

원온엉덩동맥에서의 짧은 허혈과 재관류 횟수에 따른 흰쥐 신장에서의 전염증성 사이토카인의 발현 변화

박현주, 김원규, 윤지희, 백두진
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 이 실험은 다리에서 짧은 허혈 횟수의 증가와 재관류 경과시간에 따라 멀리 위치한 신장에서 나타나는 NF- κ B와 전염증성 사이토카인, 세포간부착분자의 발현 변화를 알아보기 위하여 실시하였다.

35주령의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 사용하여 대조군과 허혈양상화군으로 나누었고, 허혈양상화 처치는 원온엉덩동맥에서 5분 허혈과 5분 재관류를 3회, 6회, 10회 실시하였다. 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 경과 후 왼쪽 신장을 적출하여 세포자멸사를 관찰하고, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 단백질에 대한 면역조직화학염색과 Western blot 분석을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

허혈양상화 처치군에서는 처치 횟수가 증가될수록, 재관류 24시간 경과 후 사망률이 높아졌다. NF- κ B는 재관류 0시간부터 24시간까지는 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 가장 높게 발현했으나, 72시간에서는 3회 처치군에서 가장 높게 발현하였다. TNF- α 는 재관류 0시간과 6시간, 24시간, 72시간에서는 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 가장 높게 발현했으나, 3시간에는 모든 처치군이 비슷한 면역반응을 보였다. IL-1 β 와 ICAM-1은 모든 재관류 시간에 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 가장 높게 발현하였다. 바깥속질에서의 세포자멸사는 모든 재관류 시간에 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 비율이 가장 크게 나타났다.

흰쥐 신장에서 허혈 및 재관류 손상에 관여되는 NF- κ B와 TNF- α , IL-1 β , ICAM-1의 발현은 원온엉덩동맥에서 허혈양상화를 3회와 6회 처치시 감소되었으나, 10회 처치시에는 증가되어 허혈손상을 증가시키는 것으로 생각되었다.

찾아보기 낱말 : 짧은 허혈과 재관류, 신장, proinflammatory cytokine, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, ICAM-1

서 론

최근에 알려진 원격 허혈양상화(remote ischemic preconditioning)는 국소부위의 허혈양상화가 멀리 떨어진 장기를 허혈 및 재관류 손상으로부터 보호하는 현상을 나타내는 것으로 이와 같은 허혈양상화의 보호효과는 초기와 후기단계로 나타나 초기단계는 수 분에서 2~3시간까지 방어가 지속되며, 후기단계는 12시간 후에 발생하여 3~4일간 지속되는 방어가 나타난다(Konstantinov 등 2004). 그러나 허혈양상화 처치 횟수가 증가하면 흰쥐의 경우 사망

률이 높아진다고 Seo 등(2006)이 보고하였다.

허혈 및 재관류시 발생하는 조직 손상의 첫째 원인으로 염증 작용을 들 수 있으며(Bonventre와 Zuk 2004), 전염증성 사이토카인들은 염증을 유발하고 증가시키는데 주요한 역할을 한다(Badolato와 Oppenheim 1996).

TNF- α 와 IL-1 β 는 염증 작용에서 중심 역할을 하는 전염증성 사이토카인들로, 허혈 및 재관류 상태에서는 활성화된 내피 세포들이 발현하는 세포표면 수용체와 결합한다(Majewska 등 1997). 이렇게 수용체에 결합한 TNF- α 와 IL-1 β 는 NF- κ B-inducing kinase (NIK)를 활성화시켜, 정상 상태에서 I(inhibitor)- κ B와 복합체를 형성하여 세포질에서 비활성 형

태로 존재하는 NF- κ B로부터 I- κ B를 분리시키고, 분리된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 TNF- α , IL-1, IL-6 같은 전염증성 사이토카인의 유전자들과 세포간부착분자인 ICAM-1의 전사를 자극하여 이들의 발현을 유도한다. 유도된 TNF- α 와 IL-1 같은 전염증성 사이토카인들은 다시 NF- κ B를 활성화시킨다 (Hiasa 등 2001, Zhong 등 2004).

허혈 및 재관류는 이러한 경로를 반복하여 integrin, selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1과 vascular cell adhesion molecule (VCAM) 같은 부착분자들의 발현을 증가시킨다. 활성화된 혈관 내피 세포들에서 증가되는 ICAM-1은 백혈구의 CD11/CD18과 상호작용하여 백혈구를 내피 세포에 부착시키는 데 (Haq 등 1998), 이는 염증세포의 과도한 침착을 유도하여 세포 손상을 가중시키게 한다 (Burne 등 2001). 이러한 내피세포와 백혈구의 상호작용은 신장에서 겔질보다 바깥속질에서 훨씬 넓은 범위로 나타난다 (Bonventre와 Zuk 2004).

이에 본 연구자들은 흰쥐의 온엉덩동맥의 허혈양상화 처치 횟수에 따라 신장에서 나타나는 전염증성 사이토카인 활성화와 세포간부착분자 발현의 상관관계를 규명하기 위하여, 35주령 흰쥐의 온엉덩동맥 (left common iliac artery)에서 허혈양상화를 처치한 후, 허혈양상화 횟수와 재관류 시간의 증가에 따른 신장 바깥 속질에서의 전염증성 사이토카인의 발현 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

35주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하여 정상대조군과 허혈양상화군으로 나누었다. 허혈양상화군은 짧은 허혈과 재관류의 반복 횟수에 따라 3회, 6회, 10회군으로 나누었고, 재관류시간이 경과됨에 따라 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간군으로 세분하였다. 실험처치기간 동안 사망한 실험동물을 제외하고 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다 (Fig. 1).

2. 실험동물 처치

모든 실험처치는 생리식염수에 희석한 우레탄 (Urethane, 1.15 g/kg)을 2회 복강주사하여 실험동물을 마취시킨 후 실시하였다. 허혈양상화군은 개복 후 흰쥐용 혈관집게 (rodent vascular clamp)를 이용하여 온엉덩동맥에서 5분 허혈과 5분 재관류를 3회, 6회, 10회 실시하여 허혈양상화를 실시하였다. 정상대조군은 개복 후 아무런 처치를 하지 않고 바로 희생시켰다.

실험처치가 끝난 뒤에 혈관집게를 제거하여 재관류시켰으며, 재관류 직후와 3시간, 6시간, 24시간, 72시간 후에 실험동물을 경추탈골로 희생시켜 왼쪽 신장을 적출하였다 (Fig. 1). 실험동물은 실험처치 동안 전기담요를 이용하여 체온을 유지시켰으며, 재관류 후 발의 피부색을 관찰하여 재관류가 부적절한 실험동물은 실험에서 제외시켰다.

적출한 신장은 가로 절단하여 한 부분은 세포자멸사 염색 및 면역조직화학염색에 사용하였고, 나머지 부분은 Western blotting에 사용하기 위하여 액체 질소에 동결한 후 -70°C 에서 보관하였다.

3. 면역조직화학염색

NF- κ B와 TNF- α , IL-1 β , ICAM-1의 분포와 발현양상을 관찰하기 위하여 조직을 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 6시간씩 두 번 고정시킨 다음 일반조직처리 과정을 거쳐 $6\mu\text{m}$ 두께의 파라핀절편을 제작하였다.

Xylene을 이용하여 파라핀을 제거한 조직절편을 흡수시킨 다음 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액으로 20분 동안 처리하여 과산화효소를 불활성화시켰고, 항원을 노출하기 위해 0.4% pepsin 용액 (Sigma, USA)으로 37°C 에서 20분 동안 처리한 후 10분간 실온에서 슬라이드를 방치하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 37°C 에서 1시간 동안 blocking 용액 (각각 goat rabbit mouse normal serum 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 2% bovine serum albumin을 함유한 phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)으로 처리하고, 일차항체 mouse anti-human NF- κ B (1 : 15, Santa Cruz

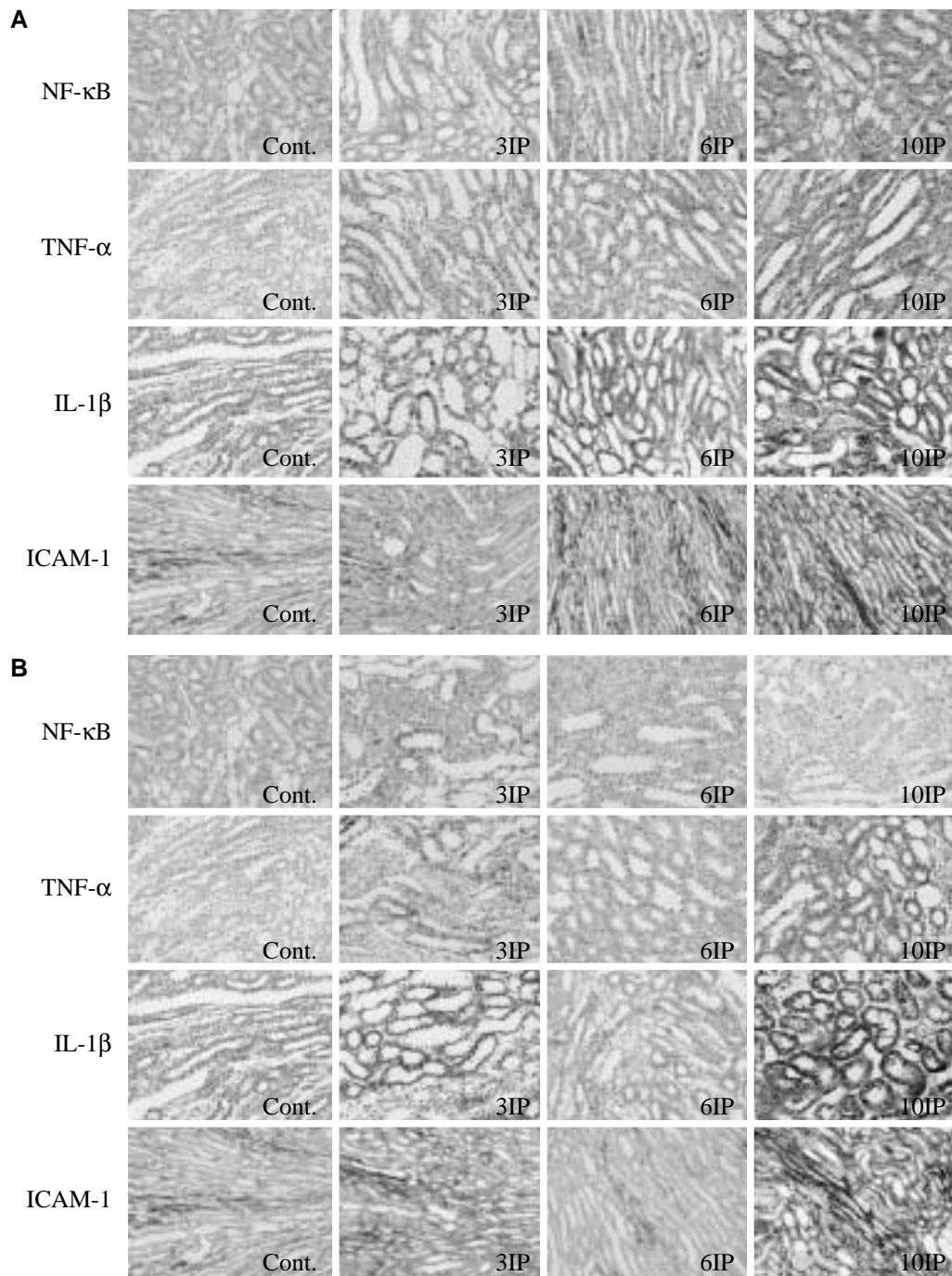


Fig. 1. Immunohistochemical staining of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β and ICAM-1 in the outer medulla of the kidney at 24 (A) and 72 (B) hours after ischemic preconditioning (IP). Original magnification, $\times 400$ (NF- κ B, TNF- α , IL-1 β) and $\times 200$ (ICAM-1). cont: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

Table 1. Effects of cyclic short ischemia and reperfusion on mortality in rats

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rats	Cont.	0/6				
	3IP	0/6	0/6	0/6	1/7	7/12
	6IP	0/6	0/6	0/6	0/6	10/19
	10IP	0/6	0/6	0/6	2/8	10/14

The number of rats died/total number of rats are shown

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

Biotechnology, USA), rabbit anti-rat TNF- α (5 μ g/mL, IBL, Japan), rabbit anti-human IL-1 β (1 : 30, Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rat ICAM-1 (5 μ g/mL, R & D Systems, USA)을 blocking 용액으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이차항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-goat IgG antibody (Vector Laboratory, USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Laboratory)을 실온에서 30분 동안 반응시킨 뒤 DAB (Vector Laboratory) 혼합용액을 5분 동안 반응시켜 발색시켰다. 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였으며, 음성대조군은 일차항체를 제외한 반응을 모두 시행하여 면역반응의 특이성을 확인하였다.

실험동물의 사망률은 Table 1에 작성하였고, 신장의 바깥속질을 사진촬영하여 면역염색반응이 나타나지 않은 경우를 0점, 약한 양성반응을 3점, 중등도의 양성반응을 6점, 강한 양성반응을 9점, 매우 강한 양성반응을 12점으로 크게 나눈 뒤 각각의 기준보다 강하거나 약한 경우를 고려하여 점수화하였다. 획득한 점수의 평균값과 표준편차를 구하고, SPSS 12.0.1판을 사용하여 Student's t-test를 실시하였다.

4. 세포자멸사 염색

신장세포의 세포자멸사는 ApopTag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection System kit (S-7100, Chemicon international, USA)를 사용하여 확인하였다.

파라핀 절편은 면역조직화학염색과 동일한 함수과정을 거친 뒤, protease K (Sigma, 20 μ g/mL in PBS)로 실온에서 40분 동안 반응시켜 항원을 노출시켰다. 3% 과산화수소가 들어있는 PBS 혼합용액으로 실온에서 5분 동안 반응시키고, equilibration buffer로 약 2분 동안 반응시킨 뒤, reaction buffer와 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzyme의 1 : 1 혼합용액으로 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 손상받은 DNA를 표지하였다. 조직은 TdT에 특이적으로 결합하는 anti-digoxigenin peroxidase로 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 DAB (Vector Laboratory)로 발색하였다. 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였으며, 음성대조군은 TdT를 제외한 반응을 모두 시행하여 세포자멸사 반응의 특이성을 확인하였다. 세포자멸사의 평가는 광학현미경으로 5부분 이상의 사진을 찍어 전체 바깥속질의 세포핵과 세포자멸사가 일어난 핵의 수를 세었다. 세포자멸사의 지표는 바깥속질의 전체 세포핵에 대한 세포자멸사가 일어난 핵의 비율을 이용하였다.

5. Western blotting법

-70°C에 보관했던 신장조직의 무게를 재어 0.2 g 당 lysis buffer (PRO-PREP™ protein extraction solution, iNtRON biotechnology, Korea)를 1 mL 첨가하고 homogenizer (Janke & Kunkel, IKA®-Labtechnik, Germany)를 이용하여 13,500 rpm으로 얼음에서 10 초씩 2번 균질화하였다. 40분 동안 얼음에서 배양한 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻어 -20°C에서 보관하였다. 단백질의 정량은 Bio-Rad사의 bradford시약을 이용한 방법으로 시행하였다. 200 μ g의 단백질을 ICAM-1과 NF- κ B를 검출하기 위한 10%와 IL-1 β , TNF- α 를 검출하기 위한 12% SDS-PAGE gel로 분리한 뒤, PVDF membrane (Amersham, UK)으로 실온에서 280 mA로 120분 동안 전달 (transfer)하였다. membrane을 0.1% Tween 20이 들어있는 TBST에 3~5% 탈지분유 (non-fat dry milk)를 첨가한 용액으로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 반응을 차단시켰다. 일차항체는

rabbit anti-human NF- κ Bp65 (1 : 1,500, Chemicon International), rabbit anti-rat TNF- α (5 μ g/mL, IBL), goat anti-rat IL-1 β (0.5 μ g/mL, R & D Systems), goat anti-rat ICAM-1 (0.5 μ g/mL, R & D Systems)을 사용하여 TBST에 3% 탈지분유를 첨가한 용액에 희석시켜 실온에서 3시간 동안 반응시켰고, hor-seradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, hor-seradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (1 : 1,000, Invitrogen, USA)를 실온에서 1시간동안 반응시켰다. ECL Western blotting 검색시약 (ECLTM western blotting detection reagent, Amer-sham, UK)을 이용하여 1분간 반응시키고, 암실에서 10초~10분간 필름 (Fuji X-Ray film, Fuji photo film, Japan)에 노출시켰다.

결 과

1. 실험동물의 사망률

실험동물은 짧은 허혈과 재관류 횟수가 증가할수록, 재관류 24시간과 72시간에 더 많은 실험동물이 사망하였다 (Table 1).

2. 면역조직화학염색

1) NF- κ B의 면역조직화학 염색

바깥속질에서 NF- κ B의 면역반응은 정상대조군에서 약한 양성반응을 나타내었고, 재관류 0시간과 3시간, 6시간, 24시간에는 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 강한 양성반응을 나타내었으며, 재관류 72시

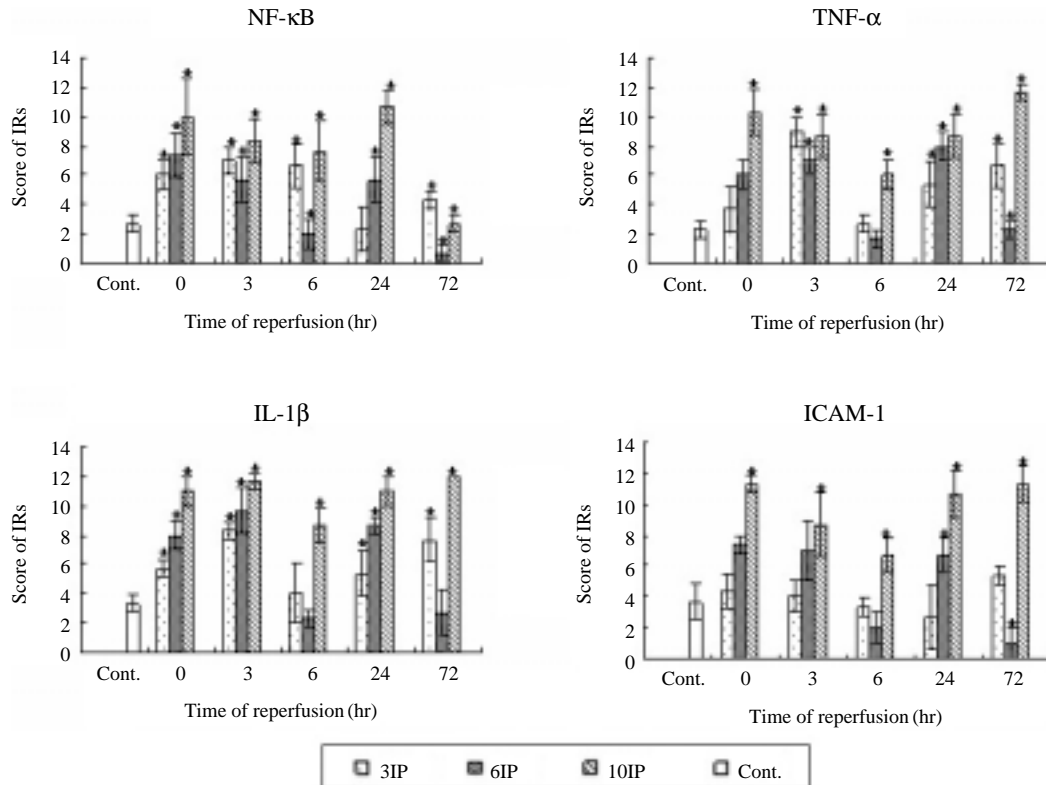


Fig. 2. Immunohistochemical staining of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , and ICAM-1 in outer medulla of the kidney after ischemic preconditioning (IP) of left common iliac artery. Values represent the mean \pm S.D.; *P < 0.05 compared with control. Cont.: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

Table 2. Immunohistochemical staining of NF- κ B in rat kidney outer medulla of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rat	Cont.	2.67 \pm 0.58				
	3IP	6.00 \pm 1.00 [†]	7.00 \pm 1.00 [†]	6.67 \pm 1.53 [†]	2.33 \pm 1.53	4.33 \pm 0.58 [†]
	6IP	7.33 \pm 1.53 [†]	5.67 \pm 1.53 [†]	2.00 \pm 1.00 [†]	5.67 \pm 1.53 [†]	0.67 \pm 0.58 [†]
	10IP	10.00 \pm 2.65 [†]	8.33 \pm 1.53 [†]	7.67 \pm 2.08 [†]	10.67 \pm 1.15 [†]	2.67 \pm 0.58 [†]

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3); P[†] < 0.05 versus the control

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

Table 3. Immunohistochemical staining of TNF- α in rat kidney outer medulla of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rats	Cont.	2.33 \pm 0.58				
	3IP	3.67 \pm 1.53	9.00 \pm 1.00 [†]	2.67 \pm 0.58	5.33 \pm 1.53 [†]	6.67 \pm 1.53 [†]
	6IP	6.00 \pm 1.00	7.00 \pm 1.00 [†]	1.67 \pm 0.58	8.00 \pm 1.00 [†]	2.33 \pm 0.58 [†]
	10IP	10.33 \pm 1.53 [†]	8.67 \pm 1.53 [†]	6.00 \pm 1.00 [†]	8.67 \pm 1.53 [†]	11.67 \pm 0.58 [†]

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3); P[†] < 0.05 versus the control

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

간에는 3회 처치한 군에서 강한 양성 반응을 나타내었다(Table 2, Figs. 1, 2).

2) TNF- α 면역조직화학염색

바깥속질에서 TNF- α 의 면역반응은 정상대조군에서 약한 양성반응을 나타내었다. 재관류 0시간과 6시간, 72시간에는 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 강한 양성반응을 나타내었고, 재관류 3시간에는 허혈양상화를 3회 처치한 군과 10회 처치한 군에서, 재관류 24시간에는 6회 처치한 군과 10회 처치한 군에서 강한 양성반응을 나타내었다(Table 3, Figs. 1, 2).

3) IL-1 β 면역조직화학염색

바깥속질에서 IL- β 의 면역반응은 정상대조군에서 약한 양성반응을 나타내었고, 모든 재관류 시간에서 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 강한 양성반응을 나타내었다(Table 4, Figs. 1, 2).

4) ICAM-1 면역조직화학염색

바깥속질에서 ICAM-1의 면역반응은 정상대조군에서 약한 양성반응을 나타내었고, 모든 재관류 시간에서 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 강한 양성반응을 나타내었다(Table 5, Figs. 1, 2).

3. 세포자멸사 염색

바깥속질의 전체 세포 중에서 세포자멸사가 일어난 세포의 비율(%)은 모든 재관류 시간에서 허혈양상화를 10회 처치한 군이 3회와 6회 처치한 군들에 비해 더 높게 나타났다(Table 6, Fig. 4).

4. Western blotting

1) NF- κ B에 대한 Western blotting 결과

재관류 0시간과 6시간, 24시간에는 허혈양상화를

Table 4. Immunohistochemical staining of IL-1 β in rat kidney outer medulla of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rats	Cont.	3.33 \pm 0.58				
	3IP	5.67 \pm 0.58 [†]	8.33 \pm 0.58 [†]	4.00 \pm 2.00	5.33 \pm 1.53 [†]	7.67 \pm 1.53 [†]
	6IP	8.00 \pm 1.00 [†]	9.67 \pm 1.53 [†]	2.33 \pm 0.58	8.67 \pm 0.58 [†]	2.67 \pm 1.53
	10IP	11.00 \pm 1.00 [†]	11.67 \pm 0.58 [†]	8.67 \pm 1.15 [†]	11.00 \pm 1.00 [†]	12.00 \pm 0.00 [†]

Each value represents the mean \pm S.D. (n=4); P[†] < 0.05 versus the control

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

Table 5. Immunohistochemical staining of ICAM-1 in rat kidney outer medulla of the control and ischemic preconditioning groups

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rats	Cont.	3.67 \pm 1.15				
	3IP	4.33 \pm 1.15	4.00 \pm 1.00	3.33 \pm 0.58	2.67 \pm 2.08	5.33 \pm 0.58
	6IP	7.33 \pm 0.58	7.00 \pm 2.00	2.00 \pm 1.00	6.67 \pm 1.15 [†]	1.00 \pm 1.00 [†]
	10IP	11.33 \pm 0.58 [†]	8.67 \pm 2.08 [†]	6.67 \pm 1.15 [†]	10.67 \pm 1.53 [†]	11.33 \pm 1.15 [†]

Each value represents the mean \pm S.D. (n=4); P[†] < 0.05 versus the control

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

Table 6. Effect of cyclic brief ischemia and reperfusion on apoptosis of kidney outer medulla Apoptosis Ratio (%) of SD rats

		Time of reperfusion (h)				
		0	3	6	24	72
SD rats	Cont.	23.03 \pm 1.89				
	3IP	16.67 \pm 2.93 [†]	27.32 \pm 4.72	22.69 \pm 1.78	16.06 \pm 2.78 [†]	38.73 \pm 1.28 [†]
	6IP	42.38 \pm 9.49 [†]	35.53 \pm 0.94 [†]	12.29 \pm 1.30 [†]	50.15 \pm 6.75 [†]	16.18 \pm 1.63 [†]
	10IP	54.28 \pm 1.98 [†]	49.60 \pm 1.66 [†]	45.68 \pm 3.60 [†]	56.41 \pm 4.01 [†]	68.25 \pm 1.79 [†]

The apoptotic nuclei of kidney outer medullar among the total nuclei of outer medullar

Each value represents the mean \pm S.D. (n=5); P[†] < 0.05 versus the control

Abbreviations

Cont. : control

3IP : 3 times of short ischemia and reperfusion

6IP : 6 times of short ischemia and reperfusion

10IP : 10 times of short ischemia and reperfusion

10회 처치한 군에서 가장 증가된 양상을 보였고, 재관류 3시간에는 허혈양상화 처치군들 사이에서 크게 차이는 없으나 6회 처치시 약간 감소하는 양상을 보였다. 재관류 72시간에는 허혈양상화를 6회와

10회 처치한 군에서 감소된 양상을 보였다(Fig. 3).

2) TNF- α 에 대한 Western blotting 결과

재관류 0시간에는 허혈양상화를 10회 처치한 군

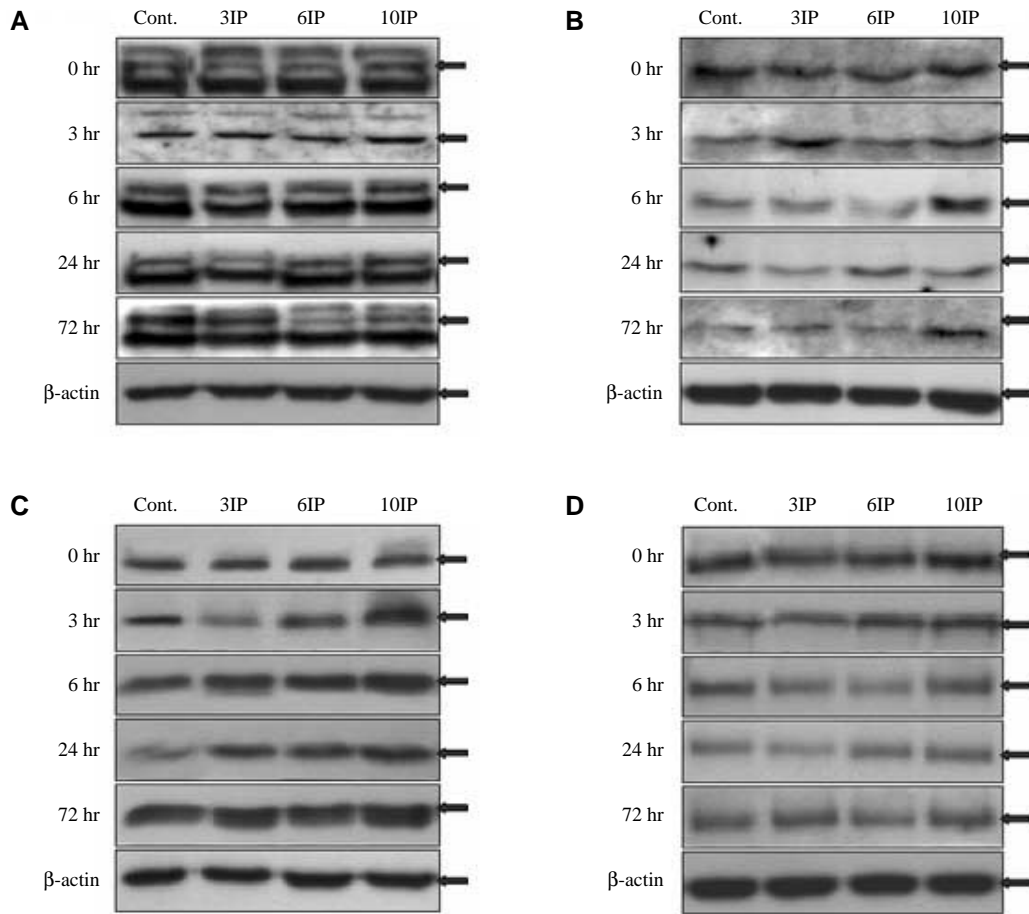


Fig. 3. Immunoblotting of NF- κ B (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), ICAM-1 (D) in the rat kidney received ischemic preconditioning (IP) of left common iliac artery at each reperfusion time. Cont.: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP.

에서 가장 증가된 양상을 보였고, 재관류 3시간과 6시간, 72시간에는 6회 처치한 군에서 감소하였다가 10회 처치한 군에서 증가하는 양상을 보였다. 재관류 24시간에는 6회 처치한 군에서 증가하였다가 10회 처치군에서 조금 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 3).

3) IL-1 β 에 대한 Western blotting 결과

재관류 0시간에, 허혈양상화군들 사이에서 크게 차이는 없으나 6회 처치군에서 증가되는 양상을 보였고, 재관류 3시간에는 10회 처치한 군에서 가장 증가된 양상을 보였다. 재관류 6시간과 24시간에는

허혈양상화군 사이에서 크게 차이는 없으나 10회 처치한 군에서 증가된 양상을 보였고, 재관류 72시간에는 허혈양상화를 6회 처치한 군에서 감소하다가 10회 처치한 군에서 증가된 양상을 보였다 (Fig. 3).

4) ICAM-1에 대한 Western blotting 결과

재관류 0시간과 3시간, 24시간에는 허혈양상화를 10회 처치한 군에서 가장 증가된 양상을 보였고, 재관류 6시간과 72시간에는 6회 처치한 군에서 감소하다가 10회 처치한 군에서 증가되는 양상을 보였다 (Fig. 3).

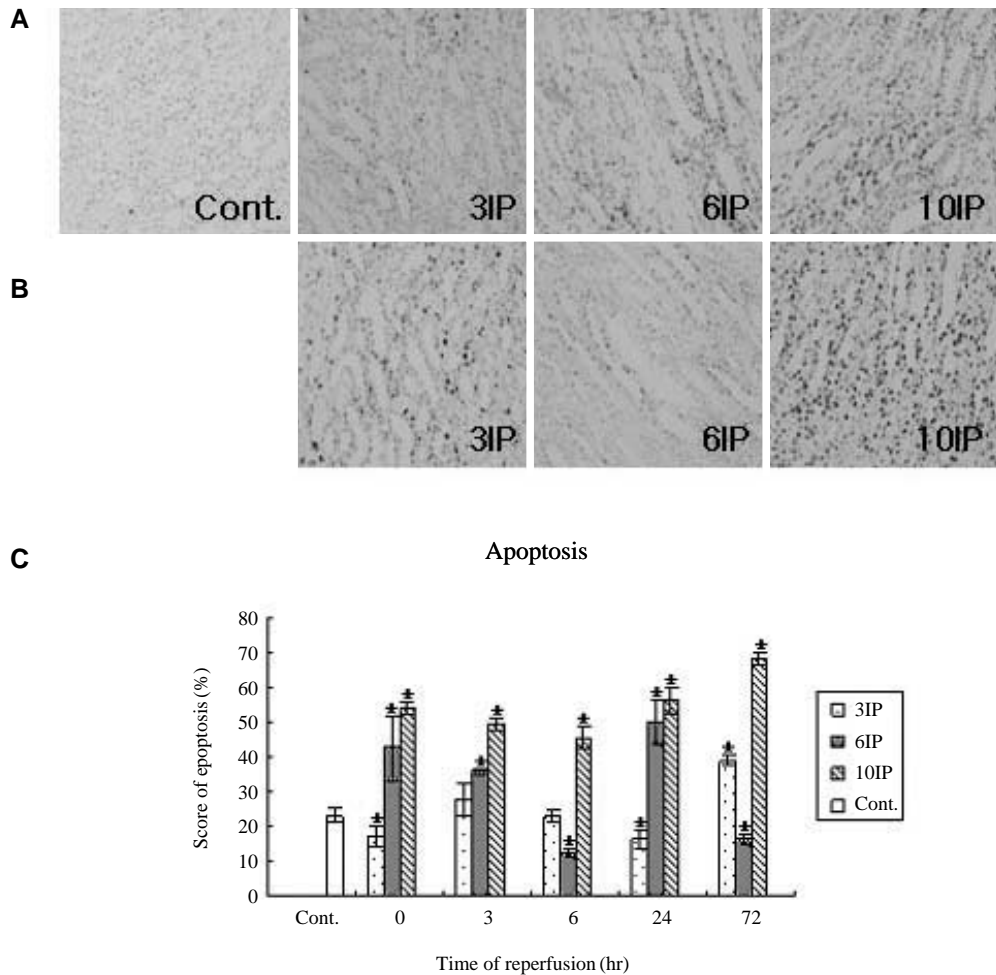


Fig. 4. Apoptosis on outer medulla of rat kidney at 24 (A) or 72 (B) hours after left common iliac artery ischemic preconditioning (IP). Original magnification, $\times 400$. Cont.: control, 3IP: 3 times of IP, 6IP: 6 times of IP, 10IP: 10 times of IP. (C) Each value represents the average score ($n=5$) and rates of apoptotic cells/total cells in outer medulla cells (%) (based on Table 6). Values represent the mean \pm S.D.; * $P < 0.05$ compared with control.

고 찰

수술과 질환, 사고 등에 의하여 발생될 수 있는 허혈 및 재관류는 중요한 장기들에서 치명적인 손상을 줄 수 있다. 이 중 신장은 사망률에 중요하게 관여된 장기 중 하나로 허혈 손상에 대하여 높은 이환율(morbidity)과 사망률을 지닌다(Ysebaert 등 2000).

신장에서의 허혈 재관류 손상 기작에는 ATP 고갈, 자유산소기의 생성 등의 요소도 관여하지만, 최근 면역 세포들이 중요한 매개체로 여겨지고 있고 염증작용이 손상 기작에서 중요한 역할을 할 것이라고 제시되고 있다(Donnahoo 등 1999a, Burne-Taney 등 2006).

허혈 및 재관류에 의한 자극이 발생하면, 염증 반응은 내피의 활성화와 손상을 유발하고, 염증 작용에

서 중요한 역할을 하는 내피세포(Majewska 등 1997)에 백혈구 부착을 강화시키며, 또한 미세혈관의 혈류를 약화시켜 손상을 유발한다. 이러한 백혈구와 내피의 상호작용은 겔질에 비하여 바깥속질에서 더 크게 나타난다(Bonventre와 Zuk 2004).

전사 요소인 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 면역과 염증 반응에서 기능을 하는 유전자들의 조절에서 중요한 역할을 한다(Barnes와 Karin 1997, Renard와 Raes 1999). NF- κ B는 세포질에서 억제 단백질 I-kappaB family와 복합체로 존재하는데, 산화 자극과 interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 전염증성 사이토카인들에 의한 염증 자극에 의해 I- κ B 단백질들은 NF- κ B로부터 분리된다. I- κ B 단백질이 분리된 NF- κ B는 핵으로 이동하고 NF- κ B에 특이적인 염기서열(promoter)에 결합하여, TNF- α , IL-1, IL-6 같은 전염증성 사이토카인과 ICAM-1 같은 세포간부착분자의 유전자 전사를 일으킨다. 이러한 전사를 통해 생성된 사이토카인들은 NF- κ B의 발현을 증가시키고 다시 활성화시키므로(self-perpetuating loop), 결과적으로 전염증성 사이토카인과 세포간부착분자의 양도 증가하게 되어 염증 반응은 더욱 커지게 된다(Hiasa 등 2001).

IL-1은 IL-6, TNF- α , interferon (IFN)- γ , IL-8/CXCL1, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2, 그리고 IL-1 자신을 포함한 많은 염증성 사이토카인들과 케모카인들을 합성하는 세포들을 자극하고(Furuichi 등 2006), 그 결과 염증성 세포를 유입하여 다양한 염증성 질환을 야기한다(Badolato와 Oppenheim 1996). Guidot 등(1994)은 흰쥐에 IL-1을 적용시 신장에서 호중구의 유입이 증가함을 발견하였다.

신장에서 TNF의 주요한 생성 원인은 신장에 유입된 말초 단핵구로 알려져 있으나, 최근 사구체의 혈관사이세포(mesangial cell)가 중요한 생성 원인으로 제안되고 있다(Donnanhoo 등 1999b). TNF는 면역복합체나 허혈 및 재관류 등에 의해 방출되어 많은 신장의 염증성 질환 발병기전에 관련된다. 또한 사구체의 혈류량과 여과율을 감소시키고, 다른 전염증성 매개체의 합성을 유도하며, 알부민투과성을 증가시켜 사구체에 섬유 침착을 유도한다.

허혈 및 재관류는 또한 내피세포와 백혈구의 상호작용을 일으키는 부착분자들을 상호조절하는데(Bonventre와 Zuk 2004), 이들 중 ICAM-1 (CD54)은 비만세포에 존재하는 lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 (CD11a/CD18)과 Mac-1 (CD11b/CD18)의 counter 수용체로써, 내피세포에서 발현된다. ICAM-1은 백혈구와 내피세포 사이의 부착에서 중요한 결정인자로 작용한다(Kelly 등 1996). 일반적인 상태에서 내피세포의 ICAM-1 발현은 낮으나, IFN- γ , IL-1 또는 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 12~24시간 동안 처리하면 뚜렷하게 증가한다(Majewska 등 1997). IL-1과 TNF- α 는 내피세포에서 ICAM-1의 발현을 증가시키고, 증가된 ICAM-1은 내피세포에의 백혈구 부착 및 활성화, 염증 매개체들을 증가시켜, 결과적으로 조직의 손상을 야기한다(Springer 1990).

Ogawa 등(2000)은 30분 허혈과 90분 재관류 전에 5분 간격의 허혈양상화를 1회 또는 3회 시행시 재관류 후 신장 기능을 보호하는 효과를 지닐 것이라고 하였고, Hiasa 등(2001)은 30분 허혈과 3시간 재관류 전 5분 간격으로 4번 시행한 허혈양상화 처치가 NF- κ B 활성화와 그에 따른 사이토카인의 유전자 발현을 감소시켜 조직의 손상 정도를 줄인다고 하였다.

그러나 허혈양상화 처치는 허혈양상화 과정에 사용하는 허혈시간과 재관류시간, 반복하는 횟수, 그리고 허혈양상화와 본격적인 허혈과의 시간간격 등에 의해 효과의 차이를 보인다.

Sumerary와 Yellon (1998)은 흰쥐의 심장에 2분, 5분 또는 2분, 3분 간격으로 허혈양상화를 처치한 것은 보호효과가 나타나지 않았으나 5분간 1번 처치한 경우에는 보호효과를 나타내어, 허혈양상화의 횟수와 적용 시점 등이 허혈양상화의 보호효과에 영향을 준다고 하였다. 또한, 흰쥐의 신장에서, 4분 허혈과 11분 재관류를 4회 처치하고 30분 후 20분 또는 40분의 허혈시에는 보호 효과가 나타나지 않았으나(Islam 등 1997), 5분 후 40분 허혈시에는 보호효과를 나타내었다(Toosy 등 1999).

본 실험에서 신장의 바깥 속질에서의 NF- κ B 면역 반응은 재관류 0시간과 24시간에는 허혈양상화를 3

회 처리한 군에서 가장 약하게 발현하였고, 3시간과 6시간, 72시간에는 6회 처리한 군이 가장 약하게 발현하였다. 10회 처리한 군은 72시간을 제외한 모든 재관류 시간에서 3회와 6회 처리한 군에 비하여 강하게 발현하는 양상을 보였다.

같은 위치에서의 TNF- α 와 IL-1 β , ICAM-1 면역반응은 재관류 0시간과 3시간, 24시간에는 허혈양상화를 3회 처리한 군에서 가장 약하게 발현하였고, 6시간과 72시간에는 6회 처리한 군이 가장 약하게 발현하였다. 10회 처리한 군은 모든 재관류 시간에서 3회와 6회 처리한 군에 비하여 강하게 발현하는 양상을 보였다. NF- κ B와 TNF- α , IL-1 β , ICAM-1의 전기영동 결과는 몇몇 군에서 면역염색 결과와 차이를 보였으나, 이것은 사이토카인이 순환성의 물질이고, 여러 다른 자극 요인과 실험 방법에 영향을 받았기 때문일 것으로 생각된다.

이 같은 결과는, 재관류 0시간과 3시간, 24시간에는 허혈양상화를 3회 처리한 군에서 가장 약하게 나타나고, 6시간과 72시간에는 6회 처리한 군에서 가장 약하게 나타나며, 10회 처리한 군은 모든 재관류 시간에서 3회와 6회 처리한 군에 비하여 강하게 나타나는 바깥속질에서의 세포자멸사 결과와 유사한 양상을 보이는 것을 알 수 있었다.

이것은 허혈 및 재관류에 의한 산화자극과 염증 자극이 NF- κ B를 증가시켰고, NF- κ B가 전염증성 사이토카인과 세포간부착분자의 전사에 관여하였으며, 이렇게 증가된 전염증성 사이토카인이 NF- κ B를 더욱 증가시켜 세포간부착분자의 전사 또한 증가된 것으로 생각할 수 있다.

또한 Brzozowski 등 (2004)의 간과 심장에서 각각 5분씩 2회 허혈양상화를 처치하면 흰쥐의 위에서 30분 허혈과 3시간 재관류시 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현을 감소시킨다는 의견을 고려하면, 재관류 0, 3, 24시간에서의 허혈양상화 3회군과 재관류 6시간과 72시간에서의 허혈양상화 6회군의 IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 발현이 감소하는 것은, 적절한 횡수의 허혈양상화 처치와 재관류 시간은 허혈내성을 유도하고 조직손상을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

그리고 Kelly 등 (1994)의 의견을 고려하면, 허혈양상화 10회 처치군은 과도한 허혈 횡수로 인하여

다른 군보다 많은 양의 산소자극이 생성되었을 것이라 생각되며, 이는 NF- κ B의 발현을 증가시킬 것이고, 따라서 세포간부착분자인 ICAM-1의 발현도 또한 증가시켰을 것이다. 증가된 세포간부착분자로 인하여, 허혈 손상에 민감한 신장의 조직 내에 염증 세포의 과도한 침착이 일어날 것으로 생각되며, 이러한 결과가 과도한 횡수의 허혈양상화를 처치했을 때 나타나는 높은 사망률과 관련이 있다고 생각할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Badolatto R, Oppenheim JJ : Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 26: 526-538, 1996.
- Barnes PJ, Karin M : Nuclear factor- κ B : A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071, 1997.
- Bonventre JV, Zuk A : Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *kidney Int* 66: 480-485, 2004.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik M, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik WW : Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* 499: 201-213, 2004.
- Burne MJ, Elghandour A, Haq M, Saba SR, Norman J, Condon T, Bennett F, Rabb H : IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 70: 192-198, 2001.
- Burne-Taney MJ, Liu M, Baldwin WM, Racusen L, Rabb H : Decreased Capacity of Immune Cells to Cause Tissue Injury Mediates Kidney Ischemic Preconditioning. *J Immunol* 176: 7015-7020, 2006.
- Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR : Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 277: R922-R929, 1999a.
- Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR : Review article : the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 162: 196-203, 1999b.

- Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Sugaya T, Iwakura Y, Matsushima K, Asano M, Yokoyama H, Kaneko S : Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 34: 2477-2455, 2006.
- Guidot DM, Linas SL, Repine MJ, Shanley PF, Fisher HS, Repine JE : Interleukin-1 treatment increases neutrophils but not antioxidant enzyme activity or resistance to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. *Inflammation* 18: 537-545, 1994.
- Haq M, Norman J, Saba SR, Ramirez G, Rabb H : Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 9: 614-619, 1998.
- Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K : Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor-kappa B activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia- reperused rat heart. *Jpn Circ J* 65: 984-990, 2001.
- Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA : Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney : the effect of preconditioning. *Br J Urol* 79: 842-847, 1997.
- Kelly KA, Hill MR, Youkhana K, Wanker F, Gimble JM : Dimethyl sulfoxide modulates NF-kappa B and cytokine activation in lipopolysaccharide- treated murine macrophages. *Infect Immun* 62: 3122-3128, 1994.
- Kelly KJ, Winfred WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutiérrez-Ramos JC, Bonventre JV : Intercellular Adhesion Molecule-1-deficient Mice Are Protected against Ischemic Renal Injury. *J Clin Invest* 97: 1056-1063, 1996.
- Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN : The remote ischemic preconditioning stiulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 19: 143-150, 2004.
- Majewska E, Paleolog E, Baj Z, Kralisz U, Feldmann M, Tchorzewski H : Role of tyrosine kinase enzymes in TNF-alpha and IL-1 induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human umbilical vein endothelial cells. *Scand J Immunol* 45: 385-92, 1997.
- Ogawa T, Mimura Y, Hiki N, Kanauchi H, Kaminishi M : Ischaemic preconditioning ameliorates functional disturbance and impaired renal perfusion in rat ischaemia-reperused kidneys. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 997-1001, 2000.
- Renard P, Raes M : The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutic strategies. *Cell Biol Toxicol* 15: 341-344, 1999.
- Seo YK, Jeon SK, Park HJ, Lee SW, Koh BC, Lee DK, Chang NJ, Paik DJ, Lee WH : Expression pattern of nitric oxide synthases in rat skeletal muscle after cyclic episodes of short ischemia and reperfusion. *Korean J Phys Anthropol* 19: 125-136, 2006. (in Korean)
- Springer TA : Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434, 1990.
- Sumeray MS, Yellon DM : Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol* 93: 384-390, 1998.
- Toosy N, McMorris EL, Grace PA, Mathie RT : Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU Int* 84: 489-494, 1999.
- Ysebaert DK, De Greef KE, Bercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME : Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1562-1574, 2000.
- Zhong C, Zhou Y, Liu H : Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* 100: 540-546, 2004.

Korean J Phys Anthropol
20(1): 45 ~ 57, 2007

Abstract

Expressions of the Proinflammatory Cytokines in Rat Kidney with Cyclic Episodes of Short Ischemia-reperfusion of Left Common Iliac Artery

Hyun Joo Park, Wonkyu Kim, Jee Hee Youn, Doo Jin Paik

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

The purpose of this study is to investigate the changes in NF- κ B and proinflammatory cytokines expression following courses of reperfusion after various cycles of ischemic preconditioning in the rat kidney.

Thirty five weeks old Sprague Dawley rats were subjected to 3, 6 and 10 cycles of ischemic preconditioning that composed of 5 min ischemia and 5 min reperfusion at the left common iliac artery using rodent vascular clamp. The left kidney obtained after 0, 3, 6, 24 and 72 hours of reperfusion followed by each cycle. The expression patterns of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β and ICAM-1 were detected by immunohistochemical staining and Western blotting methods. Apoptosis were detected by TUNEL assay.

The results were as follows;

In the ischemic preconditioning group, the mortality increased from 24 hours after reperfusion when cyclic episodes of short ischemia and reperfusion were increased. The highest level of NF- κ B expression in outer medulla of the kidney from 0 hr to 24 hrs of reperfusion is detected after 10 cycles of ischemic preconditioning. The highest level of NF- κ B expression at 72 hrs of reperfusion is revealed after 3 cycles of ischemic preconditioning. The highest level of TNF- α expression in outer medulla of the kidney at 0 hr and 6, 24, 72hrs of reperfusion is shown after 10 cycles of ischemic preconditioning. After 3 hrs of reperfusion, all ischemic preconditioning groups shows similar expression. The highest level of IL-1 β and ICAM-1 expression in outer medulla of the kidney is observed at all of reperfusion times after 10 cycles of ischemic preconditioning. The highest level of apoptosis in rat kidney outer medulla at all of reperfusion times is shown after 10 cycles of ischemic preconditioning.

In conclusion, 3 or 6 times of remote ischemic preconditioning in the common iliac artery could reduce the expression of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , and ICAM-1. However, more than 10 times of remote ischemic preconditioning increased ischemia-reperfusion injury, caused by increased expression of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , and ICAM-1.

Key words : Short ischemia and reperfusion, Ischemic preconditioning, Kidney, Proinflammatory cytokine, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, ICAM-1