

## 반복적인 허혈양상화가 흰쥐의 앞정강근과 가자미근에서 산화질소합성효소 발현에 미치는 영향

고봉철, 서윤경, 신주옥<sup>1</sup>, 전수경, 백두진

한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실,

<sup>1</sup>연세대학교 문리대학 생명과학과

**간추림** : 산화질소합성효소(nitric oxide synthase, NOS)는 산화질소 생성에 필요한 효소로, 허혈손상에 영향을 준다고 알려져 있다. 이에 본 연구자들은 흰쥐의 백색근육과 적색근육섬유에서 허혈양상화가 산화질소합성효소의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

9주령의 SD계 수컷 흰쥐를 대조군과 허혈양상화 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 재판류 0시간, 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 허혈양상화는 흰쥐의 온영덩동맥을 5분 허혈과 5분 재판류를 반복 실시하였고, 재판류 시간에 따라 실험동물을 희생시켜 앞정강근과 가자미근을 적출하였다. nNOS와 iNOS, eNOS를 관찰하기 위해 Western blot analysis와 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

허혈양상화 후 nNOS는 대조군보다 증가되었고, 앞정강근에서는 3회군과 6회군이 10회군보다 높게 관찰되었다. 허혈양상화 후 iNOS의 증가는 가자미근보다 앞정강근에서 더 높게 관찰되었고, 10회군에서 가장 높게 관찰되었다. 허혈양상화 후 eNOS는 대조군보다 증가되었고, 앞정강근보다 가자미근에서 더 높게 관찰되었다. 재판류 0시간과 3시간에 eNOS는 허혈양상화 6회군과 10회군에서 높게 관찰되었다.

이상의 실험결과로 허혈양상화는 nNOS와 iNOS, eNOS를 증가시키고, 10회의 허혈양상화는 iNOS를 증가시켜 허혈손상을 일으킬 것으로 생각되며, 앞정강근이 가자미근보다 허혈자극에 민감하게 반응한다고 판단되었다.

**찾아보기 낱말** : 허혈양상화, 흰쥐, 앞정강근, 가자미근, 산화질소합성효소

### 서론

뼈대근육은 백색근육섬유와 적색근육섬유, 중간근육섬유들이 적절히 혼합되어 구성된 조직으로, 근육섬유의 특성에 따라 수축력과 피로도, 효소들의 분포가 다르다고 알려져 있다. Woitaske와 McCarter (1998)는 백색근육섬유가 허혈자극에 쉽게 손상을 받는다고 하였고, Seo 등(2003)도 흰쥐의 온영덩동맥을 4시간 허혈시켰을 때 가자미근보다 앞정강근에서 세포자멸사가 더 많이 관찰된다고 하였다. 그러나 근육섬유의 종류와 허혈손상은 관계가 없다는 의견도 있으며 (Sternbergh와 Adelman 1992), 적색근

육섬유가 허혈손상을 많이 받는다는 의견도 있다 (Gurke 등 2000).

뼈대근육은 허혈에 내성이 있는 것으로 알려져 있으나, 4시간 이상의 허혈에는 비가역적인 세포손상이 생길 수 있고 (Idström 등 1990), 다른 장기의 기능부전이나 사망을 일으킬 수도 있다고 알려져 있다 (Blaisdell 2002). 허혈 뒤 재판류 기간에 백혈구의 침윤과 칼슘의 과도한 축적, 에너지의 고갈 등으로 뼈대근육의 손상이 일어난다 (Pang 등 1993).

허혈 전에 짧은 허혈과 재판류를 실시하는 허혈양상화 (ischemic preconditioning, IPC)는 심장 (Murry 등 1986)과 뼈대근육에서 (Mattei 등 2000) 허혈손상을 감소시키며, 이러한 현상을 허혈양상화의 보호효과 (protective effect) 또는 허혈내성 (ischemic toler-

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

ance)이라 한다. 허혈양상화의 보호효과와 관련된 전사인자나 유전자들에 대한 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 허혈양상화 보호효과와 관련된 산화질소합성효소(nitric oxide synthase, NOS)와 산화질소(nitric oxide, NO)에 대한 관심이 높아지고 있다.

산화질소합성효소는 NO가 생성되는데 필요한 효소로, neuronal NOS (nNOS)와 inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)가 알려져 있다. nNOS는 주로 신경계와 뼈대근육에서 관찰되고(Geller와 Biliary 1998), iNOS는 큰포식세포와 비만세포(mast cell)에서 주로 관찰되나, 스트레스 자극이 있는 경우에는 다른 세포에서도 관찰되며(Granger 등 1988), eNOS는 심장근육세포와 혈관의 내피세포에서 주로 관찰된다고 알려져 있다(Stewart 등 1994). Punkt 등(2001, 2002)은 3 종류의 NOS가 모두 뼈대근육에서 관찰되며, NOS에 의해 생성된 NO는 근육의 수축력과 긴장도 조절, 당이용 등을 조절하는데 중요하다고 하였으나, Reid (1998)는 과도한 NO는 근육세포의 손상을 유도한다고 하였다. 허혈양상화는 흰쥐 심장관과 신장에서 NOS를 증가시켜 허혈손상을 감소 또는 증가시킨다고 알려져 있고(Jefayri 등 2000, Muscari 등 2004), 뼈대근육에서도 NOS에 의해 생성된 NO가 허혈손상을 감소 또는 증가시킨다고 알려져 있다(Hussain 등 1997, Tidball 등 1998, Muscari 등 2004).

이에 본 연구자들은 허혈양상화 횡수의 증가가 흰쥐의 뼈대근육에서 관찰되는 NOS의 분포를 어떻게 변화시키는지 알아보고자, 5분 허혈과 5분 재관류하는 과정을 3회와 6회, 10회 실시하여 하였으며, 근육섬유의 종류에 따라 NOS의 발현에 차이가 있는지 관찰하기 위해, 85% 이상이 백색섬유로 구성된 흰쥐의 앞정강근과 98% 이상이 적색섬유로 구성된 흰쥐의 가자미근을(Amstrong과 Phelps 1984) 이용하여 비교 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

9주령의 SD계 수컷 흰쥐(Daehan Biolink, Korea)

를 사용하여 정상대조군과 허혈양상화 횡수에 따라 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 재관류 직후(0시간), 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 실험 중 사망한 실험동물은 실험결과에서 제외하였고, 각 군당 6마리씩 모두 96마리의 실험동물을 사용하였다(Table 1).

### 2. 실험처치

우레탄을 생리식염수에 희석하여 15분 간격으로 2회 복강주사하여 (1.15 g/kg) 실험동물을 마취시키고, 배안을 연 후 왼은엉덩동맥을 흰쥐용 혈관집게

**Table 1.** Effects of ischemic preconditioning on mortality

Group		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
Group	cont	0/6				
	3IP	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	6IP	0/6	0/6	0/6	0/6	4/10
	10IP	0/6	0/6	0/6	0/6	4/11

The number of rats died/total number of rats are shown in the table.

Abbreviations

3IP: 3 times of ischemic preconditioning

6IP: 6 times of ischemic preconditioning

10IP: 10 times of ischemic preconditioning

**Table 2.** Immunoreactivities of nNOS in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (hr)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	±				
	3IP	+	±	±	±	+++
	6IP	±	+	+	±	+
	10IP	+	±	±	+	+
Sol	cont	±				
	3IP	+	+	±	±	++
	6IP	±	+	+	±	++
	10IP	+	±	±	+	±

Abbreviations

TA: tibialis anterior muscle

Sol: soleus muscle

cont: control

3IP: 3 times of ischemic preconditioning

6IP: 6 times of ischemic preconditioning

10IP: 10 times of ischemic preconditioning

±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity,

++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

**Table 3.** Immunoreactivities of iNOS in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (hr)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	±				
	3IP	+	++	++	++	+
	6IP	++	++	+	+	+
	10IP	++	++	+++	+++	++
Sol	cont	±				
	3IP	±	+	+	±	+
	6IP	±	+	±	±	±
	10IP	++	+	±	±	±

Abbreviations

TA: tibialis anterior muscle  
 Sol: soleus muscle  
 cont: control  
 3IP: 3 times of ischemic preconditioning  
 6IP: 6 times of ischemic preconditioning  
 10IP: 10 times of ischemic preconditioning  
 ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity,  
 ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

로 5분 허혈, 5분 재관류를 3회, 6회, 10회 반복하여 허혈양상화를 실시하였다. 혈관집계를 제거한 뒤 재관류 0시간과 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 뒤에 목척추탈골방법으로 실험동물을 희생시켜 왼쪽의 앞정강근과 가자미근을 척출하였다. 정상대조군의 실험동물은 배안을 연 후 아무런 처치를 하지 않았고, 실험 전 과정동안 전기담요를 이용하여 실험동물의 체온을 유지시켜 주었다. 척출한 근육의 몸쪽 부분은 Western blot analysis을, 먼쪽부분은 면역조직화학염색을 시행하여 NOS를 관찰하였다.

**3. 면역조직화학염색**

Xylene과 에탄올을 이용하여 파라핀절편에서 파라핀을 제거 및 함수시킨 뒤, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 1차 증류수로 세척하였다. 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액으로 5분, 0.4% 펩신 용액 (Sigma, USA)으로 실온에서 8분 동안 반응시켰다.

Mouse blocking 용액 (PBS, 2% bovine serum albumin, 말의 정상혈청 15 µL/mL)으로 37°C에서 1시간 처리한 뒤, mouse anti-nNOS antibody (1 : 150, BD

**Table 4.** Immunoreactivities of eNOS in rat tibialis anterior and soleus muscles of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (hr)				
		0	3	6	24	72
TA	cont	+				
	3IP	++	++	++	+	+
	6IP	+	++	++	±	+
	10IP	++	±	+++	+++	+++
Sol	cont	+				
	3IP	+	++	+	++	+
	6IP	+	+++	+	±	+
	10IP	+	±	±	+	±

Abbreviations

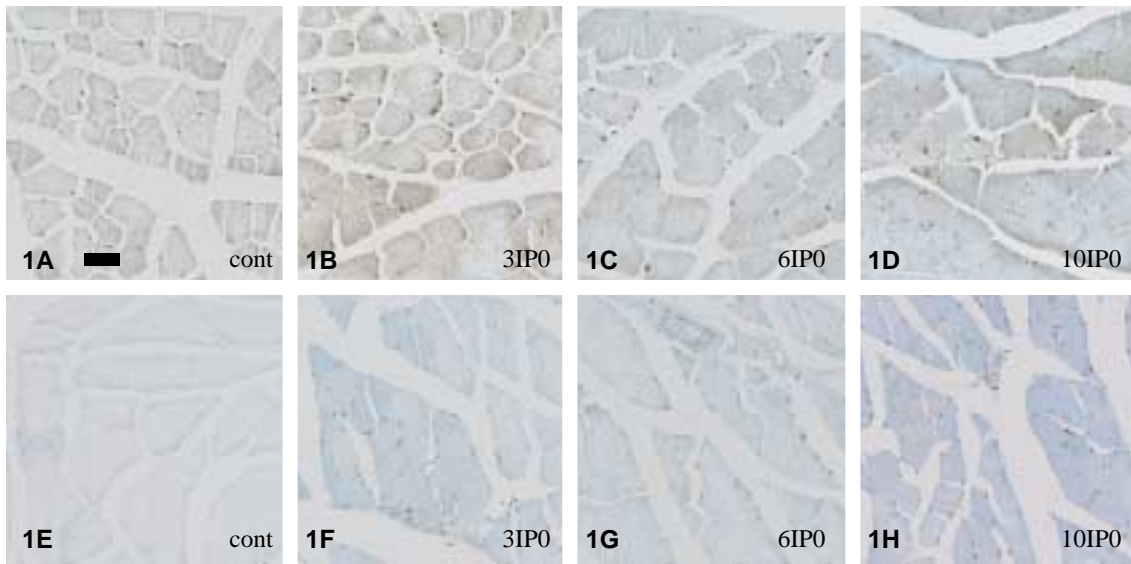
TA: tibialis anterior muscle  
 Sol: soleus muscle  
 cont: control  
 3IP: 3 times of ischemic preconditioning  
 6IP: 6 times of ischemic preconditioning  
 10IP: 10 times of ischemic preconditioning  
 ±: trace immunoreactivity, +: weak immunoreactivity,  
 ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity

Biosciences, USA), mouse anti-iNOS antibody (1 : 200, Santa Cruz, USA), mouse anti-eNOS antibody (1 : 150, BD Biosciences, USA)를 각각 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 2차 항체, horse anti-mouse IgG antibody (1 : 1,000)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory, USA)으로 실온에서 30분 동안 처리하였다. DAB kit (Vector Laboratory, USA)를 이용하여 발색시켰으며, 1% methyl blue 용액으로 대조염색 후 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다.

근육의 중심부를 사진촬영하여 면역염색반응 정도에 따라, 음성반응(-), 미약한 양성반응(±), 경도의 양성반응(+), 중등도 양성반응(++), 강한 양성반응(+++)으로 정하여 Table 2와 3, 4에 정리하였다.

**4. Western blot analysis**

단백질분해효소 억제제가 포함된 단백질추출용액 (iNtRON Biotechnology, Korea)을 근육조직 0.05 g 당 1 mL씩 첨가한 뒤 homogenizer (Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 균질화



**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of nNOS in rat skeletal muscles. Intensity of the immunoreactivities of nNOS (nNOS) were presented in Table 2. In TA, ischemic preconditioning (IP) increased nNOS (B~D), compared with control (A), but in Sol, nNOS showed no differences. nNOS in Sol (E~H) were weaker than those in TA (A~D). cont: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP, TA: tibialis anterior muscle, Sol: soleus muscle. Scale bar=50 $\mu$ m ( $\times$ 200).

시킨 뒤 원심분리하여 상층액을 얻었다.

상층액에서 40  $\mu$ g의 단백질을 취하여 6% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리시킨 뒤, Hybond<sup>TM</sup>-P membrane (Amersham Biosciences, England)에 이동시켰다. Membrane을 3% blocking 용액 (TBST: 25 mM Tris, 8% NaCl, 0.1% Tween-20, 3% non-fat dry milk)으로 실온에서 1시간 처리한 뒤, 1차 항체 anti-mouse nNOS antibody (1 : 500), anti-mouse iNOS antibody (1 : 500), anti-mouse eNOS antibody (1 : 1,000) (BD Biosciences, USA)를 blocking 용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 처리하였다. TBST로 5분씩 3회 세척한 뒤 2차 항체 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Amersham Biosciences)를 각각 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 TBST로 세척한 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence) 용액 (Amersham Biosciences)을 1분 동안 처리하여 x-ray 필름에 노출시켰다. Quantity one<sup>®</sup> 프로그램 (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Italy)을 이용하여 관찰

된 band의 농도 (density)를 측정하였다.

통계처리는 Sigma Plot 10.0 (SYSTAT Software Inc., USA)을 이용하여, 대조군과 허혈양상화 3회, 6회, 10회군을, 그리고 앞정강근과 가자미근을 대상으로 student *t*-test를 실시하였다.

## 결 과

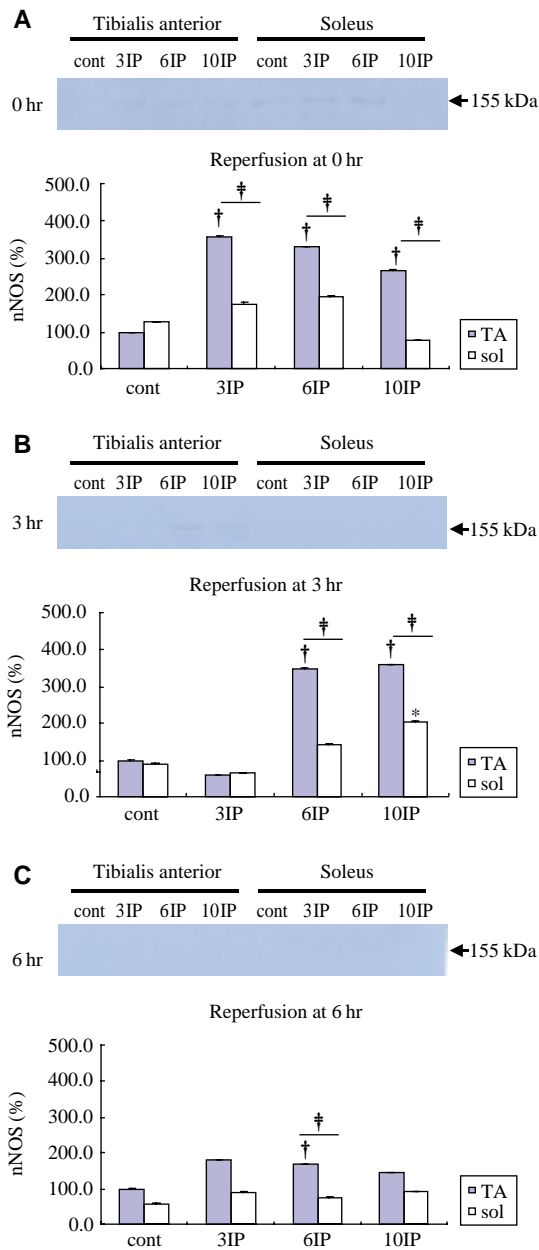
### 1. 허혈양상화가 실험동물의 사망률에 미치는 결과

재관류 72시간에 6회군과 10회군에서 사망률이 증가하였다 (Table 1).

### 2. 허혈양상화가 nNOS에 미치는 영향

#### 1) 면역조직화학염색

nNOS의 면역조직화학염색반응 (nNOS)은 근육형 질막과 근육형질에서 주로 관찰되었다. 허혈양상화로 nNOS는 증가하였으며, 가자미근보다는 앞정강근



**Fig. 2.** Western blot analysis of nNOS in rat skeletal muscles. A: 0 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 3 hrs after IP, C: 6 hrs after IP. Values are means  $\pm$  SD. <sup>†</sup> $P < 0.05$ , different from cont of TA; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , different from cont of sol; <sup>‡</sup> $P < 0.05$ , different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

에서 다소 강하게 관찰되었고, 허혈양상화 횟수에 따른 차이는 크지 않았다 (Table 2, Fig. 1).

## 2) Western blot analysis

재관류 0시간에 (Fig. 2A), 앞정강근과 가자미근에서 관찰된 nNOS는 허혈양상화 후 대조군보다 증가하였고 (앞정강근:  $P < 0.05$ ), 10회군이 3회군이나 6회군보다 낮게 관찰되었다. 또한 nNOS는 가자미근보다 앞정강근에서 높게 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ). 재관류 3시간에 (Fig. 2B), nNOS는 6회군과 10회군에서 대조군보다 증가하였고, 가자미근보다 앞정강근에서 높게 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ). 재관류 6시간에 (Fig. 2C), 허혈양상화군의 nNOS는 대조군보다 증가하였고, 가자미근보다 앞정강근에서 높게 관찰되었다. 재관류 24시간과 72시간에, nNOS는 가자미근보다 앞정강근에서 높게 관찰되었으나, 큰 차이는 없었다.

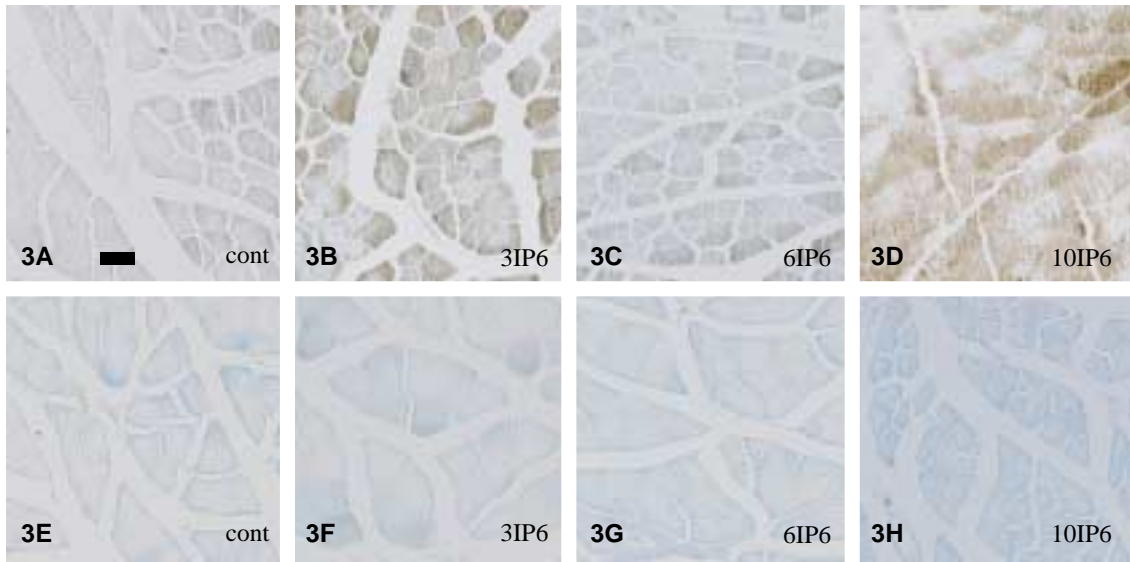
## 3. 허혈양상화가 iNOS에 미치는 영향

### 1) 면역조직화학염색

iNOS의 면역조직화학염색반응 (iNOS)은 근육형질막과 근육형질에서 관찰되었다. 앞정강근에서 관찰된 iNOS는, 10회군에서 가장 강하게 관찰되었으며, 가자미근에서는 횟수에 따른 차이가 크지 않았고, 가자미근보다 앞정강근에서 강하게 관찰되었다 (Table 3, Fig. 3).

### 2) Western blot analysis

재관류 0시간에, 앞정강근에서 iNOS는 10회군에서 가장 높게, 가자미근에서는 대조군과 비슷한 수준으로 관찰되었다. 재관류 3시간에, 앞정강근에서 iNOS는 대조군보다 증가, 가자미근에서는 감소하였으며, 10회군에서 가자미근보다 앞정강근에서 iNOS가 높게 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ). 재관류 6시간에 (Fig. 4A), 앞정강근에서 iNOS는 대조군보다 증가되었고, 6회군과 10회군의 iNOS는 앞정강근에서 높게 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ). 재관류 24시간에 (Fig. 4B), 허혈양상화는 iNOS를 대조군보다 증가시켰고, 10회군이 가장 높게 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ). 6회와 10회군에서 관찰된 iNOS는 앞정강근에서 높게 관찰되었다. 재관류 72시간에 (Fig. 4C), iNOS는 가자미근보다 앞정



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining of iNOS in rat skeletal muscles. Intensity of the immunoreactivities of iNOS (iNOS) were presented in Table 3. In TA, ischemic preconditioning (IP) increased iNOS (B~D), compared with control group (A), iNOS in 10IP (D) were stronger, compared with 3IP (B) and 6IP (C). In Sol, increased iNOS (F~H), compared with control (E), but iNOS showed no differences among the IP groups. cont: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP, TA: tibialis anterior muscle, Sol: soleus muscle. Scale bar=50  $\mu$ m ( $\times$ 200).

강근에서 높게 관찰되었다.

#### 4. 허혈양상화가 eNOS에 미치는 영향

##### 1) 면역조직화학염색

eNOS의 면역조직화학염색반응(eNOS)은 근육형질막과 근육형질, 그리고 혈관내피세포에서 주로 관찰되었고, 허혈양상화는 eNOS를 증가시켰다. 앞정강근에서 eNOS는 재관류초기에 허혈양상화 3회군과 6회군에서 높게 관찰되었고, 가자미근에서도 재관류 초기에 높게 관찰되었다. eNOS는 가자미근보다 앞정강근에서 강하게 관찰되었다(Table 4, Fig. 5).

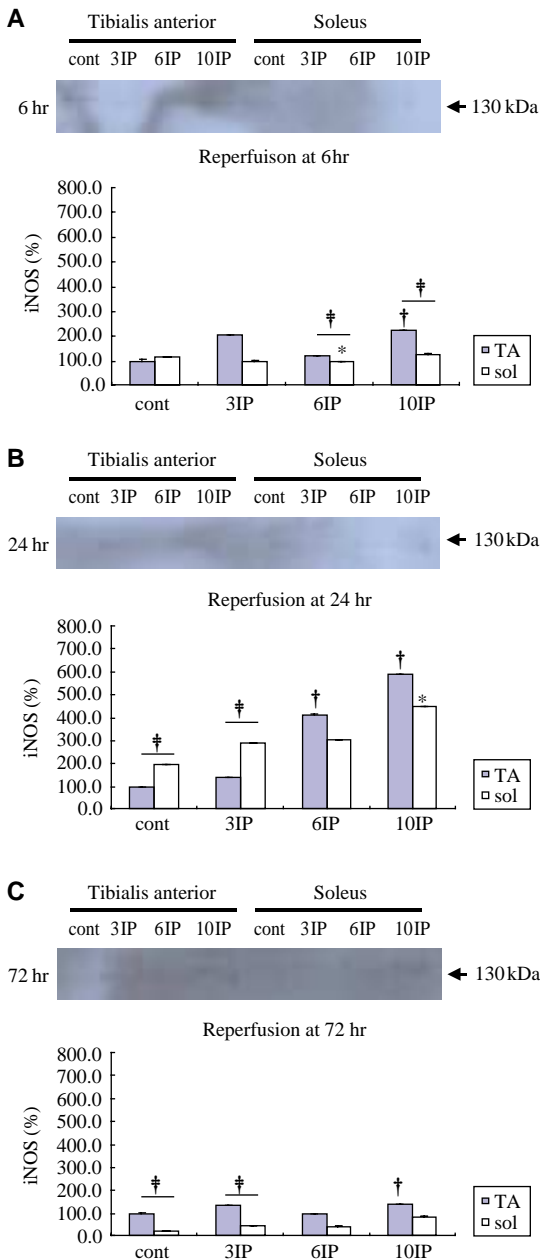
##### 2) Western blot analysis

재관류 3시간에 (Fig. 6A), 앞정강근에서 관찰된 eNOS는 3회군과 10회군에서는 대조군보다 증가하였고( $P < 0.05$ ), 가자미근에서 eNOS는 6회군과 10회군에서 대조군보다 증가하였다. 3회군을 제외하고는 앞정강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었다. 재관류 6시간에 (Fig. 6B), 앞정강근에서 관찰된 eNOS

는 허혈양상화 후 대조군보다 증가하였고, 가자미근에서는 6회군과 10회군에서 증가하였으며( $P < 0.05$ ), eNOS는 앞정강근보다 가자미근에서 높게 관찰되었다(10회군:  $P < 0.05$ ). 재관류 24시간에 (Fig. 6C), 허혈양상화 후 앞정강근에서 eNOS는 증가하였으나, 앞정강근과 가자미근의 차이는 크지 않았다.

## 고 찰

본 실험에서 허혈양상화 횟수의 증가는 재관류 72시간에 실험동물의 사망을 증가시켰는데, 실험동물이 사망한 원인은 뼈대근육 자체의 손상보다는 Blaisdell (2002)의 의견처럼 반복적인 허혈양상화로 다른 장기의 기능부전을 일으킨 결과로 생각되었다. 또한 재관류 24시간 이후에 허혈양상화 3회군보다 6회군과 10회군에서 비만세포가 많아지는 것으로 보아(결과에 포함시키지 않음) 허혈양상화 횟수를 늘릴수록 염증반응이 증가되는 것으로 생각된다.



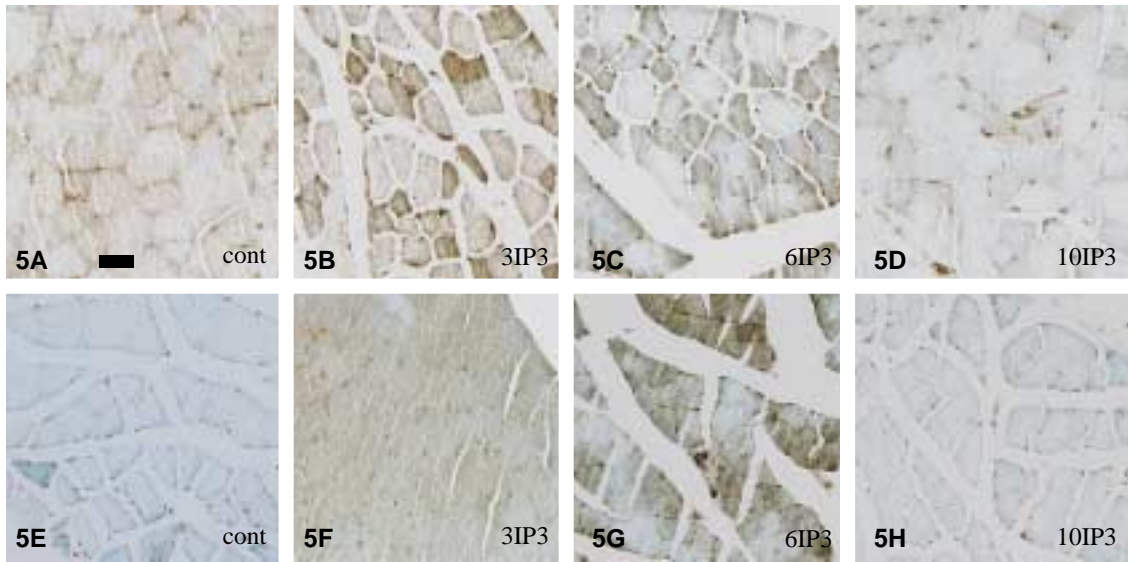
**Fig. 4.** Western blot analysis of iNOS in rat skeletal muscles. A: 6 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 24 hrs after IP, C: 72 hrs after IP. Values are means  $\pm$  SD. † $P < 0.05$ , different from cont of TA; \* $P < 0.05$ , different from cont of sol; ‡ $P < 0.05$ , different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

Granger 등(1988)의 의견처럼 비만세포의 증가는 iNOS를 증가시켜 국소적 또는 전신적인 영향을 주었을 것이며, 염증세포와 함께 동반되어 나타나는 다른 병태생리적 반응들도 실험동물의 사망률을 증가시켰을 것으로 생각된다.

nNOS는 뼈대근육이 손상되거나(Rubinstein 등 1998), 운동을 할 때(Balon과 Nadler 1997) 증가된다고 알려져 있다. Tidball 등(1998)은 걷지 않던 흰쥐를 다시 걷게 하면 뼈대근육에서 nNOS가 감소되고, 염증반응이 증가하며, 쉽게 손상을 받는다고 하였고, 운동후 48시간이 지나 nNOS가 정상수준으로 돌아오며 근육세포를 보호한다고 하였다. 본 실험에서 앞정강근의 3회군과 10회군에서 관찰된 nNOS는 6회군보다 높게 관찰되었다. 가자미근에서 관찰된 nNOS는 대조군과 허혈양상화군에 따른 차이는 크지 않았다. Balon과 Nadler(1997) 그리고 Rubinstein 등(1998)의 의견을 고려하면, 허혈양상화 자극에 대한 반응으로 앞정강근과 가자미근에서 nNOS가 증가된 것으로 생각되었다. Rudnick 등(2004)은 근육을 사용하지 않던 환자가 다시 운동을 할 경우 가쪽넓은근에서 nNOS가 의미있게 증가하나, 가자미근에서는 대조군과 차이가 없다고 하였는데, 본 실험에서도 앞정강근에서는 허혈양상화의 반복으로 재관류 초기에 nNOS가 증가하였으나, 가자미근에서는 변화가 크지 않았고, 가자미근보다 앞정강근에서 nNOS가 더 많이 관찰되었다.

iNOS는 비만세포, 대포식세포, 호중성구세포에서 관찰되고, iNOS에서 생성된 NO는 항원을 파괴시켜 개체를 보호한다고 알려져 있다(Granger 등 1988). 그러나 iNOS에 의해 많은 양의 NO가 생성되면 세포호흡과 효소활성이 억제되고 세포손상을 유도한다고 알려져 있다(Welter 등 1996).

Kane 등(2001)은 iNOS에 의해 생성된 NO가 근육피판술(free flap surgery)의 성공률을 높인다고 하였다. Sakamoto 등(2006)도 안구의 압력을 높여 망막을 허혈시키면 손상이 일어나나, 허혈양상화를 실시하면 iNOS가 증가되어 허혈손상이 감소된다고 하였고, iNOS 억제제를 투여하면 허혈양상화의 보호효과가 사라진다고 하였다. 그러나, Hussain 등(1997)은 뼈대근육의 질병이나 손상시 iNOS mRNA



**Fig. 5.** Immunohistochemical staining of eNOS in rat skeletal muscles. Intensity of the immunoreactivities of eNOS (eNOS) were presented in Table 4. After ischemic preconditioning (IP), eNOS were increased (B~D, F~H), compared with control (A, E). eNOS in the 10IP (D, H) were weaker than those in the 3IP (B, F) and 6IP (C, G). In TA (B~D), eNOS were stronger than those in Sol (F~H), after IP. cont: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP, TA: tibialis anterior muscle, Sol: soleus muscle. Scale bar=50  $\mu$ m ( $\times$ 200).

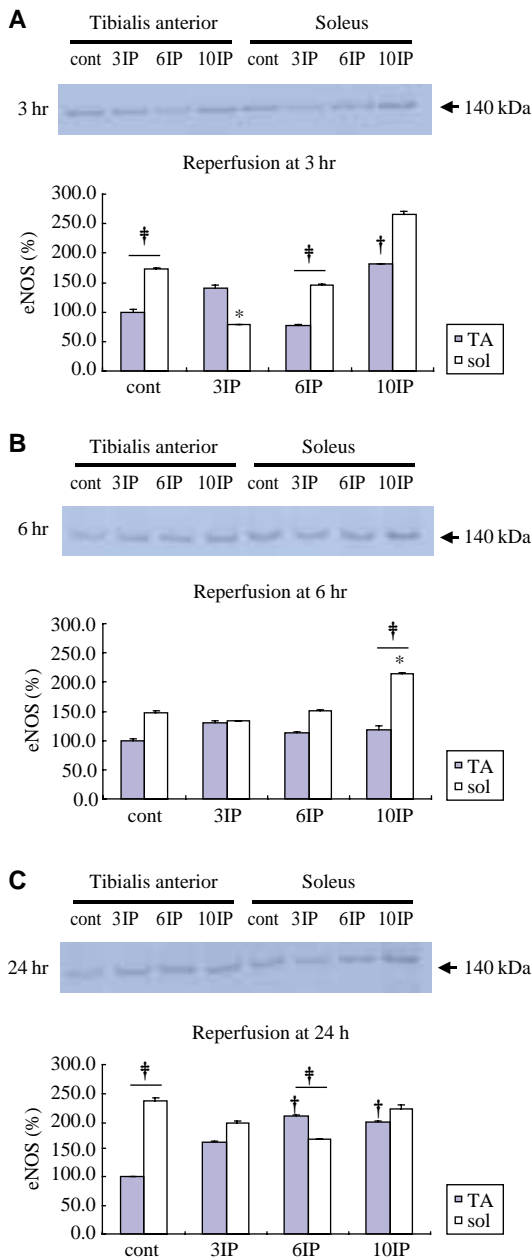
가 증가된다고 하였고, Mungreu 등(2002)은 iNOS가 과발현된 생쥐의 심장을 허혈시키면 대조군보다 부정맥이 증가된다고 하였다. Zhang 등(2003)은 흰쥐의 고환올림근을 5시간 허혈하는 실험에서, 재관류 10분 전에 iNOS 억제제를 투여하면 모세혈관의 직경과 혈류가 증가하고, 근육괴사와 부종, 울혈과 혈관손상이 감소된다고 하였다. 이들은 뼈대근육의 허혈 및 재관류가 iNOS를 선택적으로 증가시키며 이때 생성된 NO가 허혈 손상을 유도한다고 하였다. 본 실험에서 재관류 6시간과 24시간에 iNOS는 대조군보다 증가되었으며, 재관류 72시간에 iNOS는 감소하였다. 그리고, iNOS는 가자미근보다 앞정강근에서 더 많이 관찰되었고, 허혈양상화 10회군에서 3회군이나 6회군보다 높게 관찰되었다.

여러 연구자들의 의견을 고려하면, 허혈과 재관류에 대한 반응으로 iNOS가 증가되며, 허혈양상화 횟수가 증가 할수록 iNOS가 증가되는 결과와 허혈양상화 6회군과 10회군에서 실험동물이 사망한 것

로 보아, iNOS 증가는 Hussain 등(1997)과 Mungreu 등(2002), Zhang 등(2003)의 의견처럼, 뼈대근육의 손상과 염증반응을 유도하는데 관여할 것이라 생각된다. 본 실험에서 재관류 24시간과 72시간에 iNOS가 다시 증가되었는데, 이 때 증가된 iNOS는 재관류 24시간 이후에 나타나는 second window 현상(Lochner 등 2002)의 보호작용을 억제했을 것으로 생각되며, 실험동물의 사망에도 영향을 주었을 것으로 생각된다. 그리고 iNOS가 더 많이 관찰된 앞정강근이 가자미근보다 허혈에 쉽게 손상받을 수 있다고 생각되었다.

eNOS에 의해 생성되는 NO는 iNOS에 의해 생성되는 NO보다 짧은 시간 동안 조직내에 존재하며, 세포를 보호하는 작용을 한다고 알려져 있다(Jugdutt 2002). Muscari 등(2004)은 흰쥐의 심장을 30분 허혈시키면 eNOS가 감소한다고 하였고, 허혈양상화는 허혈군에서 eNOS의 감소와 심장근육세포의 손상을 예방한다고 하였고, 허혈시 eNOS의 농도 유지





**Fig. 6.** Western blot analysis of eNOS in rat skeletal muscles. A: 3 hr after ischemic preconditioning (IP), B: 6 hrs after IP, C: 24 hrs after IP. Values are means  $\pm$  SD. † $P < 0.05$ , different from cont of TA; \* $P < 0.05$ , different from cont of sol; ‡ $P < 0.05$ , different between TA and sol. cont: control, TA: Tibialis anterior, sol: Soleus, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

는 허혈양상화 보호효과에 필요하다고 하였다. 본 실험에서 eNOS는 재관류 직후와 24시간에 대조군보다 증가하였고, 3시간과 6시간, 72시간에는 대조군과 비슷하였다. 재관류 직후 증가된 eNOS는 재관류 3~6시간에 일어나는 허혈손상(Blaisdell 2002)을 감소시킬 것이라 생각되었고, Jugdutt (2002)와 Muscari 등(2004)의 의견을 고려하면 감소된 eNOS는 허혈시 뼈대근육의 손상을 유도할 것으로 생각되며, eNOS가 앞정강근보다 가자미근에서 더 높게 관찰된 것으로 보아 가자미근이 허혈자극에 더 효과적으로 대처할 수 있을 것이라 생각되었다. 허혈양상화 10회군에서 eNOS의 증가는 3회군이나 6회군보다 느리게 시작하고, 증가 폭도 크지 않은 것으로 보아, 3회군이나 6회군보다 허혈양상화 보호효과가 효과적으로 유도되지 않을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 허혈손상을 유도하는 NO의 양을 직접 측정하지는 못했기에, 앞으로 생성되는 NO를 확인하는 과정과, NOS의 변화와 NO를 증가 또는 감소가 직접적으로 관련이 있는지 알아보아야 할 것이다. 또한 증가된 NO와 허혈손상의 관계를 알아보고, 허혈양상화가 뼈대근육에서 일어나는 장시간의 허혈손상을 감소시킬 수 있는지, 그리고 전신적인 영향을 주는지 알아보기 위해 심장이나 신장, 간 등에 어떤 변화가 생기든지 알아보아야겠다.

본 실험에서, 허혈양상화의 증가는 흰쥐의 뼈대근육에서 nNOS와 iNOS, eNOS를 증가시켰으며, nNOS와 iNOS는 앞정강근에서, eNOS는 가자미근에서 많이 관찰되었다. 허혈양상화 횟수가 증가될수록 허혈손상을 감소시킨다고 알려진 nNOS와 eNOS의 증가가 늦게 시작되고 iNOS의 증가가 큰 것으로 보아, 증가된 iNOS가 허혈손상을 일으키는데 관여할 것으로 생각되었고, 가자미근이 앞정강근보다 허혈손상에 더 저항성을 가질 것으로 생각되었으며, 장시간 지속되는 허혈이나 수술시 iNOS를 선택적으로 억제한다면 조직의 허혈손상을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고 문헌

Amstrong RB, Phelps RO : Muscle fiber type composition of

- the rat hindlimb. *Am J Anat* 171: 259-272, 1984.
- Balon TW, Nadler JL : Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 82: 359-363, 1997.
- Blaisdell FW : The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 10: 620-630, 2002.
- Geller DA, Billiar TR : Molecular biology of nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev* 17: 7-23, 1998.
- Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT : Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81: 1129-1136, 1988.
- Gurke L, Marx A, Sutter PM, Stierli P, Harder F, Heberer M : Function of fast- and slow-twitch rat skeletal muscle following ischemia and reperfusion at different intramuscular temperatures. *Eur Surg Res* 32: 135-141, 2000.
- Hussain SN, Giaid A, El Dawiri Q, Sakkal D, Hattori R, Guo Y : Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 173-180, 1997.
- Idström JP, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 258: H1668-1678, 1990.
- Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT : Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 85: 1007-1013, 2000.
- Jugdutt BI : Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Failure Reviews* 7: 391-405, 2002.
- Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DR, Romero R, Messina A, Wagh M, Fraulin FO, Morrison WA, Stewart AG : Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 132: 1631-1638, 2001.
- Lochner A, Marais E, Toit ED, Moolman J : Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 962: 402-414, 2002.
- 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.
- Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M : Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 109: 735-743, 2002.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986.
- Muscari C, Bonafe' F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, Guarnieri C, Caldarera CM : Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart. *Life Sci* 74: 1127-1137, 2004.
- Pang CY, Forrest CR, Mounsey R : Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery* 14: 176-182, 1993.
- Punkt K, Zaitsev S, Park JK, Wellner M, Buchwalow IB : Nitric oxide synthase isoforms I, III and protein kinase-C $\eta$  in skeletal muscle fibres of normal and streptozotocin-induced diabetic rats with and without Ginkgo biloba extract treatment. *Histochem J* 33: 213-219, 2001.
- Punkt K, Zaitsev S, Wellner M, Schreiter T, Fitzl G, Buchwalow IB : Myopathy-dependent changes in activity of ATPase, SDH and GPDH and NOS expression in the different fibre types of hamster muscles. *Acta Histochem* 104: 15-22, 2002.
- Reid BM : Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 162: 401-409, 1998.
- Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS : Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 101: 1325-1333, 1998.
- Rudnick J, Puttmann B, Tesch PA, Alkner B, Schoser BG, Salanova M, Kirsch K, Gunga HC, Schiffli G, Luck G, Blotner D : Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J* 18: 1228-1230, 2004.
- Sakamoto K, Yonoki Y, Kubota Y, Kuwagata M, Saito M, Nakahara T, Ishii K : Inducible nitric oxide synthase inhibitors abolished histological protection by late ischemic preconditioning in rat retina. *Experimental Eye Research* 82: 512-518, 2006.
- 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)
- Sternbergh WC 3rd, Adelman B : Skeletal muscle fiber type does not predict sensitivity to posts ischemic damage. J Surg Res 53: 535-541, 1992.
- Stewart AG, Phan LH, Grigoriadis G : Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. Microsurgery 15: 693-702, 1994.
- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M : Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. Am J Physiol 275: C260-266, 1998.
- Welter R, Yu L, Yu CA : The effects of nitric oxide on electron transport complexes. Arch Biochem Biophys 331: 914, 1996.
- Woitasko MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. Plast Reconstr Surg 102: 2052-2063, 1998.
- Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR : Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. J Appl Physiol 94: 1473-1478, 2003.

Abstract

## Effects of Repetitive Ischemic Preconditioning on the Expression of Nitric Oxide Synthase in Tibialis Anterior and Soleus Muscles of the Rat

Bong-Cheol Koh, Youn-Kyoung Seo, Chu-Ok Shin<sup>1</sup>,  
Soo-Kyung Chun, Doo-Jin Paik

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

<sup>1</sup>*Department of Life Science, College of Liberal Arts and Science, Yonsei University, Wonju.*

---

Nitric oxide synthases (NOSs) that catalyzed the conversion of L-arginine to nitric oxide and L-citrulline play a role in ischemic-reperfusion injury. The purpose of this study was to observe the expression patterns of nNOS, iNOS and eNOS in the rat tibialis anterior and soleus muscles after multiple cyclic episodes of ischemic preconditioning (IP).

Nine weeks old male SD rats were divided into control and IP groups. The IP group was further divided into 3 groups based on cycle of IP. For IP, left common iliac artery was occluded 3, 6 and 10 times for 5 minutes ischemia followed by 5 minutes reperfusion using rodent vascular clamps. The animals were sacrificed at 0, 3, 6, 24 and 72 hours of reperfusion and the left tibialis anterior and soleus muscles were removed. The expression of nNOS, iNOS and eNOS were examined with immunohistochemical methods and Western blot analysis.

IP increased the expression of nNOS, compared with the control. In the tibialis anterior muscle, the levels of nNOS in the 3IP and 6IP were higher than that in 10IP. IP increased the expression of iNOS, compared with the control, and the levels of iNOS in tibialis anterior muscle were higher than that in soleus muscle. The level of iNOS in the 10IP was higher than those in the 3IP and 6IP. IP increased the expression of eNOS, compared with the control, and the level of eNOS in soleus muscle were higher than that in tibialis anterior muscle. At 0 and 3 hours after reperfusion, the level of eNOS in 6IP and 10IP were higher than that in 3IP.

In summary, these results suggest that the ischemic preconditioning increases the expression of nNOS, iNOS and eNOS, and 10 times of ischemic preconditioning may induce ischemic injury through upregulation of iNOS. And tibialis anterior muscle is more susceptible to ischemic injury than soleus muscle.

---

**Key words** : Ischemic preconditioning, Rat, Tibialis anterior, Soleus, NOS