, Eotaxin, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, IFN $\delta$ .

A total of 96 male mice aged at 12 weeks was used in this study, and the groups of ischemia were divided into the following three different groups: 2-hour, 4-hour, and 6-hour ischemia groups. For the object of ischemic injury, the left common iliac artery was clamped by vascular clamp, each ischemia group was subdivided into 5 different groups according to the periods of reperfusion: 0-, 2-, 4-, 8-, and 16-hour reperfusion time. Blood samples after general anesthesia were collected from the mice hearts, and the serum was separated from them. The concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, Eotaxin, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, TARC, IFN $\delta$ ) in the serum was measured by ELISA, and the following results were acquired.

The concentrations of the 13 pro-inflammatory cytokines were significantly different in accordance with the periods of ischemia and the reperfusion time. In 2-hour ischemia group, IL-1 $\alpha$  and IL-3 were increased compared to normal control group, and 12 cytokines were increased followed by reperfusion except for MIP-1 $\alpha$ . MCP-1 and TARC were expressed as the highest concentration in the 16-hour reperfusion time. In 4-hour ischemia group, TARC was significant differences with normal control group, and the concentration of 13 cytokines were decreased after 4-hour reperfusion time. In 6-hour ischemia group, IL-2, IL-3, MCP-1 and TARC were increased, compared to normal control group, and IL-3 and MCP-1 were increased in 16-hour reperfusion time.

To sum up, ischemia increased the pro-inflammatory cytokines compared to normal control group and in the 2-hour and 6-hour ischemia groups, IL-1 $\alpha$ , IL-3, MCP-1 and TARC were increased until the late reperfusion time.

---

**Keywords** : Mouse, Left common iliac artery, Ischemia, Reperfusion injury, Pro-inflammatory cytokine