

원거리 허혈양상화가 흰쥐의 간에서 HO-1과 HSP70, iNOS 발현에 미치는 영향

전수경^{1,2,†}, 서윤경^{1,†}, 백두진¹

¹한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실, ²서울대학교 의과대학 해부학교실

(2012년 11월 23일 접수, 2012년 12월 18일 수정접수, 2012년 12월 20일 게재승인, Published Online 30 December 2012)

간추림 : 허혈양상화는 허혈 전에 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 방법으로 장시간의 허혈 및 재관류 손상으로부터 조직을 보호하는데 효과적이다. 이에 저자들은 흰쥐의 다리에서 원거리 허혈양상화를 실시한 후, 간에서 발현되는 HO-1, HSP70, iNOS 단백질의 변화를 알아보하고자 본 실험을 실시하였다.

허혈양상화 처치는 35주령 된 흰쥐의 왼은엉덩동맥에서 5분 허혈과 5분 재관류를 3회와 10회 반복하여 실시하였다. 허혈양상화 후 재관류 0, 3, 6, 24, 72시간에 간에서 발현되는 HO-1, HSP70, iNOS 단백질의 변화는 면역조직화학염색과 Western blot 분석을 이용하여 알아보았고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

간에서 HO-1 발현은 허혈양상화 3회군과 10회군에서 재관류 72시간에 정상대조군보다 유의성 있게 증가하였다. HSP70 발현은 허혈양상화 3회군에서 재관류 6시간에 정상대조군보다 증가하였고, 재관류 72시간에는 정상대조군과 비슷하였다. 그리고 허혈양상화 10회군에서 HSP70 발현은 재관류 직후에 정상대조군보다 증가하였고, 재관류 24시간과 72시간에는 정상대조군보다 유의성 있게 감소하였다. iNOS 발현은 허혈양상화 3회군과 10회군에서 재관류 24시간에 정상대조군보다 유의성 있게 증가하였으나, 재관류 72시간에는 감소하였다.

본 실험결과를 종합해보면, 흰쥐의 왼은엉덩동맥에서 짧은 허혈과 재관류를 반복 실행하면, 간에서 재관류 초기에는 HSP70 발현이 증가하고, 재관류 72시간에는 HO-1 발현이 증가하며, iNOS 발현은 감소하는 것을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 허혈양상화, 간, HO-1, HSP70, iNOS

서 론

간은 혈액이 매우 풍부한 장기로, 간 절제술이나 이식술과 같은 외과적 수술 시 장시간의 허혈은 필수적이다. 허혈은 혈액손실을 줄일 수 있다. 그러나 허혈 후 동반되는 재관류는 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성을 증가시키고(Ikebe 등 2001), 대식세포를 활성화시켜 친염증 사이토카인의 분비를 증가시키며

(Yassin 등 2002), 호중성백혈구의 조직 내 침윤을 증가시켜 허혈손상을 악화시킨다(Carini와 Albano 2003). 허혈 및 재관류 동안 일어나는 조직 손상은 허혈양상화(ischemic preconditioning)에 의해 보호될 수 있다(Murry 등 1986). 허혈양상화는 산화자극을 감소시킬 수 있는 보호단백질을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Lai 등 2004).

HO-1(Heme Oxygenase-1)은 열충격단백질(heat shock protein; HSP)로, 허혈 및 재관류 손상과 관련되어 있다. 증가된 HO-1은 허혈 및 재관류에 의한 간세포의 세포자멸사(Nie 등 2002)와 염증(Hui 등 2007)을 감소시킨다고 알려져 있다.

또 다른 열충격 단백질인 HSP70은 정상체온 이상의 온도에 노출된 경우, 광범위하게 발현 및 합성되어 세포

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

† 공동 제1저자로 동등한 역할을 수행하였음.

교신저자 : 백두진 (한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)

전자우편 : paikdj@hanyang.ac.kr

내에서 단백질들의 변성을 막는 샤페론(chaperon)의 기능을 한다(Nam 등 2000). Lee 등(2001)은 hsp70.1 유전자 결핍 쥐보다 정상 쥐에서 급성 국소 뇌허혈시 손상이 감소한다고 하였다.

산화질소합성효소(nitric oxide synthase; NOS)는 L-arginine을 이용하여 산화질소(nitric oxide; NO)를 생성한다. NO는 잠재적인 혈관 이완제로 알려져 있으며, adenosine과 더불어 허혈양상화의 효과를 일으킨다(Cooney 등 2006). 허혈양상화 처치로 발생한 NO는 간이식시 혈관을 확장시켜, 허혈 후 재관류에 따른 호중백혈구와 부착단백질(adhesion molecule)의 결합을 억제하여 백혈구의 침윤을 방해한다(Compagnon 등 2005).

허혈양상화 효과는 Przyklenk 등(1993)의 결과와 같이 국소부위 뿐 아니라 다른 위치에서도 효과가 있다는 것이 증명되었다. 이를 원거리 허혈양상화(remote ischemic preconditioning)라고 한다. 이에 본 연구자들은 흰쥐의 다리에서 허혈 자극을 유도한 후 멀리 떨어져 있는 간에서 HO-1, HSP70, iNOS 단백질들이 어떻게 발현되는지를 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(샘타코 바이오, 한국)를 사용하여 정상대조군과 허혈양상화군으로 나누었으며, 허혈양상화군은 허혈양상화 횟수와 재관류 경과시간에 따라 세분하였다.

2. 허혈양상화 처치

우레탄(1.15 g/kg)을 15분 간격으로 2회 복강 내 주사하여 실험동물을 마취시켰다. 허혈양상화 처치는 왼은 엉덩동맥을 흰쥐용 혈관집계로 5분간 집어 허혈시키고, 혈관집계를 제거하여 5분간 재관류시켰다. 발바닥이 하얗게 변화되는 것으로 허혈을 확인하였고, 다시 붉게 변화되는 것으로 재관류를 확인하였다. 3회 또는 10회 허혈양상화 후 혈관집계를 제거하여 0시간, 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 동안 재관류시켰다. 재관류 경과 시간이 지난 후, 경추탈골로 희생시키고 간을 분리하였다.

3. Western blotting

분리한 간에 단백질 분해효소가 첨가된 lysis buffer (iNtRON biotechnology, Korea)를 3 mL/g 첨가하여 균

질화(homogenization) 시킨 뒤 단백질을 정량 분석하였다. 70 µg의 단백질을 6%와 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 분리시킨 뒤 PVDF membrane (Amersham Biosciences, UK)으로 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액(3% 탈지분유, 25 mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20)으로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 일차항체 mouse anti-rat HO-1 항체(1:1000, stressgen, Canada), mouse anti-human HSP70 항체(1:1000, BD, USA), rabbit anti-mouse iNOS 항체(1:1000, stressgen)로 4°C에서 하룻밤 동안 적용시켰다. 2차 항체 ECLTM anti-mouse IgG horseradish peroxidase 항체 또는 ECLTM anti-rabbit IgG horseradish peroxidase 항체(Amersham Biosciences, UK)를 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane을 ECLTM Western blotting detection reagent(Amersham Biosciences)로 1분 동안 반응시킨 후, 필름(Fuji X-Ray film, Japan)에 현상하였다. 밴드의 농도(density)는 Quantity one[®](Gel Doc 2000, Bio-rad Laboratory, Italy)을 이용하여 측정하였다.

4. 면역조직화학염색

80% 알코올로 함수과정을 거친 슬라이드를 3% 과산화수소 용액(3% hydrogen peroxide in methyl alcohol)으로 10분간 처리하여 내인성 과산화물의 활성을 억제시키고, 0.4% 펩신(pepsin, Sigma, USA) 용액으로 10분 동안 반응시켜 조직 내 항원을 노출시켰다. Blocking 용액(PBS, secondary antibody normal serum 15 µL/mL, 2% bovine serum albumin)으로 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 일차항체 goat anti-human HO-1 항체(1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA), goat anti-human HSP70 항체(1:30, Santa Cruz), rabbit anti-human iNOS 항체(1:30, Santa Cruz)를 blocking 용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이차항체 biotinylated rabbit-anti goat IgG 항체 또는 goat-anti rabbit IgG 항체(1:200, Vector Laboratory, USA)를 실온에서 40분 동안 적용시킨 후, ABC(Vector) 혼합용액을 실온에서 30분 동안 반응시켰다. DAB kit(Vector)으로 발색시키고, 1% methyl green으로 바탕염색을 하여, 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 사진을 찍어 관찰하였다. 음성대조군은 일차항체만을 처리하지 않은 동일한 과정으로 염색하였다.

5. 통계처리

측정값은 평균±SEM으로 표현하였으며, SigmaPlot

10.0을 이용하여 student's *t*-test로 통계처리 하고, *P*값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. Western blot 분석

1) HO-1 단백질 발현

허혈양상화 3회군에서, HO-1 발현은 재관류 0시간과 3시간에 정상대조군보다 감소하였고, 6시간 이후에는 정상대조군보다 증가되는 경향을 보였으나, 72시간에서만 유의성이 있었다 ($P < 0.05$) (Fig. 1A).

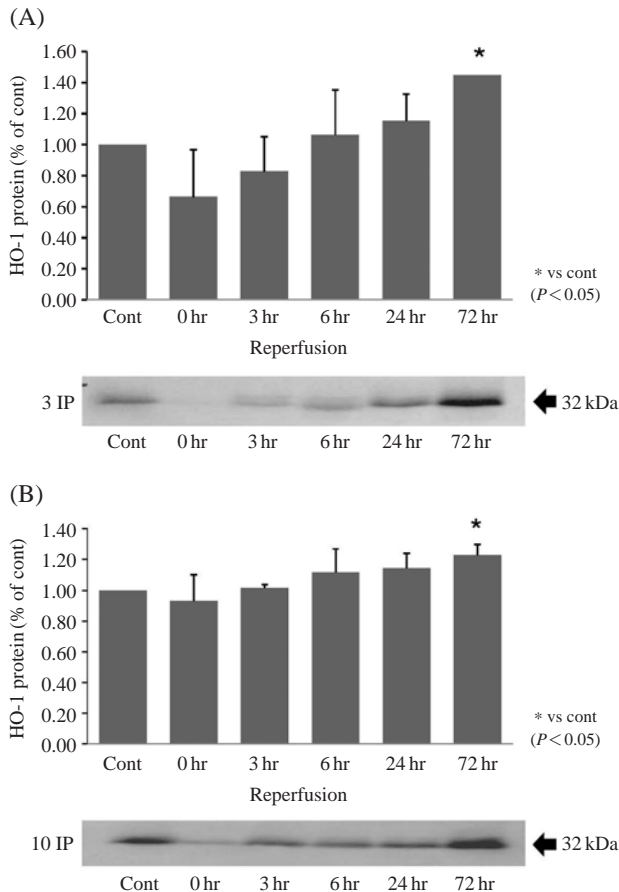


Fig. 1. HO-1 expression in rat liver after remote ischemic preconditioning (IP). The expression of HO-1 increased at 72 hours of reperfusion groups after 3 (A) and 10 (B) IP, compared with normal control groups. Value are means with the SEM shown by error bars for 6 animals at each point. * $P < 0.05$ compared with normal control group.

10회군에서, HO-1 발현은 재관류 3시간 이후에 정상대조군보다 증가되었으나, 72시간에서만 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1B).

2) HSP70 단백질 발현

허혈양상화 3회군에서, HSP70 발현은 재관류 3시간, 6시간, 24시간에는 정상대조군보다 유의성 있게 증가하였고 ($P < 0.05$), 72시간에는 다른 재관류군보다 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 2A).

10회군에서, HSP70 발현은 재관류 24시간과 72시간

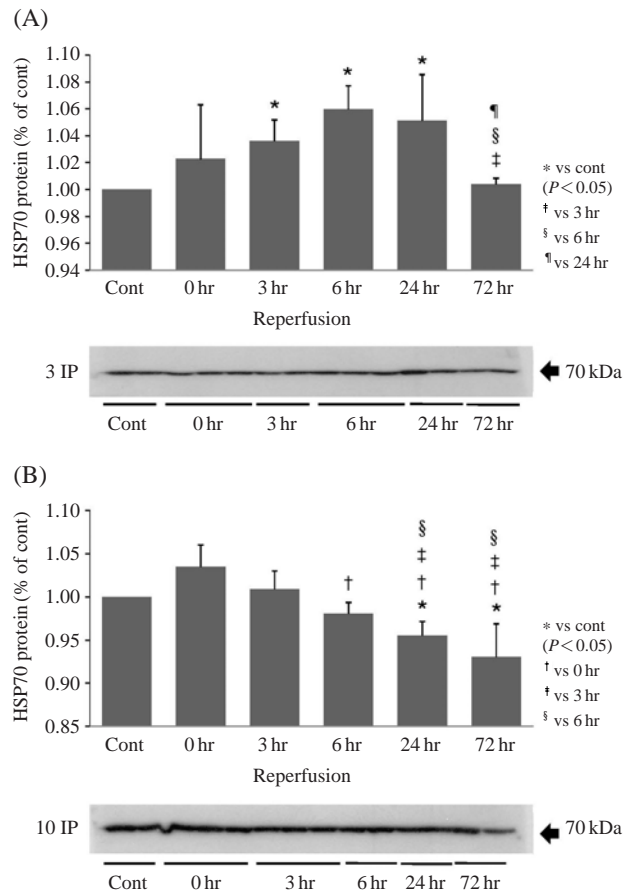


Fig. 2. HSP70 expression in rat liver after remote ischemic preconditioning (IP). (A): The expression of HSP70 increased at 3, 6, 24 hours of reperfusion groups after 3 IP, compared with normal control groups. (B): The expression of HSP70 increased at 0 hour of reperfusion groups after 10 IP, compared with normal control groups and decreased at 24 and 72 hours of reperfusion groups. Value are means with the SEM shown by error bars for 6 animals at each point. * $P < 0.05$ compared with normal control group, [†] $P < 0.05$ compared with 0 hr group, [‡] $P < 0.05$ compared with 3 hr group, [§] $P < 0.05$ compared with 6 hr group, [¶] $P < 0.05$ compared with 24 hr group.

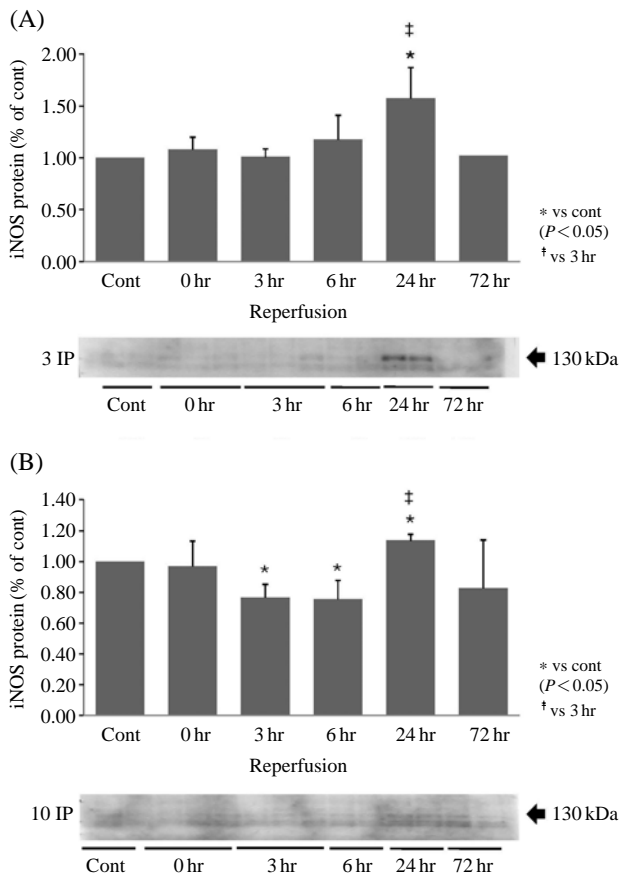


Fig. 3. iNOS protein expression in rat liver after remote ischemic preconditioning (IP). (A): The expression of iNOS increased at 24 hours of reperfusion groups after 3 IP, compared with normal control groups. (B): The expression of iNOS decreased at 3, 6 hours of reperfusion groups after 10 IP, compared with normal control groups, but increased at 24 hours of reperfusion groups after 10 IP, compared with normal control groups. (A): 3 IP, (B): 10 IP. Value are means with the SEM shown by error bars for 6 animals at each point. * $P < 0.05$ compared with normal control group, † $P < 0.05$ compared with 3 hr group.

에 정상대조군 및 재관류 0시간, 3시간, 6시간보다 유의성 있게 감소하였고 ($P < 0.05$), 재관류 6시간에 HSP70 발현은 재관류 0시간보다 유의성 있게 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 2B).

3) iNOS 단백질 발현

허혈양상화 3회군에서, iNOS 발현은 재관류 24시간에 정상대조군과 재관류 3시간보다 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 3A).

10회군에서, iNOS 발현은 재관류 3시간과 6시간에 정상대조군보다 유의성 있게 감소하였으나 ($P < 0.05$), 재관류 24시간에는 정상대조군과 재관류 3시간보다 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 3B).

2. 면역조직화학염색

1) HO-1

정상대조군에서 HO-1 발현은 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서만 관찰되었고, 간세포에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 4A). 허혈양상화군에서 HO-1 발현은 간세포와 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서 관찰되었고, 중심정맥 주변의 간세포에서 염색이 증가하였다. HO-1 발현은 허혈양상화 3회와 10회군에서 재관류 24시간과 72시간에 강하게 관찰되었다 (Fig. 4B-E).

2) HSP70

정상대조군에서 HSP70 발현은 간세포와 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서 관찰되었으며, 간세포가 주변보다 중심정맥 주변의 간세포에서 염색이 증가하였다 (Fig. 5A).

허혈양상화군에서 HSP70 발현은 간세포와 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서 관찰되었고, 간세포가 주변보다는 중심정맥 주변의 간세포에서 염색이 증가하였다. 허혈양상

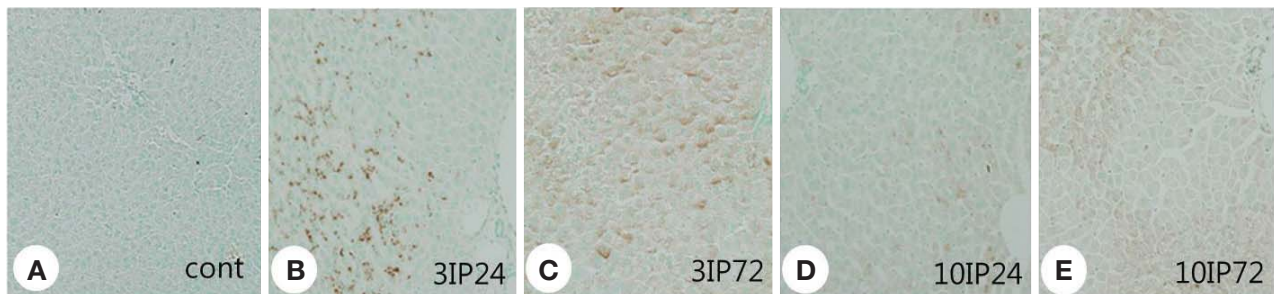


Fig. 4. Immunolocalization of HO-1 in rat liver after remote ischemic preconditioning (IP) (original magnification X20). A: HO-1 staining in normal control animals. B-E: HO-1 staining in 3IP24, 3IP72, 10IP24, 10IP72. 3IP: 3 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP, 24: 24 hours after IP, 72: 72 hours after IP.

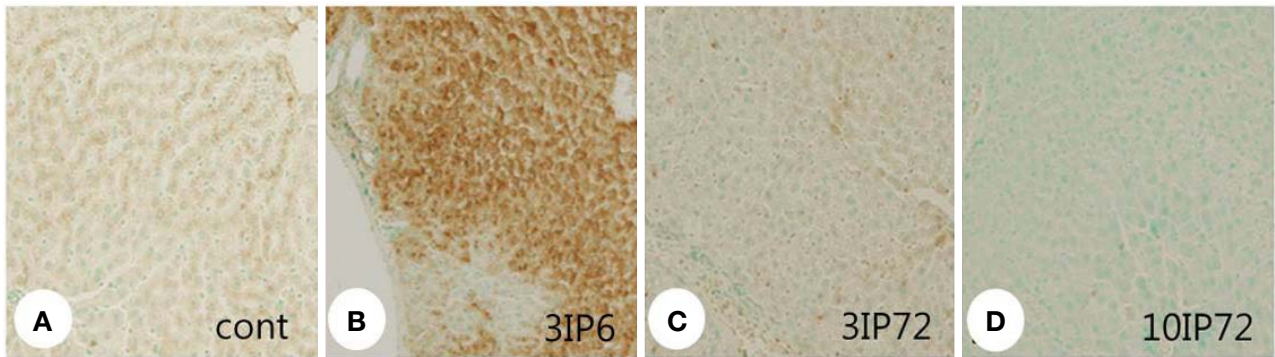


Fig. 5. Immunolocalization of HSP70 in rat liver after remote ischemic preconditioning (original magnification $\times 20$). A: HSP70 staining in normal control animals. B-D: HSP70 staining in 3IP6, 3IP72, 10IP72. 3IP: 3 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP, 6: 6 hours after IP, 72: 72 hours after IP.

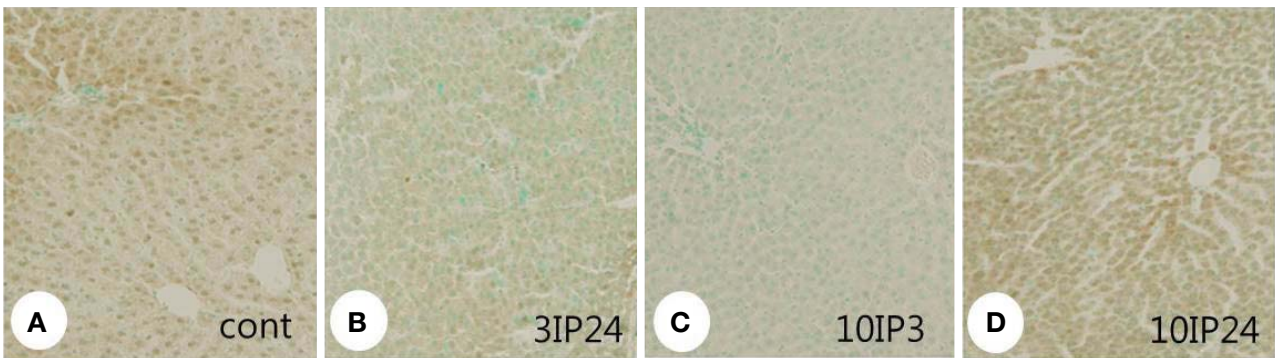


Fig. 6. Immunolocalization of iNOS in rat liver after remote ischemic preconditioning (original magnification $\times 20$). A: iNOS staining in normal control animals. B-D: iNOS staining in 3IP24, 10IP3, 10IP24. 3IP: 3 cycles of IP, 10IP: 10 cycles of IP, 3: 3 hours after IP, 24: 24 hours after IP.

화 3회군에서 HSP70 발현은 재관류 6시간에 간세포와 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서 가장 강하게 관찰되었고(Fig. 5B), 3회군과 10회군의 재관류 72시간에는 약하게 관찰되었다(Fig. 5C, D).

3) iNOS

정상대조군에서 iNOS 발현은 간세포에서 미약한 양성으로 관찰되었으며, 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서는 관찰되지 않았다(Fig. 6A).

허혈양상화군에서 iNOS 발현은 간세포와 쿠퍼세포(사진 미첨부)에서 관찰되었다. 3회군의 재관류 24시간에 iNOS 발현은 정상대조군보다 약하게 관찰되었다(Fig. 6B). 10회군의 재관류 3시간에 iNOS 발현은 정상대조군보다 약하게 관찰되었고(Fig. 6C), 재관류 24시간에 정상대조군보다 강하게 관찰되었다(Fig. 6D). 간세포에서 발현된 iNOS는 허혈양상화 3회군보다 10회군에서

강하게 관찰되었다(Fig. 6).

고 찰

본 실험에서, 흰쥐의 원온영덩동맥에서 혈관집계를 사용하여 실시한 원거리 허혈양상화는 간에서 보호단백질들의 발현을 유도하였다.

간경화를 일으킨 흰쥐에 HO-1 유도자인 hemin을 투여하고 허혈과 재관류를 실시하면, hemin을 투여하지 않은 간보다 활성산소기가 감소되며, 염증과 세포자멸사도 감소되었다. 이는 허혈과 재관류 시 HO-1이 항산화 효소인 MnSOD를 증가시키고, NF- κ B의 활성을 감소시키며 caspase-3의 발현을 억제시키는 데 관련이 있음을 보여준다(Hui 등 2007). 또한, 흰쥐의 넓다리동맥에서 실시한 허혈양상화는 간에서 HO-1 mRNA의 발현을 증가

시킨다고 보고되었다(Lai 등 2006).

본 실험에서도, 원거리 허혈양상화를 실시하면 간에서 HO-1 발현이 유도되었다. 3회군에서는 재관류 초기에는 감소되었으나, 재관류 6시간 이후 대조군보다 점차 증가하였고, 72시간에는 유의성 있게 증가되었으며, 10회군에서는 재관류 3시간 이후부터 점차 증가하였다. 따라서, 재관류 초기부터 HO-1 발현이 유도되었으며, 정상대조군보다 증가한 것을 알 수 있었다. Terry 등(1999)은 사람의 내피세포를 친염증 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 α 에 노출시키면 활성산소종의 발생으로 HO-1 mRNA가 증가된다고 하였다. 본 실험에서도 다리에서의 허혈양상화가 간세포에서 활성산소기와 염증성 매개물을 증가시켰을 것이라 생각하며, Hui 등(2007)과 Lai 등(2006)의 결과처럼, 증가된 HO-1 발현은 재관류로 증가된 활성산소기와 염증성 매개물을 감소시킬 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위해 허혈양상화 후 간에서 발현되는 염증 관련 인자들과 세포손상 그리고 활성산소기의 생성정도를 확인하는 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

분자량 70kDa의 HSP70은 허혈 및 재관류에 의해 유도된다(Latchman 2001, Kim 등 2005). Kume 등(1996)은 흰쥐의 간생장자인데에서 15분 허혈양상화 후 48시간 뒤에 30분 동안 허혈시키고 40분 동안 재관류시키면, 간세포 내에 HSP70이 증가하여 간 기능을 회복시키고, 생존율도 증가시킨다고 하였다. 그리고 허혈시간이 너무 긴 경우에는 재관류 후에도 HSP70이 발현되지 않는다고 했다. 또한, Kim 등(2005)은 허혈 및 재관류시 HSP70의 발현이 감소하여 세포자멸사가 증가한다고 하였다. 그러나, Sakai 등(2003)은 3시간의 허혈은 간세포의 세포자멸사를 증가시키며, HSP70 단백질과 HSP70 mRNA를 감소시킨다고 하였다. 본 실험에서는 원거리 허혈양상화를 3회 반복한 후, HSP70 발현이 재관류 6시간에 간에서 최대로 증가한 이후 감소하기 시작했으나, 모든 재관류 군에서 정상대조군보다 증가하였다. 그러나, 10회군에서 HSP70 발현은 재관류 0시간에 최대로 증가한 이후에 감소하기 시작하여 재관류 후기에는 정상대조군보다도 감소하였다.

본 실험의 허혈양상화 3회군에서 HSP70 발현은 Kume 등(1996)과 Kim 등(2005)의 결과처럼 증가되었고, 이는 허혈양상화로 발생하는 활성산소기로부터 간세포를 보호하는데 관여할 것이라 생각된다. 그러나 허혈양상화 10회군에서는 HSP70 발현이 증가되지 않았는데 이는 허혈양상화 횟수를 증가시켜도 HSP70의 발현이 증가되지 않는다는 Qian 등(1999)의 실험결과와 일치하였다. 또한, Sakai 등(2003)의 실험결과처럼 10회의 반복

적인 허혈은 HSP70 발현을 감소시켰다. 이는 10회의 허혈양상화가 다량의 활성산소기를 생성하여 간세포 손상을 유도할 것으로 생각된다. 또한 10회의 허혈양상화 군에서 재관류 후기까지 HO-1 발현이 증가된 것은 3회군 보다 많은 활성산소기가 유도된 결과라 생각된다.

허혈양상화 또는 허혈은 NOS를 증가시켜 NO를 합성하는 것으로 알려져 있으며, 허혈 또는 허혈양상화 과정에서 생성되는 활성산소종은 NO와 빠르게 결합하여 세포독성이 있는 ONOO⁻를 발생시킬 수 있다(Ha 등 2004). 열충격단백질에 속하는 HO-1은 헴(heme) 분자를 일산화탄소(carbon oxide; CO), free iron, biliverdin으로 분해하는 촉매 효소로(Vesely 등 1998), 많은 양의 NO는 세포독성을 증가시키면서, HO-1의 증가를 유도한다고 하였다(Hoetzel 등 2001). Katori 등(2002)은 허혈 또는 산화자극으로 HO-1이 활성화되면 이차적으로 CO의 생성이 증가하는데, 이는 iNOS의 발현을 억제시켜 NO의 생성을 감소시킨다고 하였다. 또한 Datta 등(1999)은 사구체신염이 있는 쥐의 사구체에서는 iNOS mRNA 발현이 증가되어 NO의 생성과 HO-1의 발현을 증가시키나, HO-1에 의해 생성된 CO는 iNOS를 불활성시키고, iron은 iNOS의 전사를 방해한다고 하였다. Zhang 등(2003)은 흰쥐의 담관을 결찰하여 간허파증후군(hepatopulmonary syndrome)을 유도하면 간세포에서 HO-1의 활성이 증가되어 iNOS의 발현이 감소된다고 하였으나, HO 억제제를 투여하면 iNOS의 발현이 증가되며 간세포 손상이 증가된다고 하였다.

본 실험 결과, 원거리 허혈양상화 3회군과 10회군 모두에서 iNOS 발현은 재관류 24시간에 정상대조군보다 증가되었다가 72시간에 대조군 수준으로 감소되었다. 한편 HO-1 발현은 원거리 허혈양상화 3회와 10회군에서 모두 재관류 72시간에 정상대조군보다 증가되어 있었다. 이는 Datta 등(1999)의 실험결과처럼 재관류 72시간에 증가된 HO-1 발현이 iNOS 발현을 감소시켰을 것이라 생각되며, Zhang 등(2003)의 실험결과처럼 증가된 HO-1은 활성산소기로부터 간세포를 보호할 것이라 생각할 수 있었다.

또한, 원거리 허혈양상화 3회군과 10회군에서 재관류 초기에 iNOS 발현은 대조군 수준으로 유지되었고, HSP70 발현이 증가되어 있었다. Wang 등(2006)은 과발현된 HSP70은 세포의 미세구조 손상을 감소시키고, iNOS의 활성을 변화시켜 NO 생성을 감소시킨다고 하였다. Datta 등(1999)도 미약한 또는 중등도의 허혈손상이 있을 때는 HSP70이 증가되어 세포를 보호하지만, 장시간의 허혈로 다량의 활성산소기가 생성되는 경우에는 HO-1이

증가되어 세포를 보호한다고 하였다. 본 실험에서도 재관류 초기에 증가된 HSP70 발현과 후기에 증가된 HO-1 발현이 간세포를 활성산소기로부터 보호하는데 관여할 것이라 생각된다.

그러나, 본 실험에서는 원거리 허혈양상화 후 재관류 시간에 따라 간에서 HO-1과 HSP70, iNOS 발현만을 관찰하였기 때문에, 앞으로 HO-1과 HSP70이 세포를 보호하는데 관여하는지를 확인하고 iNOS가 세포손상에 직접 영향을 주는지 연구해야 할 것이다.

본 실험결과를 종합해보면, 흰쥐의 왼온영덩동맥에서 짧은 허혈과 재관류를 반복 실행하면, 간에서 재관류 초기에 HSP70 발현이 증가하였으며, 재관류 72시간에는 HO-1 발현이 증가되며, iNOS 발현은 감소되는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*. 2003; 125:1480-91.
- Compagnon P, Lindell S, Ametani MS, Gilligan B, Wang HB, Dalessandro AM, et al. Ischemic preconditioning and liver tolerance to warm or cold ischemia: experimental studies in large animals. *Transplantation*. 2005; 79: 1393-400.
- Cooney R, Hynes SO, Duffy AM, Sharif F, O'Brien T. Adenoviral-mediated gene transfer of nitric oxide synthase isoforms and vascular cell proliferation. *J Vasc Res*. 2006; 43:462-72.
- Datta PK, Koukouritaki SB, Hopp KA, Lianos EA. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:2540-50.
- Ha SJ, Kim JH, Park SS, Kim IK, Baek WY, Lim DG. Change of plasma xanthine oxidase activity by intermittent hepatic ischemia-reperfusion. *Korean J Anesthesiol*. 2004; 47:692-7. Korean.
- Hoetzel A, Vagts DA, Loop T, Humar M, Bauer M, Pahl HL, et al. Effect of nitric oxide on shock-induced hepatic heme oxygenase-1 expression in the rat. *Hepatology*. 2001; 33:925-37.
- Ikebe K, Kato T, Yamaga M, Hirose J, Tsuchida T, Takagi K. Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. *J Surg Res*. 2001; 99:1-6.
- Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*. 2002; 73:287-92.
- Kim JK, Yang HJ, Jung JH, Kim YI, Noh KC, Kang YJ, et al. HSP70 Gene Expression after Mild Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. *J Korean Soc Emerg Med*. 2005; 16:137-43. Korean.
- Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats : implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med*. 1996; 128:251-8.
- Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Tsai HW. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2006; 81:1311-7.
- Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation*. 2004; 77:1004-8.
- Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*. 2001; 51:637-46.
- Laude K, Favre J, Thuillez C, Richard V. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284:H2053-60.
- Lee SH, Kim MH, Yoon BW, Kim YJ, Ma SJ, Roh JK, et al. Targeted hsp 70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 2001; 32:2905-12.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74:1124-36.
- Nam KW, Kim JS, Choi JH. A study in heat shock protein 70. *J Korean Soc Phys Ther*. 2000; 12:147-51. Korean.
- Nie RG, McCarter SD, Harris KA, Lee PJ, Zhang X, Bihari A, et al. The role of endogenous heme oxygenase in the initiation of liver injury following limb ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 2002; 36:624-30.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993; 87:893-9.
- Qian YZ, Bernardo N, Nayeem MA, Chelliah J, Kukreja RC. Induction of 72-kDa heat shock protein does not produce second window of ischemic preconditioning in rat heart. *Heart Circ Physiol*. 1999; 45:H224-34.
- 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.
- Terry CM, Cliekman JA, Hoidal JR, Callahan KS. TNF-alpha

- and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca^{2+} , and phospholipase A_2 in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1999; 276:H1493-501.
- Vesely MJ, Exon DJ, Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: heme and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am J Physiol.* 1998; 275:C1087-94.
- Wang WL, Li Y, Kuang JS, Zhao T, Liu P. Increased heat shock protein 70 expression in the pancreas of rats with endotoxic shock. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:780-3.
- Xue H, Guo H, Li YC, Hao ZM. Heme oxygenase-1 induction by heme protects liver cells from ischemia/reperfusion injury in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:5384-90.
- 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.
- Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, et al. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology.* 2003; 125:1441-51.

Changes in HO-1, HSP70 and iNOS Expressions in the Rat Liver after Remote Ischemic Preconditioning

Su-Kyung Jeon^{1,2,†}, Youn-Kyoung Seo^{1,†}, Doo-Jin Paik¹

¹Department of Anatomy & Cell Biology, School of Medicine, Hanyang University

²Department of Anatomy, School of Medicine, Seoul National University

Abstract : Ischemic preconditioning (IP), short pre-treatment sublethal ischemia, induces a state of protection against subsequent prolonged ischemia-reperfusion. The purpose of this study was to investigate the expression of HO-1, HSP70, and iNOS proteins in the liver subjected to the courses of reperfusion after repetitive cycles of remote IP in the rat.

Using thirty five week-old rats, the remote preconditioning was undertaken by vascular clamp occlusion of blood flow to one hindlimb, with 3 and 10 cycles of 5 minutes occlusion followed by 5 minutes reperfusion. The liver was removed 0, 3, 6, 24, and 72 hours of reperfusion after remote IP and assayed by immunohistochemical staining and Western blotting analyses for anti-HO-1, anti-HSP70, and anti-iNOS antibodies.

The expression of HO-1 in rat liver increased at 72 hours of reperfusion groups after 3 and 10 cycles of remote IP, compared with normal control groups. The expression of HSP70 in rat liver increased at 6 hours of reperfusion groups after 3 cycles of remote IP, compared with normal control groups. The expression of HSP70 in rat liver increased at 0 hour of reperfusion groups after 10 cycles of remote IP, compared with normal control groups and decreased at 24 and 72 hours of reperfusion groups. The expression of iNOS in rat liver increased at 24 hours of reperfusion groups, but decreased at 72 hours of reperfusion groups after 3 and 10 cycles of remote IP, compared with normal control groups.

In summary, these results showed that at early phase of reperfusion after remote IP, HSP70 expression was increased in rat liver. However, at 72 hrs of reperfusion after remote IP, HO-1 expression was increased and iNOS expression was decreased in rat liver.

Keywords : Ischemic preconditioning, Liver, HO-1, HSP70, iNOS

[†]These authors contributed equally to this work.

Correspondence to : Doo-Jin Paik (Department of Anatomy & Cell Biology, School of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea)
E-mail : paikdj@hanyang.ac.kr