

## 허혈양상화와 $K_{ATP}$ 통로가 허혈 후 재관류된 흰쥐의 골격근육에서 SOD 활성 및 apoptosis에 미치는 영향

안동춘 · 배두진 · 양홍현\*

한양대학교 의과대학 해부학교실  
전북대학교 수의과대학 수의해부학교실\*  
(1999년 7월 19일 접수)

Effects of ischemic preconditioning,  $K_{ATP}$  channel on the SOD activation  
and apoptosis in ischemic reperfused skeletal muscle of rat

Dong-choon Ahn, Doo-jin Paik, Hong-hyun Yang\*

Department of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea  
Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine,  
Chonbuk National University, Chonbuk, Chonju, Korea\*

(Received Jul 19, 1999)

**Abstract :** Ischemic preconditioning (IPC), i.e., a preliminary brief episode of ischemia and reperfusion, has been shown to reduce the cell damage induced by long ischemia and reperfusion. Superoxide radical which is produced during reperfusion after ischemia was recognized as a factor of the ischemic injury and it is dismutated into  $H_2O_2$  and  $O_2$  by two types of intracellular superoxide dismutase (SOD), Cu,Zn-SOD in cytoplasm and Mn-SOD in mitochondria. Recently oxygen free radicals are suggested to induce the apoptosis, however mechanism of the reduced apoptosis by ischemic preconditioning was unknown, while many studies performed in mammalian heart indicated that ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channel activation related with the protective effects. The aim of present study is to investigate 1) whether IP upregulate the Cu,Zn-SOD and Mn-SOD activities, and 2) whether ischemic preconditioning decreases apoptosis via  $K_{ATP}$  channel activation in timely reperfused skeletal muscle after long ischemia.

The experimental animals, Sprague-Dawley rats weighing 250~300g, were divided into 8 groups ; 1) control group, 2) ischemic preconditioning only groups, 3) pinacidil, a  $K_{ATP}$  channel opener, treatment only groups, 4) glibenclamide, a  $K_{ATP}$  channel blocker, treatment only groups, 5) ischemia groups, 6) ischemia after IPC groups, 7) ischemia and pinacidil treatment groups, and 8) IP and ischemia after glibenclamide pretreatment groups. Animals of the control group were administered with the vehicle (DMSO) alone. Pinacidil (1mg/kg) was administered intravenously 5

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 학술연구조성비(기초의학 BM 97-218)에 의하여 지원되었음.

Address reprint requests to Dr. Doo-jin Paik, Department of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, 133-791, Republic of Korea.

minutes after initiation of ischemia, and glibenclamide (0.5mg/kg) was injected intravenously 20 minutes before IPC. In rats that were ischemic preconditioned, the left common iliac artery was occluded for 5 minutes followed by 5 minutes of reperfusion by three times using vascular clamp. Ischemia was done by occlusion of the same artery for 4 hours. The specimens of left rectus femoris muscle were obtained immediately (0 hour), 12 hours, 24 hours after drug administrations, IP or ischemia and reperfusion. The immunoreactivities of SOD and its alterations were observed by use of sheep antihuman Cu,Zn-SOD and Mn-SOD antibodies on the 10 $\mu$ m cryosections. The incidences of apoptosis were observed by TUNEL methods with *in situ* apoptosis detection kit on 6 $\mu$ m paraffine section.

The results obtained were as follows :

1. After IPC, immunoreactivities of Cu,Zn-SOD mainly in the small-sized fibers were increased by 24 hours, that of Mn-SOD at 0 hour and 24 hours.
2. No significant changes in immunoreactivities of SOD was observed in the pinacidil and in the glibenclamide treatment only groups, and in the ischemia only groups.
3. The immunoreactivities of the Cu,Zn-SOD were increased in the ischemia after IPC groups and the ischemia and pinacidil treatment groups.
4. The immunoreactivities of the Cu,Zn-SOD in the IPC and ischemia after glibenclamide pretreatment groups were not increased except for the 12 hours reperfusion group. But, Mn-SOD immunoreactivities were increased in the 0 hours, 12 hours and 24 hours after reperfusion.
5. In the control group, the IPC only groups, and the pinacidil treatment only groups, negative or trace apoptotic reactions were observed, but the positive apoptotic reaction occurred in the glibenclamide treatment groups.
6. Moderate or many number of apoptosis were revealed in the ischemia groups, and also the IPC and ischemia after glibenclamide pretreatment group except for 12 hours and 24 hours after reperfusion. However, the incidence of apoptosis was decreased in the ischemia after IPC groups and in the ischemia and pinacidil treatment groups.
7. There is a coincidence between the increase of Cu,Zn-SOD immunoreactivities and the decrease of apoptosis in the presence of ischemia and reperfusion.

These results suggest that the protective effects of ischemic preconditioning may relate to the SOD activation, and the ischemic preconditioning decreases the apoptosis partially via K<sub>ATP</sub> channel activation in timely reperfused rat skeletal muscle. It is also suggested that inhibition of apoptosis by IPC may relate with the SOD activation.

**Key words :** ischemic preconditioning, SOD, K<sub>ATP</sub> channel, apoptosis, skeletal muscle.

## 서 론

Murry *et al*<sup>1</sup>은 개의 심장을 대상으로 장기간의 허혈

에 앞서 짧은 기간동안 4회의 허혈과 재관류를 반복하면 허혈에 대해 내성을 갖게 됨을 관찰하고 장기간 허혈에 앞선 이러한 조작을 허혈양상화(ischemic preconditioning)라 명명하였다. 이후 많은 연구자들에 의해 각종 동물의

심장을 대상으로 허혈 및 재관류로 인하여 일어나는 손상 및 이에 대한 허혈양상화의 보호기전이 제시되었다. 지금까지 제시된 허혈양상화 보호기전을 보면 크게 세포대사적인 것과 신호전달체계와 관련된 것이 있다. 이 중 세포대사적인 기전에는 축부순환증가<sup>2</sup>, lipoxygenase 대사산물 증가<sup>3</sup>, heat shock protein의 발현증가<sup>4</sup>, 에너지 및 포도당 이용감소에 따른 산증의 감소와 creatine kinase 방출감소<sup>5</sup> 등이 있다. 신호전달체계에 관련된 것을 보면 protein kinase C의 활성<sup>6</sup>, adenosine 수용체 활성<sup>7</sup>, bcl-2 유전자 발현<sup>8</sup> 등이 제시되었으며 adrenaline<sup>9</sup> 및 catecholamine과의 관련성<sup>10</sup> 등도 보고되었다. 이외에도 ATP-sensitive K<sup>+</sup>(K<sub>ATP</sub>) 통로활성이 허혈양상화를 막개하는 것에 관하여는 흰쥐<sup>11~13</sup>, 개<sup>14~16</sup>, 토끼<sup>17</sup>, 돼지<sup>18,19</sup>, 기니픽<sup>20</sup>, 사람<sup>21</sup> 등을 실험대상으로 한 연구에서 규명되었다.

골격근육은 장기간의 허혈 뿐만 아니라 재관류시에도 손상이 일어나는데 이때 근육에는 세포의 부종 및 경색과 더불어 세포의 사멸이 일어난다. 허혈 및 재관류손상의 원인으로 칼슘의 과량축적, 재관류부재 현상(no-reflow phenomenon) 그리고 재관류시 형성되는 자유산소기 등이 알려져 있으나 자유산소기가 허혈 및 재관류시 세포 손상의 중요한 인자의 하나로 인식되고 있다<sup>22</sup>. 자유산소기란 세포내 대사과정 중 정상적으로 생기는 대사물로 초산소기(superoxide radical)(·O<sub>2</sub>), 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 반응성수산기(·OH) 등이며 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소들에 의해 대사되지만 자유산소기와 항산화효소 사이의 균형이 깨지면 손상이 일어난다<sup>22,23</sup>. 특히 자유산소기의 발생이 허혈후 재관류시에 급격히 증가<sup>24</sup>하므로 재관류시 자유산소기의 형성과 항산화효소 사이의 균형이 깨어지게 된다. 한편 조직손상을 일으키는 주된 산소기가 초산소기이고<sup>25,26</sup> 이를 대사시키기 위한 세포내 SOD의 활성증가는 초산소기의 발생을 의미<sup>27</sup>하므로 SOD의 활성은 초산소기 발생의 간접지표로 볼 수 있다.

Apoptosis는 세포죽음의 한 형태로 많은 인자에 의해 유발될 수 있고 억제될 수 있으며 자유산소기가 apoptosis 유발에 관여하고 있음이 밝혀지고 있다<sup>28~31</sup>. 근육에서 apoptosis는 허혈 및 재관류시에도 일어나며<sup>32,33</sup>, 이때의 apoptosis는 허혈손상에 의해 일어나는 것이 아니라 재관류시에 일어나는 현상이다<sup>30,34</sup>. 허혈양상화(ischemic preconditioning)는 허혈 및 재관류로 인한 apoptosis의 발생을 감소시킬 수 있음이 토끼<sup>35</sup>와 흰쥐<sup>36</sup>의 심장에서 보고되었다.

골격근육은 약 4시간 이내의 허혈에 내성을 가지고 있고<sup>37</sup>, 허혈양상화 조치는 4시간까지의 허혈후 재관류로 인한 손상에 대해 보호효과가 있다<sup>38</sup>.

따라서 저자 등은 골격근육에 4시간 허혈 및 재관류를 시도하고 이로 인하여 발생하는 근육손상을 약화시키는 허혈양상화 조작의 보호효과 기전으로 알려진 K<sub>ATP</sub> 통로의 활성이 apoptosis 발생억제와 관련이 있는지 그리고 apoptosis의 발생과 관련한 초산소기를 대사시키는 Cu, Zn-SOD와 Mn-SOD의 활성변동을 관찰하여 허혈양상화의 효과와 기전을 규명하고자 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

실험동물은 체중 250~300g 내외의 건강한 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며 사료와 물은 제한없이 공급하였다. 실험동물을 대조군과 실험군으로 나누고 대조군에는 부형체를 투여한 1) 정상대조군, 2) 허혈양상화군, 3) K<sub>ATP</sub> 통로 활성화군, 4) K<sub>ATP</sub> 통로 차단군으로 분류하였으며, 실험군은 5) 허혈군, 6) 허혈양상화 및 허혈군, 7) 허혈 및 K<sub>ATP</sub> 통로 활성화군, 8) K<sub>ATP</sub> 통로차단후 허혈양상화 및 허혈군으로 나누었다. 실험동물을 urethane (1.15g/kg, BW)으로 마취하고, 허혈양상화조작은 개복후 혈관집개를 사용하여 총장풀동맥을 5분 폐색-5분 재관류하는 과정을 3회 반복하여 처리하였다. 허혈은 총장풀동맥을 4시간 폐색하였고 허혈양상화 및 허혈군에서는 허혈양상화 후 곧바로 4시간의 허혈을 시행하였다. K<sub>ATP</sub> 통로활성은 pinacidil(1mg/kg)을 정맥주사하여 처리하였으며 허혈 및 K<sub>ATP</sub> 통로 활성화군에서는 허혈개시 5분후 주사하였다. K<sub>ATP</sub> 통로차단은 glibenclamide(0.5mg/kg)를 정맥주사하여 처리하였으며 K<sub>ATP</sub> 통로차단후 허혈양상화 및 허혈군에서는 시술전 20분에 약제를 투여하였다.

허혈양상화 만을 시행한 군과 pinacidil을 단독 투여한 군에서는 각각 재관류 혹은 약제처리 5분 경과후 그리고 glibenclamide 투여한 군에서는 약제처리 20분 경과후 실험동물을 회생시켜 0시간 경과군으로 하였다. 그리고 처리후 경과시간에 따라 12시간, 24시간 경과군으로 분류하였다. 4시간의 허혈이 있는 실험군에서는 따라 재관류 직후(0시간 경과군)와 재관류의 경과시간에 따라 12시간 24시간 경과군으로 세분하였으며 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다. 부형제 투여 정상대조군은 마취하에 실험군과 동일한 양의 부형제를 정맥내 투여하고 6시

간 경과후에 회생시켰다.

실험동물을 경추탈구하여 회생시키고 대퇴골은 근의 힘살부위를 적출한 후 일부는 영하 20°C에서 10μm 두께의 동결절편을 제작하고 염색시까지 영하 80°C에 저장하였다. 일부는 4°C의 10% 중성포르말린에 하룻밤 고정하고 파라핀블럭을 제작하였으며 6μm 두께의 절편을 제작하였다.

SOD의 분포를 관찰하기 위해 sheep antihuman Copper, Zinc-SOD(Cu,Zn-SOD) 항체와 sheep antihuman manganese-SOD(Mn-SOD) 항체(Biodesigh, Kennebunk, USA) 그리고 ABC kit(Vectorstain ABC kit, Vector Laboratories, INC Burlingame, USA)를 이용하여 면역세포화학적인 방법으로 염색하였다. 최종 발색반응은 peroxidase와 반응하는 DAB(3,3'-diaminobenzidine) kit(DAB substrate kit, Vector Lab, INC Burlingame, LA, USA)에 nickel chloride를 첨가하여 10분간 반응시켜 반응부위가 검정색으로 나타나게 하였다. 관찰된 시료중 효소의 면역반응이 양성으로 나타난 점, 선, 넓게 퍼져 나타난 면적 등이 각군의 전형적인 부분을 사진촬영하고 분석하였다. 본 실험에서 검출되는 효소의 반응은 음성반응(-), 미약한 양성반응(±), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++)과 강한 양성반응(+++)으로 구분하였다.

Apoptosis를 관찰하기 위하여 apoptosis 검색킷(Apop-Tag® Plus *in situ* apoptosis detection kit, Oncor, USA)을 사용하였으며 DAB로 발색후 1% methyl green으로 대조염색하였다. 근육세포는 크고 근육섬유내에 존재하는 것으로 판단하였으며 작고 혈구에 인접한 세포는 혈관내 피세포로 정하였다. Apoptosis 발현정도는 임의의 3시야에서 세명 이상이 수를 센 후 평균을 정하고 음성(-), 갈색을 띤 핵이 불분명하게 관찰되는 경우 미약한 정도(±)로 판단하였으며 25% 이하가 관찰된 경우 경도(+), 25~45%의 중등도(++), 45% 이상의 강한 정도(+++)로 일어났던 것으로 판정하였다.

## 결 과

### Cu, Zn-SOD의 면역세포화학적 효소활성(Table 1) :

#### 1) 대조군 :

(1) 정상대조군 : 일차항체를 적용하지 않고 반응을 한 음성대조군의 경우 음성반응이 나타났으며(Fig 1a), 부형체를 투여한 정상대조군에서는 경도(+)의 양성반응을 나

타내었다(Fig 1b).

(2) 허혈양상화군 : 허혈양상화 대조군에서는 처치 직후 단면적이 적은 근육섬유에서 중등도(++), 단면적이 큰 근육섬유에서 미약한 반응(±)이 나타났으며(Fig 2a), 12시간 경과시 단면적이 적은 근육섬유에서 중등도(++) 혹은 경도(+), 단면적이 큰섬유에서는 미약한 반응(±)을 관찰할 수 있었다(Fig 2b). 24시간 경과시에서는 단면적이 적은 근육섬유에서는 중등도(++) 혹은 강한 양성반응(+++)을 관찰할 수 있었으며 단면적이 큰 근육섬유에서는 경도의 양성반응(+)을 나타내었다(Fig 2c).

(3) Pinacidil 단독투여군 : Pinacidil을 투여하여 K<sub>ATP</sub> 통로를 활성화 한 군에서는 약제처치 후에 Cu,Zn-SOD 활성은 경도(+) 혹은 중등도(++)Fig 3a), 12시간 경과시에는 미약한(±) 혹은 경도의 반응(+)을 보였고(Fig 3b), 24시간 경과시에는 경도의 양성반응(+)이 나타났다(Fig 3c).

(4) Glibenclamide 단독투여군 : Glibenclamide를 투여하여 K<sub>ATP</sub> 통로를 차단 한 군에서는 처치 후에 경도의 양성반응(+)을 보였으며(Fig 4a), 12시간 경과시에는 경도(+) 혹은 중등도의 양성반응(++)을(Fig 4b), 24시간 경과시에는 미약한(±) 혹은 경도의 양성반응(+)을 나타내었다(Fig 4c).

#### 2) 실험군 :

(1) 허혈군 : 4시간의 허혈을 시행한 허혈군에서는 재관류 직후에 경도의 양성반응(+)을(Fig 5a), 재관류 12시간 경과시에는 경도(+) 혹은 미약한 양성반응(±)을(Fig 5b), 24시간 경과시에 경도(+) 혹은 중등도의 양성반응(++)을 나타내었다(Fig 5c).

(2) 허혈양상화 및 허혈군 : 허혈양상화 및 허혈군에서는 재관류 직후에 단면적이 작은 근육섬유에서 Cu,Zn-SOD의 활성이 강한반응(+++)을 나타내었고 단면적이 큰 근육섬유에서는 경도의 양성반응(+)을 나타내었다(Fig 6a). 재관류 12시간 경과시에는 단면적이 작은 근육섬유에서는 중등도의 양성반응(++)을, 단면적이 큰 섬유에서는 경도(+) 혹은 미약한 양성반응(±)을 나타내었다(Fig 6b). 재관류 24시간 경과시에는 단면적이 작은 근육섬유와 단면적이 큰 섬유에서 경도의 양성반응(+)을 나타내었다(Fig 6c).

(3) 허혈 및 pinacidil 투여군 : 허혈 및 pinacidil 투여군에서는 재관류 직후에 중등도(++) 혹은 강한 양성반응(+++)을 나타내었고(Fig 7a), 12시간 경과군과 24시간 재관류군에서는 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을 보

였다(Fig 7b, 7c).

(4) Glibenclamide 투여후 허혈양상화 및 허혈군 : Glibenclamide를 투여하여  $K_{ATP}$  통로차단한 후 허혈양상화 및 허혈을 시행한 군에서는 재관류 직후에 경도(+) 및 중등도(++)의 Cu,Zn-SOD 활성이 관찰되었다(Fig 8a). 12시간 경과군에서는 강한(+++) 혹은 중등도(++)의 양성반응을 관찰할 수 있었으며(Fig 8b), 24시간 경과시에는 경도(+)의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 8c).

#### Mn-SOD의 면역세포화학적 효소활성(Table 1) :

##### 1) 대조군 :

(1) 정상대조군 : 일차항체를 적용하지 않고 반응을 한 음성대조군의 경우 음성반응이 나타났으며(Fig 1c) 부형제를 투여한 정상대조군에서는 경도(+) 혹은 미약한(±) 양성반응을 나타내었다(Fig 1d).

(2) 허혈양상화군 : 허혈양상화 직후 단면적이 작은 근육섬유에서는 중등도(++)의 양성반응이, 단면적이 큰 근육섬유에서는 미약한(±) 혹은 경도(+)의 양성반응이 관찰되었다(Fig 9a). 12시간 경과군에서 단면적이 작은 근육섬유에서는 경도(+)의 양성반응이, 단면적이 큰 근육섬유에서는 미약한(±) 혹은 경도(+)의 양성반응이 관찰되었다(Fig 9b). 24시간 경과시에는 단면적이 작은 근육

섬유에서 중등도(++) 혹은 강한(+++) 양성반응이, 단면적이 큰 섬유에서는 경도(+)의 양성반응이 관찰되었다(Fig. 9c).

(3) Pinacidil 단독투여군 : Pinacidil 투여하여  $K_{ATP}$  통로를 활성화 한 군에서는 약제처치 후에 Mn-SOD 활성은 경도(+)로 나타났으며(Fig 10a), 12시간 경과시에는 경도(+) 혹은 미약한(±) 반응을(Fig 10b), 24시간 경과군에서는 경도(+)의 양성반응을 나타내었다(Fig 10c).

(4) Glibenclamide 단독투여군 : Glibenclamide를 투여하여  $K_{ATP}$  통로를 차단한 군에서는 처치후 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을 나타내었고(Fig 11a), 12시간 경과군과 24시간 경과군에서는 경도(+)의 양성반응을 나타내었다(Fig 11b, 11c).

##### 2) 실험군 :

(1) 허혈군 : 4시간의 허혈을 시행한 허혈군에서 재관류 직후에는 경도(+)의 양성반응을 나타내었고(Fig 12a), 12시간 경과군에서는 경도(+) 혹은 미약한(±) 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 12b). 24시간 경과군에서는 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을 나타내었다(Fig 12c).

(2) 허혈양상화 및 허혈군 : 허혈양상화 및 허혈군에서는 재관류 직후에 단면적이 작은 근육섬유에서 Mn-SOD

Table 1. Immunoreactivities of SOD in the ischemic reperfused rectus femoris muscles of rats

Groups	Enzyme reperfusion time			Cu,Zn-SOD			Mn-SOD		
	0	12	24	0	12	24	0	12	24
IPC	L	±	±	+	±, +	±, +	+	±, +	+
	S	++	++, +	++, +++, +	++	+	++	++	++, +++, +
KA	+ , ++	±, +	+	+	+	+	+ , ±	+	+
KB	+	+ , ++	±, +	+ , ++	+	+	+	+	+
4H	+	+ , ±	+ , ++	+	+	+	+ , ±	+ , ++	+ , ++
IPC 4H	L	+	+ , ±	+	+ , ±	±, +	±, +	+	+
	S	++	++	+	+ , ++	++	++	+ , ++	+ , ++
4H KA	++ , +++, +	+ , ++	+ , ++	+ , ++	++ , +++, ±	++ , +++, +	+ , ++	+ , ++	+ , ++
KB IPC 4H	+ , ++	++ , +, ++	+	++	++ , +, ++	++ , +, ++	++	++ , +, ++	++

##### Abbreviation

IPC : ischemic preconditioning only group, KA : group of  $K_{ATP}$  channel activation by the pinacidil i.v., KB : group of  $K_{ATP}$  channel blockade by the glibenclamide i.v., 4H : ischemia for 4 hours group, IPC 4H : group of ischemia for 4 hours after IPC, 4H KA : group of ischemia and  $K_{ATP}$  channel activation by the pinacidil i.v., KB IPC 4H : group of IPC and ischemia after  $K_{ATP}$  channel blockade by the glibenclamide i.v., L : large-sized muscle fibers, S : small-sized muscle fibers.

##### Score of immunoreactivity

± : trace immunoreactivity, + : weak immunoreactivity, ++ : moderate immunoreactivity, +++ : strong immunoreactivity.

의 활성이 경도(+) 혹은 중등도(++)로 나타났으며 단면적이 큰 근육섬유에서는 경도(+) 혹은 미약한(±) 반응을 나타내었다(Fig 13a). 재관류 12시간 경과시에는 단면적이 작은 근육섬유에서 중등도(++)의 양성반응을, 단면적이 큰 근육섬유에서 미약한(±) 혹은 경도(+)의 양성반응을 나타내었다(Fig 13b). 재관류 24시간 경과군에서는 단면적이 작은 근육섬유에서 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을, 단면적이 큰 근육섬유에서는 경도(+)의 양성반응을 나타내었다(Fig 13c).

(3) 허혈 및 pinacidil 투여군 : 허혈 및 pinacidil 투여군에서는 재관류 직후에 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을(Fig 14a), 12시간 경과군에서는 중등도(++) 혹은 강한(+++) 및 미약한(±) 반응을 나타내었다(Fig 14b). 재관류 24시간 경과군에서는 경도(+) 혹은 중등도(++)의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 14c).

(4) Glibenclamide 투여후 허혈양상화 및 허혈군 : Glibenclamide를 투여하여  $K_{ATP}$  통로차단한 후 허혈양상화 및 허혈을 시행한 군에서는 재관류 직후 중등도(++)의 Mn-SOD 활성을(Fig 15a), 12시간 경과시에는 강한(+++) 혹은 중등도(++)의 반응을(Fig 15b), 24시간 경과시에는 중등도(++)의 반응을 나타내었다(Fig 15c).

#### Apoptosis 관찰(Table 2) :

*in situ hybridization* 결과 : 검색 kit에 제공된 표본으로 TdT enzyme을 제거하여 시행한 음성대조군에서는 apoptosis 발현을 관찰할 수 없었으며 양성대조 표본의 경우 apoptosis 발현이 뚜렷하였다(Fig 16a).

#### 1) 대조군 :

(1) 정상대조군 : 정상대조군의 대퇴골은근에서 apoptosis 검색결과 음성이었다(Fig 16b).

(2) 허혈양상화군 : 허혈양상화군에서 apoptosis 검색결과 24시간 경과시까지 모두 음성반응을 보였다(Fig 17a-c).

(3) Pinacidil 단독투여군 : Pinacidil을 투여하여  $K_{ATP}$  통로를 활성화한 군에서는 약제투여 직후에서부터 24시간 경과시까지 apoptosis에 대한 반응이 음성이었다(Fig 18a-c).

(4) Glibenclamide 단독투여군 :  $K_{ATP}$  통로를 차단하기 위하여 glibenclamide를 투여한 군에서는 약제투여 20분 후 경도(+)Fig 19a), 12시간 경과시에는 apoptosis에 대해 강한 경도(++)로 일어났고(Fig 19b), 24시간 경과시에는 미약한(±) 반응을 나타내었다(Fig 19c).

#### 2) 실험군 :

(1) 허혈군 : 4시간의 허혈을 시행한 허혈군에서 재관류 직후 강한(+++) 정도의 apoptosis가 일어났다(Fig 20a). 재관류 12시간 경과시에는 중등도(++)의 apoptosis가 일어났으며(Fig 20b), 24시간 경과시 강한(+++) 정도로 일어났다(Fig 20c).

(2) 허혈양상화 및 허혈군 : 허혈양상화 및 허혈군에서는 재관류 직후와 12시간 경과시 경도(+)의 apoptosis가 일어났으며(Fig 21a-b), 24시간 경과시에는 미약한(±) 반응을 나타내었다(Fig 21c).

(3) 허혈 및 pinacidil 투여군 : 허혈 및 pinacidil 투여군에서 apoptosis에 대한 반응은 재관류 직후와 재관류 12시간 경과시까지 미약한(±) 정도로 염색된 핵이 나타났

Table 2. Localization and assessment of *in situ* DNA fragmentation by TUNEL staining in the ischemic reperfused rectus femoris muscles of rats

Groups	Reperfusion time(hours)	0	12	24
IPC	-	-	-	±
KA	-	-	-	-
KB	+	+++	++	±
4H	+++	++	++	+++
IPC 4H	+	+	+	±
4H KA	±	±	±	+,±
KB IPC 4H	++	±	±	-

Abbreviation is same as table 1. Score of incidence of apoptosis :

- : negative reaction, ± : trace reaction, + : small number of apoptosis, ++ : moderate number of apoptosis, +++ : many number of apoptosis.

으나(Fig 22a-b), 24시간 경과시에는 경도(+)로 일어났으며 일부 미약한(±) 정도의 반응을 보이는 핵이 관찰되었다(Fig 22c).

(4) Glibenclamide 투여후 허혈양상화 및 허혈군 : Glibenclamide를 투여하여  $K_{ATP}$  통로차단한 후 허혈양상화 및 허혈을 시행한 군에서는 재관류 직후 증등도(++)로 일어났으며(Fig 23a), 12시간 경과시는 미약한(±) 반응을 보였으며(Fig 24b), 24시간 경과시는 음성을 나타났다(Fig 24c).

## 고 찰

본 연구는 허혈양상화의 보호효과에 관련되어 있는  $K_{ATP}$  통로의 활성으로 인해 초래되는 SOD의 활성 변화와 apoptosis의 발현을 관찰하고자 이루어졌다.

$K_{ATP}$  통로활성은 acetylcholine<sup>15</sup>의 보호효과, protein kinase C의 활성으로 인한 허혈양상화 효과<sup>21</sup>, adenosine A<sub>1</sub> 수용체<sup>18</sup>와 adenosine<sup>16</sup>에 의해 유도된 보호효과에 필요하다.  $K_{ATP}$  통로활성으로 인한 보호기전은 활성화된 A<sub>1</sub> 수용체가 Gi 단백을 통해  $K_{ATP}$  통로를 개방시키며 그 결과 K<sup>+</sup> 유출이 증가하고 세포막은 과분극되므로 세포막은 voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> 통로의 개방억제로 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 막게 되며 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 감소는 결과적으로 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)를 일어나지 않게 하여 에너지 소모가 줄어들게 되므로  $K_{ATP}$  통로의 활성을 통한 허혈양상화의 효과는 ATP의 소모와 글리코겐 분해, 협기성 포도당분해가 감소되고 따라서 대사물의 축적감소와 에너지원이 소량이긴 하나 보존되어 일어나는 것으로 여겨진다<sup>14</sup>.

골격근육의 허혈 및 재관류손상의 원인으로 산소대사물에 대한 관심이 높아지고 있으며 세포내 항산화제가 관련이 있는 것으로 여겨지고 있다. 허혈시 근육내 형성되는 ATP의 대사물인 hypoxanthine이 재관류시 산소가 공급되면 xanthine oxidase와 반응하여 초산소기가 형성되며 이로 인해 근육손상이 일어난다<sup>25</sup>. 체내에서 생성되는 자유산소기의 96~99%는 정상적으로 cytochrome oxidase에 의해서 분해되며 자유산소기가 형성되면 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소들이 활성화되어 대사시키지만 허혈 및 재관류로 인하여 자유산소기가 다량 생성됨으로써 이들의 균형이 깨어지면 손상이 일어난다고 알려져 있다<sup>22,24</sup>. 자유산소기는 DNA

를 손상시키고<sup>39</sup>, adenine nucleotide의 이화작용을 유발한다<sup>40</sup>. Cheng et al<sup>31</sup> 및 Stangel et al<sup>29</sup>은 자유산소기가 apoptosis와 관련된 인자라고 하였으며 Ambrosio et al<sup>30</sup>, Buttke와 Sandstrom<sup>28</sup>는 허혈 및 재관류로 인한 apoptosis 발현에 자유산소기가 관여할 것이라고 하였다.

자유산소기인 초산소기가 형성되면 이를 대사시키는 SOD가 활성화 되거나 발현된다. SOD는 초산소기를 대사시켜 산소분자와 물이 형성되게 하며 아울러 반응성이 높은 반응성 수산기의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. SOD는 세포질에서 지속적으로 발현하는 Cu, Zn-SOD와, 외부자극에 의해 발현되며 사립체에 분포하는 Mn-SOD 그리고 조직분포는 가장 적지만 세포외액에 존재하는 extracellular(EC-SOD)가 있다<sup>41-43</sup>. 그리고 Mn-SOD의 활성이 높게 나타나는 것은 자유산소기가 활발하게 형성되었음을 의미하며<sup>27</sup> 심근에서 허혈자극으로 protein kinase C가 발현되면 혈관내피세포에서 Mn-SOD의 발현이 일어나 재관류시 형성되는 자유산소기를 처리하여 세포를 보호한다<sup>44</sup>. 백 등<sup>45,46</sup>은 흰쥐에서 2시간 허혈후 재관류시 SOD의 활성이 증가하지만 변동이 있으며 24시간 이후 정상이 된다고 하였다. 여러 연구에서 SOD를 허혈전 처리하면 보호효과가 있으며<sup>47,48</sup> 초산소기의 작용으로 유발되는 apoptosis의 발현을 감소<sup>49</sup>시키지만 재관류시 처리시는 이러한 보호효과가 없다<sup>50</sup>.

본 실험에서는 근육섬유의 종류를 구분하여 볼 수는 없었으나 적색근육세포(red muscle fiber)로 생각되는 단면적이 적은 근육섬유와 백색근육세포(white muscle fiber)로 생각되는 단면적이 큰 근육섬유에서 허혈양상화 처리후 SOD 활성에 차이를 볼 수 있었다. 허혈양상화만을 시행한 군에서는 Cu,Zn-SOD 활성은 단면적이 적은 근육섬유에서 활성이 중등도로 높았으며, 12시간 경과시 약간 감소하였다가 24시간 경과시 다시 강한 발현을 보였다. Mn-SOD는 허혈양상화 직후, 24시간 경과시 증가였다. Pinacidil 단독투여군 및 glibenclamide 단독투여군에서는 Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD의 활성이 높지 않았고 변동양상을 보였으나 두 효소간의 변동양상은 일치하지 않았다.

또한 4시간 허혈 및 재관류시에도 SOD의 활성이 높지 않았으며 변동양상을 보였고, 두 효소의 변동양상은 비슷하게 나타났다. 허혈양상화 및 허혈군에서 재관류시에는 허혈양상화 만을 처리한 군에서처럼 단면적이 큰 섬유와 적은 섬유에서 차이를 보였으며 단면적이 적은

섬유에서 활성이 두드러졌다. 단면적이 적은 섬유에서 Cu,Zn-SOD의 활성은 재관류 직후와 12시간 경과시 증가하여 있었다. Mn-SOD 활성은 재관류 직후 높지 않았으나 12시간 경과시 증가하였으며 24시간 경과시는 두드러진 증가를 보이지 않아 두 효소간의 활성 변동양상은 차이를 보였다. 허혈 및 pinacidil 투여후 재관류군에서는 Cu,Zn-SOD의 활성이 재관류 직후 증가를 보였으며 Mn-SOD의 활성은 재관류 직후 높지 않았으나 12시간 경과시 높은 활성을 보였고 24시간 경과시 다시 감소하였다. Glibenclamide 투여후 허혈양상화 및 허혈군에서는 Cu,Zn-SOD의 활성이 재관류 12시간 경과시 높은 증가를 나타냈으며 Mn-SOD의 활성은 재관류 직후와 12시간, 24시간 경과시 높았으며 12시간 경과시 가장 높은 활성을 보였다. 이 실험군에서는 두 효소의 활성 변동폭은 다르지만 변동양상은 유사하게 나타났다.

Steinküller *et al*<sup>43</sup>은 Cu,Zn-SOD는 지속적으로 발현되는 효소이고 Mn-SOD는 외부자극으로 발현되는 효소라 하였으나 본 실험에서는 백 등<sup>45</sup>의 결과와 같이 Cu,Zn-SOD도 외부자극에 의해 활성화 될 수 있음을 관찰하였다. 본 실험에서는 허혈양상화군, 4시간 허혈 및 재관류군, glibenclamide 처리와 허혈양상화 후 허혈 및 재관류군에서 두 효소의 활성 변동폭이 유사함을 볼 수 있었고 4시간 허혈 및 재관류시 효소활성이 뚜렷하지 않은 것은 2시간 허혈 및 재관류시 Cu,Zn-SOD의 활성이 재관류 후 증가하여 6시간 경과후 증가한다는 보고<sup>46</sup>와 1, 2, 24시간 후 증가한다는 결과<sup>46</sup>와 다르게 나타났다. 이는 허혈시간이 길수록 근육손상이 심하고<sup>48</sup>, 골격근육에서 4시간 허혈시 비가역적인 손상이 일어나는 점으로 보아 본 실험에서 시행한 4시간 허혈은 효소활성에도 영향을 준 것으로 생각된다. 그리고 SOD 활성이 자유산소기의 생성을 의미한다는 보고<sup>27</sup>와 허혈양상화로 4시간 허혈 및 재관류손상을 보호할 수 있다는 점을 고려할 때 골격근육에서 허혈양상화로 인한 SOD 활성은 자유산소기가 형성되었고 이는 SOD에 의해 처리될 수 있는 범위였다고 생각된다. 또한 허혈양상화 조작을 한 군에서 활성이 높고 K<sub>ATP</sub> 통로의 활성 및 차단을 단독적으로 시행한 군에서는 활성이 정상대조군과 유사한 것으로 보아 Mn-SOD 활성과 Cu,Zn-SOD 활성이 허혈양상화 조작과 관련이 있으며 pinacidil과 glibenclamide 단독처리와 직접적으로 관련이 없다고 생각된다. 그리고 허혈 및 K<sub>ATP</sub> 통로 활성화군에서 재관류 초기에 SOD의 활성이 높고, K<sub>ATP</sub>

통로차단후 허혈양상화 및 허혈군에서 SOD의 활성이 낮았던 점은 허혈 및 재관류조작이 있는 상태에서 K<sub>ATP</sub> 통로활성 및 차단은 SOD의 활성과 관련이 있을 것으로 추정된다. 한편 단면적이 적은 근육섬유에서 SOD의 활성이 더 높게 나타나는 것은 단면적이 적은 근육섬유에서 사립체의 비율이 높게 존재하기 때문일 수 있지만 이에 대한 연구가 더 필요하다.

최근에 Cheng *et al*<sup>31</sup>은 심근에서, Stangel *et al*<sup>29</sup>은 시험관내에서 골격근육모세포는 산소기에 의해 apoptosis가 일어날 수 있다고 하였고 Ambrosio *et al*<sup>30</sup>, Gottlieb *et al*<sup>34</sup>, MacLellan과 Schneider<sup>33</sup>는 허혈 및 재관류시에 발생된다고 하였으며 Ambrosio *et al*<sup>30</sup>는 이러한 원인은 재관류시 발생되는 자유산소기라 주장하였다.

본 연구에서 대조군, K<sub>ATP</sub> 이온통로 활성화하거나 허혈양상화를 시행한 군에서는 음성, 미약한 정도 및 약한 정도의 apoptosis를 보였고 허혈군, K<sub>ATP</sub> 통로를 차단한 군, 허혈양상화와 허혈을 하기 전에 앞서 K<sub>ATP</sub> 통로를 차단한 군에서는 중등도 및 강한 정도의 apoptosis가 일어났으며 허혈군을 제외하고 재관류 24시간 후에 감소되어 나타난 결과는 골격근육에서 4시간의 허혈 및 재관류로 인하여 발생될 수 있음을 나타낸 것이고 허혈양상화의 apoptosis 발생 감소효과가 K<sub>ATP</sub> 통로를 부분적으로 경유함을 의미한다. K<sub>ATP</sub> 통로활성 이후의 과정은 아직까지 알려져 있지 않고, 본 연구에서 골격근육의 수축정도를 측정하지 않아 단정하기는 어려우나 많은 연구자들의 주장과 같이 칼슘이온의 과다한 유입을 막고 수축을 감소시킴으로써 관여할 것이고 아울러 대사물의 축적감소가 이루어졌을 것으로 생각된다.

본 실험에서 일어난 apoptosis는 재관류를 시행한 상태에서 시료를 채취한 바 허혈 및 재관류로 인한 것으로 생각된다. 또한 장시간의 허혈 및 재관류에 의한 세포의 산성화, ATP 소모, 칼슘이온 축적, 자유산소기 발생 등의 세포적 특징<sup>22</sup>은 세포의 apoptosis가 에너지를 필요로 하는 과정이며 칼슘이온<sup>51</sup>과 자유산소기가 관여되어 있고 세포의 산성화가 특징인 점과 부합한다. 본 연구에서 허혈 및 재관류로 인한 apoptosis 발현이 재관류 24시간 경과시까지 발현하는 것을 관찰할 수 있었으며 골격근육에서 근육세포의 핵이 apoptosis가 일어나는 시간은 대략 45분이고<sup>52</sup>, 다햅세포의 핵은 개별적으로 apoptosis를 겪으며<sup>53</sup> 심근에서 apoptosis 발현이 48시간 경과시에도 일어나므로<sup>30</sup> 장시간에 걸쳐 apoptosis가 일어났다고 생

각된다. 본 연구에서는 근육세포에서 **apoptotic bodies**가 검색되지 않았는데 허혈로 손상된 근육세포가 4일후 재생된다<sup>37</sup>는 것을 고려하면 본 실험에서와 같이 24시간 이내에는 관찰하기 어려운 것 같다. 그리고 검색에 적절한 시간이 아니었거나 혹은 피사로 전환되었을 가능성, apoptosis 과정의 일부만이 이루어졌기 때문일 것이다<sup>34</sup>. 뿐만 아니라 apoptosis의 과정이 더욱 진행되지 않았을 수도 있으므로 보다 더 긴 시간에 걸쳐 관찰이 필요할 것이다. 미약하게 관찰된 apoptosis 반응은 피사에 따른 큰 DNA의 분절로 생각할 수 있겠으나 분절이 이루어졌다 면 점차 강한 반응으로 나타날 것을 고려할 때 시간이 지날수록 더 강하게 반응을 보이지 않았던 본 연구에서는 이를 배제할 수 있다. 또한 피사세포에서 일어나는 분절은 초기에 관찰할 수 없으며 분절된 DNA를 가진 피사세포는 apoptosis 세포보다 퍼져있으므로<sup>34</sup> 피사로 인한 TUNEL 반응은 배제할 수 있었다. 그외 부형제로 사용한 DMSO 영향을 생각할 수 있겠으나 DMSO만을 투여한 정상대조군에서 음성으로 나타났고 동일한 부형제를 사용한 pinacidil 단독처리군과 glibenclamide 처리군에서 차이를 보여 그 영향은 크지 않은 것으로 보인다. 따라서 미약한 반응이 나타난 점에 대해 좀더 연구하여야 할 것이다. 그리고 근육조직에 존재하는 근위성세포는 근육섬유 200 $\mu\text{m}$ 당 전혀 관찰되지 않거나 1~2개가 존재하고<sup>35</sup> 근육세포는 장방형의 핵이며 보다 크고 근육섬유의 위에 위치하는 점으로 혈관내피세포와 구별할 수 있으므로<sup>34</sup> apoptosis 발현 검색시 근위성세포와 혈관내피세포는 제외될 수 있었다.

한편 glibenclamide 단독처리군에서 24시간 경과시 apoptosis 염색에 미약하게 반응하였고 glibenclamide와 허혈양상화 처리후 4시간 허혈 및 재관류군에서는 12시간 경과시 미약한 반응과 24시간 경과시 음성으로 나타난 것으로 보아 glibenclamide 작용은 12~16시간 정도 유지되는 것으로 생각된다. 이것은 Cu,Zn-SOD의 활성 소견과 부합되기도 하였다.

본 실험에서 나타난 SOD의 활성과 apoptosis 발현과의 관계를 보면 Cu,Zn-SOD의 활성이 초기에 낮았던 4시간 허혈 및 재관류군, K<sub>ATP</sub> 통로차단후 허혈양상화 및 허혈군에서 재관류시 apoptosis 발현이 높게 관찰되었다. 반면 Cu,Zn-SOD의 활성이 높았던 허혈양상화군, 허혈양상화 및 허혈군에서는 apoptosis가 관찰되지 않았거나 감소되었고 특히 K<sub>ATP</sub> 통로차단후 허혈양상화 및 허혈군에

서 재관류 12시간 및 24시간 경과시에는 감소되어 나타나 서로 관련성이 있음을 보여주었다. 한편 Mn-SOD의 활성은 apoptosis 발현이 있었던 허혈군에서 낮게 나타났으나 apoptosis 발생이 감소되었던 허혈양상화 및 허혈군의 재관류 직후 그리고 허혈 및 K<sub>ATP</sub> 통로활성화군의 재관류 직후에서도 낮게 나타나 apoptosis 발현 감소와 관련이 적은 것으로 생각되었다. 이는 허혈양상화로 인한 허혈 및 재관류 방어효과에 있어서 Cu,Zn-SOD가 더 밀접하게 관련되어 있음을 나타내는 것이다. 흰쥐의 SOD 활성의 85~90% 이상이 Cu,Zn-SOD에 의해 나타나므로<sup>36</sup> apoptosis 발현이 감소한 군에서는 허혈양상화로 인하여 재관류시 발생되는 산화자극을 처리할 수 있도록 항산화효소의 활성이 높아져 있는 것으로 생각된다. 그리고 pinacidil 단독투여시 apoptosis 발현이 없었으나 glibenclamide 단독투여시에 apoptosis가 관찰되었던 것은 SOD의 활성과 무관한 듯하다. 즉, K<sub>ATP</sub> 통로의 직접적인 활성 및 차단은 자유산소기 발생과 무관한 듯하다.

한편 허혈양상화만을 시행한 군에서 24시간후 다시 SOD의 활성이 높게 나타나고 4시간의 허혈시간이 개재한 허혈양상화 및 허혈군, K<sub>ATP</sub> 통로차단 후 허혈양상화 및 허혈군에서 12시간 경과시 높은 SOD의 활성을 볼 수 있었던 점은 심장에서 허혈양상화의 효과가 24시간후 다시 나타나므로<sup>4</sup> 꼴격근육에서도 허혈양상화의 효과가 24시간후 다시 나타날 수 있는 것이고 SOD가 24시간 이후 다시 나타나는 보호효과에 관여할 것으로 생각되지만 이에 대해 보다 더 많은 시간경과를 두고 연구해 보아야 할 것이다.

자유산소기는 여러가지 작용을 유발할 수 있고<sup>37</sup> 산소자극에 노출된 세포에서 endonuclease 활성에 의한 DNA의 손상이 일어나는 것<sup>38</sup>으로 보아 apoptosis 발현에 자유산소기가 일부 관여하고 있음을 알 수 있다. 그러나 Hockenberry *et al*<sup>8</sup>은 Mn-SOD 처리시 apoptosis를 억제되지 않았다고 하였고, 본 연구결과 4시간 허혈 및 재관류시 SOD의 발현이 높지 않았던 점으로 미루어 볼 때 자유산소기의 역할은 더 규명되어야 할 것으로 판단된다. 다만 소량의 자유산소기가 K<sub>ATP</sub> 통로를 활성화 할 수 있고<sup>39</sup>, 허혈양상화를 막개할 수 있으며<sup>40</sup>, 본 연구에서와 같이 SOD의 활성이 높았던 군에서 apoptosis가 감소되었으므로 치명적이지 않은 양의 자유산소기는 허혈양상화의 보호효과에 부분적으로 관여하고 있을 것이다<sup>40</sup>.

이상으로 보아 허혈 및 재관류에 의한 손상에 대해 허

혈양상화의 보호효과는 Mn-SOD의 활성 보다 Cu,Zn-SOD의 활성과 부분적으로 관련이 있으며 허혈양상화로 인한 허혈 및 재관류시 apoptosis의 발현감소 효과는  $K_{ATP}$  통로를 부분적으로 경유하는 것으로 결론지을 수 있었다. 아울러 SOD의 활성은 직접적인  $K_{ATP}$  통로의 활성 또는 차단조작을 통해 이루어지지 않았으나 허혈양상화로 인한 SOD 활성증가와 apoptosis 발생 감소효과는 관련이 있는 것으로 결론지을 수 있었다.

## 결 론

장시간의 허혈 및 재관류는 세포의 손상을 일으키며 허혈양상화 조작으로 이러한 세포손상이 약화된다고 알려져 있다. 허혈 및 재관류의 세포손상요인으로 재관류시 발생하는 초산소기에 대한 작용이 관심의 대상이 되고 있으며 세포에는 이를 대사시키는 Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD가 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 최근에 허혈 및 재관류시 발생하는 자유산소기가 apoptosis를 유발할 수 있음이 제시되었으나 허혈양상화에 의한 감소효과는 그 기전이 밝혀져 있지 않다. 한편 많은 동물에서  $K_{ATP}$  통로의 활성은 허혈양상화의 세포보호 기전과 관련이 있다고 주장되고 있다. 따라서 허혈양상화 조작이 이들 두가지 SOD의 활성 증가와 관련이 있는지 그리고 허혈 및 재관류로 인한 apoptosis 발생을  $K_{ATP}$  통로의 활성과 관련하여 감소하는지 규명하고자 흰쥐의 대퇴골은근을 대상으로 본 연구를 시도하였다. 허혈양상화조작은 총 장골동맥을 혈관집게로 결찰하여 5분간의 허혈과 5분간의 재관류를 3회 반복하였고 허혈조작은 4시간동안 총 장골동맥을 결찰하여 처리하였다.  $K_{ATP}$  통로의 활성 및 차단은 각각 pinacidil(1mg/Kg, i.v.)과 glibenclamide(0.5mg/Kg, i.v.)를 사용하였으며, 실험동물은 1) 정상대조군, 2) 허혈양상화군, 3) pinacidil 단독투여군, 4) glibenclamide 단독투여군, 5) 허혈군, 6) 허혈양상화 및 허혈군, 7) 허혈 및 pinacidil 투여군, 8) glibenclamide 투여후 허혈양상화 및 허혈군으로 나누었다. 각 군은 처치후 경과시간에 따라 또는 재관류경과시간에 따라 재관류 직후와 12, 24시간 경과군으로 구분하였다. 동결절편에서 sheep antihuman Cu,Zn-SOD 및 Mn-SOD 항체를 1차 항체로 하고 ABC kit와 DAB kit를 이용하여 SOD의 활성을 관찰하였고 파

라핀 절편에서 apoptosis를 발현을 TUNEL 방법으로 검색하고 말현세포수에 따라 강한(+++), 중등도(++) 및 경도(+)로 구분하였고 불완전한 반응을 보이는 미약한(±) 정도로 구분하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 허혈양상화 후 Cu,Zn-SOD 활성은 24시간 경과시까지 증가하였고 Mn-SOD의 활성은 허혈양상화 직후와 24시간 경과시 증가하였으며 주로 단면적이 적은 근육섬유에서 증가폭이 컸다.

2. Piacidil과 glibenclamide의 단독 처리는 SOD의 활성을 증가시키지 않았으며 4시간 허혈 및 재관류군에서 SOD의 활성은 증가하지 않았다.

3. 허혈양상화 후 허혈군 및 재관류군, 허혈 및 pinacidil 투여후 재관류군에서는 Cu,Zn-SOD의 활성이 높았다.

4.  $K_{ATP}$  통로차단 및 허혈양상화 후 허혈 및 재관류군에서는 12시간 경과시 Cu,Zn-SOD의 활성이 증가하였으며 Mn-SOD의 활성은 재관류 직후, 12시간 및 24시간 경과군에서 높았다.

5. 대조군, pinacidil 투여군에서는 음성, 미약한 정도의 apoptosis를 보였고 glibenclamide 투여군에서는 apoptosis의 발생이 있었다.

6. 허혈 및 재관류군 그리고  $K_{ATP}$  통로차단 및 허혈양상화 후 허혈 및 재관류 군의 재관류 직후 중등도 및 강한 정도의 apoptosis가 일어났으나 허혈양상화 및 허혈군, 허혈 및 pinacidil 투여군에서는 apoptosis의 발생이 감소되었다.

7. 4시간의 허혈과 재관류 조작이 있었던 실험군에서 Cu,Zn-SOD의 활성증가와 apoptosis 발현 감소는 일차하는 경향을 나타내었다.

이상을 종합하면 허혈 및 재관류에 의한 손상에 대해 허혈양상화의 보호효과는 Mn-SOD의 활성보다 Cu,Zn-SOD의 활성과 부분적으로 관련이 있으며 허혈양상화로 인한 허혈 및 재관류시 apoptosis의 발현감소 효과는  $K_{ATP}$  통로를 부분적으로 경유하는 것으로 결론지을 수 있었다. 아울러 SOD의 활성은 직접적인  $K_{ATP}$  통로의 활성 또는 차단 조작을 통해 이루어지지 않았으나 허혈양상화로 인한 SOD 활성 증가와 apoptosis 발생 감소효과는 관련이 있는 것으로 결론지을 수 있었다.

## Legend for figures

- Fig 1. Cu,Zn-SOD immunoreactivities on cross section of rectus femoris muscle in the control rat. There are no activities on the muscle fibers in negative staining (1a), however, weak activities are seen in positive staining (1b). Mn-SOD immunoreactivities on cross section of rectus femoris muscle in the control rat. There are no activities on the muscle fibers in negative staining (1c), however, weak activities in positive staining are seen (1d).
- Fig 2. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of ischemic preconditioning only groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the moderate activities on the small-sized muscle fibers and trace activities on the large-sized muscle fibers in immediately (2a), moderate or weak activities on small-sized fibers and trace activities on large-sized fibers in 12 hours (2b), moderate or strong activities on small-sized fibers and weak activities on large-sized fibers in 24 hours (2c) after the ischemic preconditioning.
- Fig 3. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the pinacidil only treated groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak or moderate activity in 5 minutes after pinacidil treatment (3a), trace or weak activities in 12 hours (3b), and weak activities in 24 hours (3c) after the treatment.
- Fig 4. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the glibenclamide only treated groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak activities in 20 minutes (4a), weak or moderate activities in 12 hours (4b), and trace or weak activities in 24 hours (4c) after the treatment.
- Fig 5. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the groups of 4 hour ischemia groups on the cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak activities in immediately (5a), weak or trace activities in 12 hours (5b), and weak or moderate activities in 24 hours (5c) after the reperfusion.
- Fig 6. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the 4 hour ischemia after ischemic preconditioning groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the strong activities on small-sized fibers and weak activities on large-sized fibers in immediately (6a), moderate activities on small-sized fibers and weak or trace activities on large-sized fibers in 12 hours (6b), weak activities in the muscle fibers in 24 hours (6c) after reperfusion.
- Fig 7. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the 4 hour ischemia and pinacidil treatment groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the moderate or strong activities in immediately (7a), and weak or moderate activities in 12 hours, 24 hours (7b-c) after the reperfusion.
- Fig 8. Cu,Zn-SOD immunoreactivities of the ischemic preconditioning and 4 hour ischemia after glibenclamide treatment groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak or moderate activities in immediately (8a) and strong or moderate activities in 12 hours (8b), and weak activities in 24 hours (8c) after the reperfusion.
- Fig 9. Mn-SOD immunoreactivities of ischemic preconditioning only groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the moderate activities on small-sized fibers and trace or weak activities on large-sized fibers in immediately (9a), weak activities on small-sized fibers and trace or weak activities on large-sized fibers in 12 hours (9b), moderate or strong activities on small-sized fibers and weak activities on large-sized fibers in 24 hours (9c) after the treatment.
- Fig 10. Mn-SOD immunoreactivities of the pinacidil only treated groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak activity in 5 minutes (10a), and weak or trace activities in 12 hours (10b), and weak activities in 24 hours (10c) after the treatment.
- Fig 11. Mn-SOD immunoreactivities of the glibenclamide only treated groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak or moderate activities in 20 minutes (11a), and weak activities in 12 hours (11b), 24 hours (11c) after the treatment.
- Fig 12. Mn-SOD immunoreactivities of the groups of 4 hour ischemia groups on the cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak activities in immediately (12a), weak or trace activities 12 hours (12b) and weak or moderate activities in 24 hours (12c) after reperfusion.
- Fig 13. Mn-SOD immunoreactivities of the 4 hour ischemia after ischemic preconditioning groups on cross section of rectus femoris

muscle. There are weak or moderate activities on small-sized muscle fibers and weak or trace activities on large-sized fibers in immediately (13a), moderate activities on small-sized fibers and trace or weak activities on large-sized fibers in 12 hours (13b), weak or moderate activities in small-sized fibers and weak activities in large-sized fibers in 24 hours (13c) after reperfusion.

**Fig 14.** Mn-SOD immunoreactivities of the 4 hour ischemia and pinacidil treatment groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the weak or moderate activities in immediately (14a), the moderate or strong and trace activities in 12 hours (14b), and the weak or moderate activities in 24 hours (14c) after the reperfusion.

**Fig 15.** Mn-SOD immunoreactivities of the ischemic preconditioning and 4 hour ischemia after glibenclamide treatment groups on cross section of rectus femoris muscle. There are shown the moderate activities in immediately (15a), the strong or moderate activities in 12 hours (15b), and moderate activities in 24 hours (15c) after the reperfusion.

**Fig 16.** Apoptotic reaction on the positive control tissue(rat mammary gland) provided in the kit and on cross section of rectus femoris muscle. Positive reaction was seen in brown color (16a). There are no reactive nuclei on the control muscle fibers (16b), while many number (16c) of apoptotic nuclei were shown on the muscle fibers. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 17.** Apoptotic reaction on rectus femoris muscle in ischemic preconditioning only groups. There are no reactive nuclei on the muscle fibers in immediately (17a), 12 hours (17b), and 24 hours (17c) after the treatment. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 18.** Apoptotic reaction on cross section of rectus femoris muscle in pinacidil treatment only groups. There are no reactive nuclei on the muscle fibers in 5 minutes (18a), 12 hours (18b) and in 24 hours (18c) after the treatment. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 19.** Apoptotic reaction on cross section of rectus femoris muscle in glibenclamide only treatment groups. The small number of apoptotic nuclei in 20 minutes (19a), and the many number of the nuclei in 12 hours (19b) were shown, while trace reaction of the muscle nuclei are seen in 24 hours (19c) after the treatment. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 20.** Apoptotic reaction on longitudinal section of rectus femoris muscle in the 4 hour ischemia groups. The many number of apoptotic nuclei in the immediately (20a) and 24 hours(20c) after reperfusion were shown. And the moderate number of apoptotic nuclei in 12 hours(20b) after the reperfusion were seen. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 21.** Apoptotic reaction on cross section of rectus femoris muscle in the 4 hour ischemia after ischemic preconditioning groups. The small number of apoptotic nuclei in the immediately (21a) and 12 hours (21b) after reperfusion were shown. However, the trace reactive nuclei are seen in 24 hours (21c) after the reperfusion. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 22.** Apoptotic reaction on cross section of rectus femoris muscle in ischemia and pinacidil treatment groups. The trace reactive nuclei are seen immediately (22a), 12 hours (22b) and 24 hours (22c) after reperfusion, and also the small number of positive nuclei were seen in 22c. TUNEL technique.  $\times 400$ .

**Fig 23.** Apoptotic reaction on cross section of rectus femoris muscle in ischemic preconditioning and 4 hour ischemia after glibenclamide groups. The moderate number of apoptotic nuclei in immediately (23a). While trace reactive nuclei are seen in 12 hours (23b) after reperfusion, but positive nuclei were not revealed in 24 hours (23c) after reperfusion. TUNEL technique.  $\times 400$ .







## 참 고 문 헌

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74:1124-1136, 1986.
2. Cohen MV, Downey JM. Myocardial stunning in dogs: Preconditioning effect and influence of coronary collateral flow. *Am Heart J*, 120:282-291, 1990.
3. Murphy E, Glasgow W, Fralix T, et al. Role of lipoxigenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ Res*, 76:457-467, 1995.
4. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 88:1264-1272, 1993.
5. Kida M, Fujiwara H, Ishida M, et al. Ischemic preconditioning preserves creatine phosphate and intracellular pH. *Circulation*, 84:2495-2503, 1991.
6. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res*, 75:586-590, 1994.
7. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A<sub>1</sub> adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 84:350-356, 1991.
8. Hockenberry DM, Oltval ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75:241-251, 1993.
9. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an  $\alpha_1$ -adrenergic mechanism. *Circ Res*, 73:656-670, 1993.
10. Bankwala Z, Hale SL, Kloner RA.  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation with exogenous norepinephrine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation*, 90:1023-1028, 1994.
11. Grover GJ, Dzwonczyk S, Slep P. Reduction of ischemic damage in isolated rat hearts by the potassium channel opener RP 52891. *Eur J Pharmacol*, 191:11-18, 1990.
12. Grover GJ. Protective effects of ATP-sensitive potassium channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 24(Suppl. 4):S18-S27, 1994.
13. Grover GJ, Slep P. Protective effects of K<sub>ATP</sub> openers in ischemic rat hearts treated with a potassium cardioplegic solution. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26:698-706, 1995.
14. Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A<sub>1</sub> receptors, K<sub>ATP</sub> channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*, 264:H1327-H1336, 1993.
15. Yao Z, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol*, 264:H2221-H2225, 1993.
16. Yao Z, Gross GJ. A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in the dogs. Efficacy, time course, and role of K<sub>ATP</sub> channels. *Circulation*, 89:1229-1236, 1994.
17. Grover GJ, McCullough JR, Henry DE, et al. Anti-ischemic effects of potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther*, 251:98-104, 1989.
18. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, et al. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K<sub>ATP</sub> channel. *Am J Physiol*, 266:H829-H839, 1994.
19. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol*, 267:H1341-H1352, 1994.
20. Cole WC, McPherson CD, Sontag D. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*, 69:571-581, 1991.
21. Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial *in vitro* model. *Circ Res*, 77:1030-1035, 1995.
22. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of

- reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis*, 30:23-44, 1987.
23. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59:527-605, 1979.
  24. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1404-1407, 1987.
  25. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med*, 312:159-163, 1985.
  26. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol*, 267:H 925-H930, 1994.
  27. Zhang P, Anglade P, Hirsch EC, et al. Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. *Neuroscience*, 61:317-330, 1994.
  28. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 15:7-10, 1994.
  29. Stangel M, BMedSci, Zettl UK, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55:36-43, 1996.
  30. Ambrosio G, Diana A, Becker LC, et al. Oxygen radical generation at reflow may induce apoptosis in postischemic hearts. *Circulation*, 90:I-428, 1994.
  31. Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*, 96:2247-2259, 1995.
  32. Buerke M, Murohara T, Skurk C, et al. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:8031-8035, 1995.
  33. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 81:137-144, 1997.
  34. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94:1621-1628, 1994.
  35. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, et al. Preconditioning in rabbit cardiomyocytes. Role of pH, vacuolar protein ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest*, 97:2391-2398, 1996.
  36. Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, et al. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts *in vivo*. *Circulation*, 96:1598-1604, 1997.
  37. Artacho-Pérula E, Roldán-Villalobos R, Vaamonde-Lemos R. Capillary and fiber size interrelationships in regenerating rat soleus muscle after ischemia : A quantitative study. *Acta Anat*, 142:70-76, 1991.
  38. 한규정, 염창섭, 김동호 등. 허혈양상화가 흰쥐 골격 근의 재관류손상에 미치는 영향에 관한 연구. 대한 해부학회지, 26:199-213. 1993.
  39. Mello Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J*, 218:273-275, 1984.
  40. Aalto TK, Raivio KO. Mechanisms of adenine nucleotide depletion from endothelial cells exposed to reactive oxygen metabolites. *Free Radic Biol Med*, 14: 177-183. 1993.
  41. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase : An enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6049-6055, 1969.
  42. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isozymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J*, 222:649-655, 1984.
  43. Steinkühler C, Carri MT, Michel G, et al. Copper-dependent metabolism of Cu,Zn-superoxide dismutase in human K562 cells ; lack of specific transcriptional activation and accumulation of a partially inactivated enzyme. *Biochem J*, 302:687-697, 1994.
  44. Strasser RH, Braun-Dullaeus R, Walendzik H, et al.  $\alpha_1$ -receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia : Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ Res*, 70: 1304-1312, 1992.
  45. 백두진, 양성범, 안동춘 등. 패색근위부 및 원위부의 근육세포에서 허혈후 재관류시 나타나는 superoxide dismutase의 활성변동에 대한 연구. 대한체질인류학회지, 10:93-111, 1997.

46. 백두진, 김병천. 허혈양상화, adenosine 및 pinacidil이 허혈 및 재관류된 흰쥐 넓다리 곧은근에서 SOD 활성변동에 미치는 영향. 대한체질인류학회지, 11:327-347, 1998.
47. Jeroudi MO, Patel B, Bolli R. Does superoxide dismutase or catalase alone attenuate myocardial stunning?. *Circulation*, 78(Suppl. II):II-78, 1988.
48. 백두진, 임재현, 정호삼. SOD, DMTU 및 허혈양상화 처치가 허혈 및 재관류에 의한 흰쥐 넓다리곧은근의 미세구조 변화에 미치는 영향. 한국전자현미경학회지, 27:333-346, 1997.
49. Abello PA, Fidlere SA, Bulkley GB, et al. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death(apoptosis) by endotoxin. *Arc Surg*, 129:134-141, 1994.
50. Faust KB, Chiantella V, Vinten-Johansen J, et al. Oxygen-derived free radical scavengers and skeletal muscle ischemic/reperfusion injury. *Am Surgeon*, 54:709-719, 1988.
51. Walker PR, Sikorska M. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol*, 72:615-623, 1994.
52. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al. Apoptosis : a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*, 273:C579-C587, 1997.
53. Dipasquale B, Youle RJ. Programmed cell death in heterokaryons. A study of the transfer of apoptosis between nuclei. *Am J Pathol*, 141:1471-1479, 1992.
54. Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*, 71:219-225, 1994.
55. 유기수, 고기석, 정인혁. 흰쥐 골격근섬유의 근섬유형에 따른 근핵 및 근위성세포의 수. 대한해부학회지, 20:159-163, 1987.
56. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increase oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*, 256:10986-10992, 1981.
57. Ambrosio G, Tritto I, Chiariello M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 27:1035-1039, 1995.
58. Ueda N, Saha SV. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest*, 90:2593-2597, 1992.
59. Tokube K, Kiyosue T, Arita M. Openings of ATP-sensitive potassium channels by different species of oxygen free radicals. *Circulation*, 90: I-525, 1994.
60. Tritto I, Scognamiglio A, Elia PP, et al. Oxygen free radicals may mediate preconditioning in isolated hearts. *Circulation*, 88:I-569, 1993.