

흰쥐 후지근 피판에서 허혈-재순환 손상시 pERK1/2 발현에 대한 α -lipoic acid의 효과

원광대학교 의과대학 성형외과학교실, 생리학교실*, 군산대학교 체육학과**

송정훈 · 김민선* · 박병림* · 박한수** · 채정룡** · 이혜미 · 나영천

— Abstract —

Effect of α -Lipoic Acid on Expression of pERK1/2 following Ischemia-Reperfusion Injury in the Hindlimb Muscle Flap of Rats

Jeong Hoon Song, M.D., Min Sun Kim, M.D.*, Byung Rim Park, M.D.*, Han Su Park**,
Jeong Ryong Chae**, Hye Me Lee, M.D., Young Cheon Na, M.D.

Department of Plastic & Reconstructive Surgery and Physiology*, School of Medicine, Wonkwang University,
Ik San, Department of Physical Education**, Kun San University, Kun san, Korea

Purpose: This study was to evaluate the effect of α -lipoic acid, a potent free radical scavenger, on the expression of active form of extracellular signal-regulated kinase (pERK1/2) proteins from hindlimb muscles of rats following ischemia-reperfusion injury.

Material and methods: 64 health, 280~350 g weighted Sprague-Dawley male rats were used. In order to make a muscle flap, the gastrocnemius (GC) and soleus (SOL) muscles were dissected and elevated. The popliteal artery was occluded for 4hours and reperfused for 10 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours and 4 hours, respectively.

Results: The ischemia by occlusion of the popliteal artery itself caused a minimal change in expression of phosphorylated form of proteins observed in hindlimb muscle. In contrast, after 4 hours of ischemia, immunoreactivity for pERK1/2 in the GC muscle showed dual peaks at 10 minutes and 4 hours after reperfusion. In α -lipoic acid treated group, the expression of pERK1/2 was increased significantly compared to I/R-only group.

Conclusion: These results suggest that α -lipoic acid may protect I/R injury of the skeletal muscle through free radical scavenging and activation of intracellular pERK1/2 expression

Key Words: α -Lipoic acid, pERK1/2, Ischemia-reperfusion injury, Muscle flap

※통신지자: 송 정 훈

전라북도 익산시 신용동 344-2

원광대학교 의과대학병원 성형외과학교실

Tel: 82-63-850-1291, Fax: 82-63-857-3704, E-mail: plasticos@hanmail.net

* 이 논문은 2000년 원광대학교 의과대학연구소의 학술연구비 지원에 의해서 연구됨

I. 서 론

허혈이 발생한 기관에 불가역적 조직손상을 예방하기 위하여 혈류의 재개가 필수적이지만 재순환이 허혈에 의한 손상보다 더 많은 조직손상을 유발할 수 있다. 이전에 생존 가능하였던 허혈손상을 받은 조직에서 재순환 후에 발생하는 조직손상을 허혈-재순환 손상이라고 한다.¹

Extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)는 세포내 신호전달체계인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 집합체 중의 하나이다. ERK1/2 신호전달체계는 기계적 신장, G단백결합 수용체 자극제, 허혈, 염증반응 등 다양한 자극에 의하여 활성화 되고 활성화된 pERK1/2 단백질은 다양한 세포기능들을 조절한다.² 뇌나 심장에서 산화성 스트레스에 반응하여 ERK1/2 신호체계의 활성화에 대한 많은 연구가 있으나 골격근에서의 연구는 미미한 상태이다.

α -Lipoic acid (LA)는 Reed 등에 의해 분리되었으며 체내에서 발생기 산소를 제거하는 효과가 있으며 다른 항산화제의 대사에 영향을 주고, 세포내 포도당 대사를 개선시키고, 당뇨병 다발성 신경병증을 개선시킨다.^{3,4}

LA의 항산화작용으로 인해 뇌와 신경, 심장계의 산화성 스트레스에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.⁵⁻⁷ 그러나 골격근에서의 항산화효과에 대한 연구와 ERK1/2 신호체계에 대한 연구는 부족한 상태이다.

이 연구에서는 속근(fast muscle)과 지근(slow muscle)으로 다른 성격을 갖는 비복근(gastrocnemius muscle)과 가자미근(soleus muscle)에 선택적으로 허혈-재순환 손상을 유발하기 위해 슬와동맥(popliteal artery)에 기저를 둔 비복근과 가자미근 피판을 이용하여 허혈-재순환 손상을 유도하였고, 허혈-재순환 손상에 의한 pERK1/2 단백질의 발현을 관찰하였으며, 이들의 발현에 대한 LA의 영향을 관찰하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

가. 실험동물

체중 280~350 g의 건강하고 성숙한 Sprague-

Dawley계 흰쥐 수컷을 3군으로 나누어 사용하였다. 즉, 허혈-재순환 손상을 가하지 않고 비복근과 가자미근 피판만을 거상한 sham 수술군, 허혈-재순환 손상과 생리식염수를 주사한 대조군, 허혈 손상 유발 후 재순환 30분 전에 α -lipoic acid (ASTA Medica AG)를 투여한 LA 투여군으로 구분하였다. 그리고 대조군은 재순환 시간에 따라 허혈손상만 발생한 군, 재순환 10분, 30분, 1시간, 2시간 그리고 4시간의 군으로 구분하였다. Sham 수술군(n=4)은 근피판 거상 후 허혈-재순환 손상을 가하지 않고 4시간 30분 후에 근육을 채취한 후 동물을 희생시켰다. 대조군(n=36)은 근피판 거상 후 4시간의 허혈손상을 유발하였고, 재순환 30분 전에 생리식염수를 복강 내 주사하였고, 재순환 0분(n=4), 10분(n=4), 30분(n=8), 1시간(n=4), 2시간(n=8), 4시간(n=8)후에 동물을 희생하였다. LA 투여군(n=24)은 재순환 30분 전에 LA를 복강 내 투여하였다.

나. 허혈 손상 유발

허혈-재순환 손상은 실험동물을 chloral hydrate(100 mg/kg)(Merck, Germany)를 복강 내에 주사하여 마취하였으며 필요에 따라 소량을 추가 투여하였다. 마취된 실험동물을 앙와위로 실험대에 고정하고, 서혜부에서 후지부위까지 제모하였다. 10% potadine-iodine solution으로 수술부위를 소독한 후 발목부위에서 서혜부위까지 절개하고 메젠바움 가위를 이용하여 종건(calcaneal tendon) 부위에서 근위방향으로 혈관에 손상이 가지 않도록 대퇴동맥의 내측을 따라서 비복근 상방의 반양근(semimembranosus), 박근(gracilis), 내전근(adductor magnus & brevis)을 절단한 후 수술 현미경하에 슬와동맥을 슬와정맥으로 부터 분리하여 노출시켰다. 메젠바움 가위를 종건부위에서 비복근과 가자미근 하방으로 삽입한 후 박리하여 비복근과 가자미근 근피판을 거상 하였다. 수술 현미경 하에 분리한 슬와동맥에 미세겸자(microclamp)를 이용하여 동맥을 폐쇄시켰다. 허혈-재순환 손상을 유발한 후 예정된 시간 순서에 따라서 동물을 희생하였다.

모든 실험과정 동안 실험동물의 체온은 직장내 체온 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하기 위하여 가열등과 체온 조

절기 그리고 전기담요(Fine Science Tools, Vancouver, Canada)를 사용하였다.

다. α -lipoic acid의 투여

LA 처치군 (n=24)은 재순환 손상 유발 30분 전에 LA를 복강 내 투여하였으며, 재순환 30분 (n=16), 2시간(n=4), 4시간(n=4) 후에 동물을 희생하였으며, 30분 재순환 실험군은 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg의 LA를 투여하였고, 2시간, 4시간 재순환 실험군은 50 mg/kg의 LA를 투여하였다.

라. Western blot analysis

각 실험동물로 부터 가지미근과 비복근을 분리하여 액화질소로 냉동시킨 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. 근육에서 단백을 분리하기 위하여 각각 근육을 액화질소와 분쇄기를 이용하여 분말로 만들었다. 근육분말을 1:5 weight/volume으로 조직분해완충용액(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 150 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% beta-mercaptoethanol, 0.5 mM DTT)에 희석하여 얼음에 1시간 이상 방치하였다. 4°C 에서 15분간 $12,000\times\text{g}$ 으로 원심분리하여 상층액의 단백을 채취하였다. 이후 Bradford 법을 이용하여 spectrophotometer (Beckman Co., USA)에서 단백 농도를 정량하였다.

단백의 전기영동은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 단백에 sample buffer(0.125 M Tris pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, bromophenol blue, 2-mercaptoethanol)를 섞어 100°C 에서 진탕 후 조직완충액에 섞인 단백(80 μg)을 12%와 15%의 gradient gel에 전기영동하였다. 전기영동은 mini gel 전기영동장치(SE 600 Hoefer Sci. Ins)를 이용하였고 90 V의 전압을 가하여 2시간 동안 진행하였다. 전기영동 후 gel을 Coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 동안 염색시키고, 탈염색액(10% acetic acid & 10% methanol)으로 탈색시켜 gel 상에서 단백띠를 확인하였다.

단백이동장치(Hoefer Semiphor, Phamacia

Bio.)를 이용하여 120 mA에서 2시간동안 gel의 단백을 0.45 μm 의 polyvinylidene difluoride (PVDF)막 (Millipore Co., USA)으로 옮겼다. 이 PVDF막을 일차항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 Tris buffer saline (TBS)(pH 7.6)에 3% bovine serum albumin을 녹인 차단 완충액(blocking buffer)에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 일차항체인 pERK1/2(1:500)(Cell Signaling Technology, USA)을 4°C 에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 0.05% Tween-20-TBS (TBST)로 3회 세척하였다. 이 후 이차항체인 goat rabbit IgG conjugated AP (Santa Cruz, USA)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 2회 세척 후 alkaline phosphates 용액(0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgCl_2)에 세척하고 여기에 NBT와 BCIP를 넣어 발색시켰다.

또한 동일 조건에서 pERK1/2의 대조실험으로 비활성형인 ERK1/2 단백발현을 관찰하였다.

마. Densitometry

Western blot 법에 의하여 관찰된 활성형 단백(pERK1/2)의 발현정도를 분석하기 위하여 scanner(HP4P)를 이용하여 PVDF 막에 발색된 단백질의 양상을 디지털 영상화하여 개인용 컴퓨터에 저장하였다. 화상분석프로그램(UN-SCAN-IT gel, USA)을 이용하여 각 발현 단백질의 면적과 밀도를 측정하고 면적과 밀도를 곱하여 각 단백질의 용적(volume)값을 산출하였다. 각각 활성형 단백질의 발현은 ERK1/2의 값과 비교 환산하여 최종 발현량으로 정의하였다. 그리고 각 실험 조건하에서 이들 활성형의 발현량을 sham수술군의 활성형의 발현량을 기준으로 상대적 발현비를 산출하였다.

바. 통계분석

실험결과는 평균(mean) \pm 표준편차(S.D.)로 나타내었으며 실험군 간의 통계 처리는 Kruskal-Wallis test를 이용하였다. p값이 0.05 미만인 경우에만 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결 과

가. 비복근에서 허혈손상 후 재순환 시간의 경과에 따른 활성화단백(pERK1/2)의 발현 및 그에 대한 α -lipoic acid의 영향

pERK1/2 단백질에 대한 Western blot 검사 상 분자량이 44 kDa에서 pERK1 단백질이, 42 kDa에서 pERK2 단백질로 각각 분리되었으며 허혈-재순환을 가하지 않고 근육만 거상 한 시행한 sham 수술군의 비복근에도 발현되었다. 한편 4시간의 허혈손상 후 시간의 경과에 따른 pERK1/2 단백질의 발현 양상은 허혈 손상 직후 pERK1과 pERK2 단백질 발현량은 각각 sham 수술군의 1.7 ± 0.2 , 1.7 ± 0.1 배로 증가하기 시작하여 재순환 10분 후 각각 sham 수술군의 3.2 ± 0.25 ($p < 0.01$), 1.7 ± 0.14 배로 유의하게 증가하였으며, 그 후 감소하였다가 다시 4시간째 2.5 ± 0.2 ($p < 0.01$), 2 ± 0.14 배($p < 0.05$)로 증가하는 이중 발현을 나타냈다(Fig. 1).

LA의 비복근에서 pERK1/2의 발현에 대한 효과를 확인하기 위하여 재순환 손상 유발 30분 전에

LA를 복강내 투여하였으며, 재순환 30분 실험군에는 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg의 LA를 투여하였고, 재순환 2시간과 4시간 실험군에는 각각 50 mg/kg의 LA를 투여하였다. LA를 투여 후 30분 동안의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg 투여군에서 비투여군인 대조군에 비해 pERK1이 각각 5.5 ± 0.38 , 4 ± 0.35 , 5 ± 0.4 , 3.5 ± 0.45 배로 모두 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), pERK2 역시 각각 4 ± 0.35 , 3.2 ± 0.28 , 3.5 ± 0.25 , 3.3 ± 0.28 배로 모든 투여군에서 유의하게 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 2).

50 mg/kg의 LA를 투여 후 2시간의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 대조군에 비해 pERK1, pERK2가 각각 4 ± 0.35 , 3 ± 0.3 배로 유의하게 증가하였고($p < 0.01$), 4시간의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 각각 1.3 ± 0.13 , 1.2 ± 0.12 배로 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

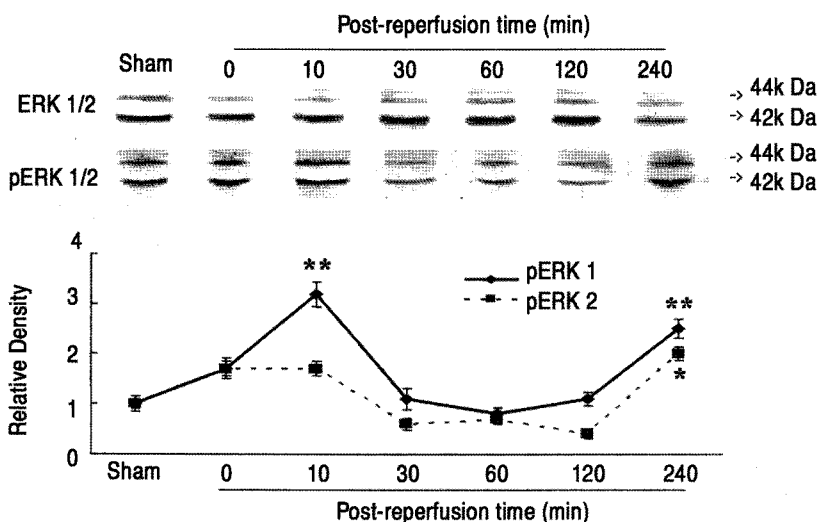


Fig. 1. Temporal changes in the expression of pERK1 and pERK2 proteins in the gastrocnemius (GC) muscle after ischemia for 240 minutes followed by reperfusion for 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min and 240 min, respectively. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the GC. Lower line graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of sham-operated rats is expressed as 1. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between sham and control group(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

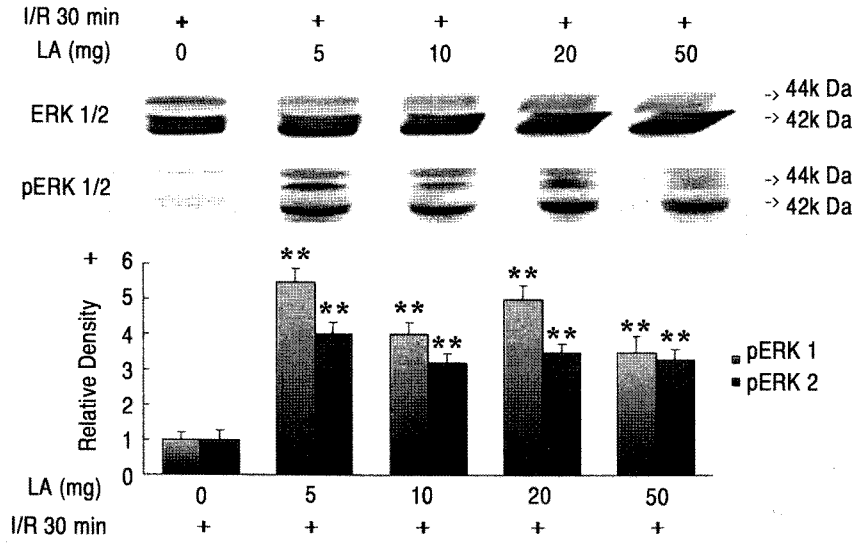


Fig. 2. The effect of α -lipoic acid on expression of pERK1/2 protein in the GC following ischemia for 4 hours followed by reperfusion for 30 minutes. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the GC. Lower bar graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of I/R 30 min injured rats without LA is expressed as 1. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between control and LA treated group (**P<0.01).

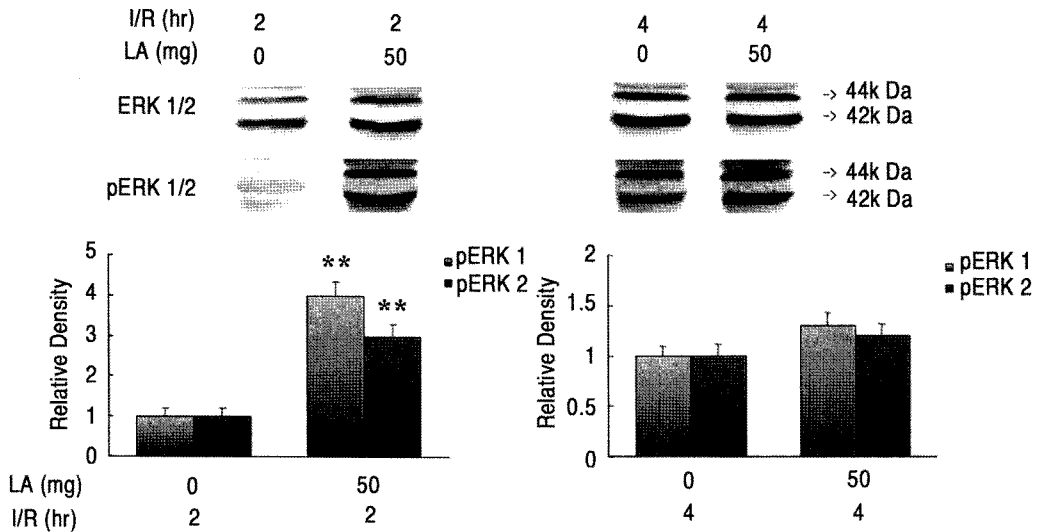


Fig. 3. The effect of α -lipoic acid on expression of pERK1/2 protein in the GC following ischemia for 4 hours followed by reperfusion for 2 and 4 hours. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the GC. Lower bar graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of I/R 2 and 4 hours injured rats without LA is expressed as 1. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between control and LA treated group (**P<0.01).

나. 가자미근에서 허혈손상 후 재순환 시간의 경과에 따른 활성화 단백(pERK1/2)의 발현 및 그에 대한 α -lipoic acid의 영향

허혈-재순환 손상에 의한 pERK1/2 단백 발현이 후지근육의 종류에 따라 차이가 있는지 알아보기 위하여 지근인 가자미근에서 허혈손상 4시간-재순환 0분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간 후 sham 수술군과 비교하여 pERK1과 pERK2 단백발현을 비교 관찰하였다. 비복근과 유사하게 재순환 10분에 pERK1과 pERK2가 각각 1.2 ± 0.25 , 1.6 ± 0.14 배, 4시간에 1.3 ± 0.2 , 2.1 ± 0.14 배로 증가 ($p < 0.05$)하였으나 비복근에서 보다는 발현이 미약하였다(Fig. 4). LA의 가자미근에서 pERK1/2의 발현에 대한 효과를 확인하기 위하여 재순환 손상 유발 30분 전에 LA를 복강내 투여하였으며, 재순환 30분 실험군에는 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20

mg/kg, 50 mg/kg의 LA를 투약하였으며, 재순환 2시간과 4시간 실험군에는 각각 50 mg/kg의 LA를 투여하였다. LA를 투약 후 30분 동안의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg 투여군에서 비투여군인 대조군에 비해 pERK1이 각각 2 ± 0.21 ($p < 0.05$), 3.5 ± 0.35 , 4 ± 0.4 , 2.8 ± 0.25 배로 증가하였으며 pERK2 역시 각각 3 ± 0.22 , 3.2 ± 0.25 , 3.5 ± 0.38 , 4 ± 0.3 배로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 5). 50 mg/kg의 LA를 투약 후 2시간의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 대조군에 비해 pERK1, pERK2가 각각 3.8 ± 0.25 ($p < 0.01$), 2.5 ± 0.2 ($p < 0.05$) 배로 유의하게 증가하였으나, 4시간의 재순환 손상을 유발한 실험군에서는 각각 0.95 ± 0.06 , 0.9 ± 0.04 배로 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

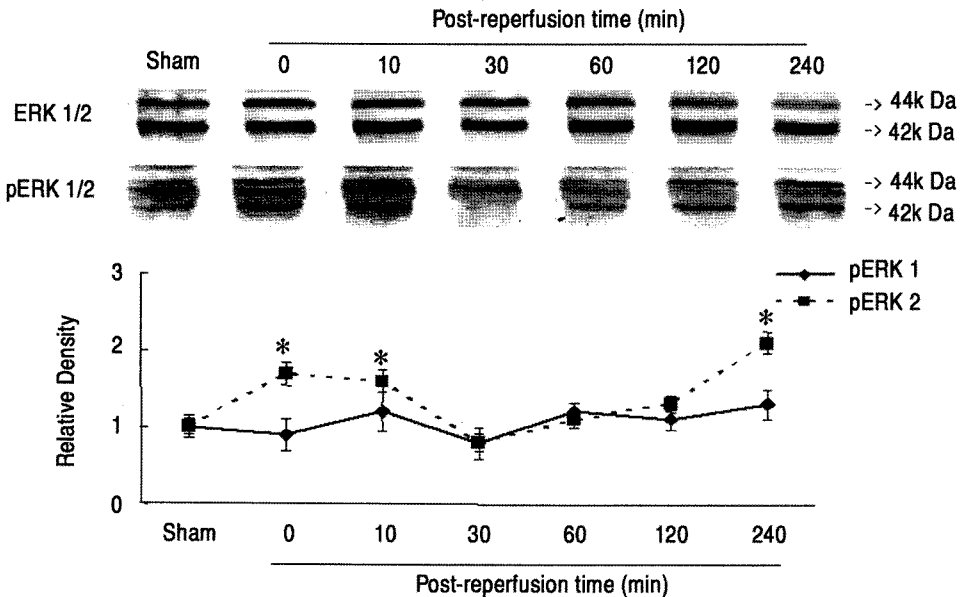


Fig. 4. Temporal changes in the expression of pERK1 and pERK2 proteins in the soleus muscle (SOL) after ischemia followed by reperfusion for 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min and 240 min, respectively. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the SOL. Lower line graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of sham-operated rats is expressed as 1. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between sham and control group(* $P < 0.05$).

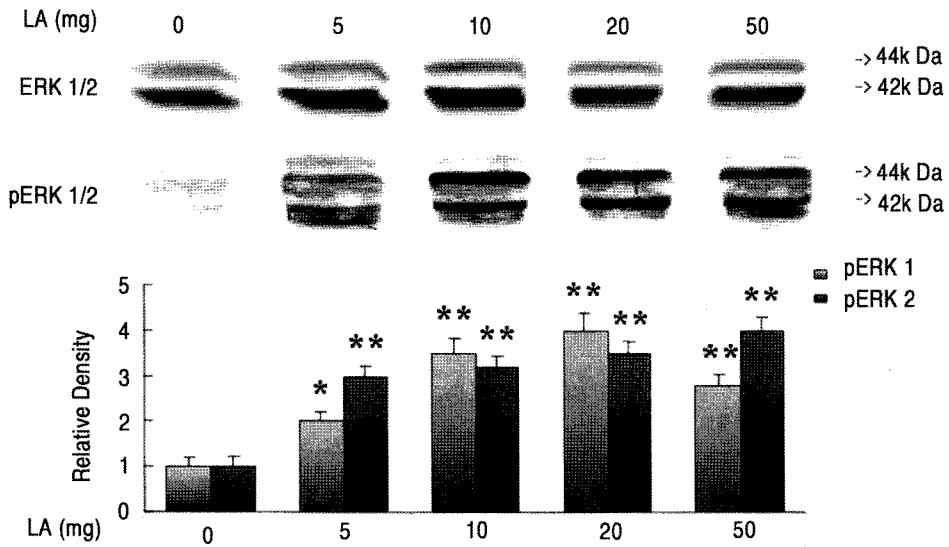


Fig. 5. The effect of α -lipoic acid on expression of pERK1/2 protein in the SOL following ischemia for 4 hours followed by reperfusion for 30 minutes. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the SOL. Lower bar graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of I/R 30 min injured rats without LA is expressed as 1. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between control and LA treated group(*P<0.05, **P<0.01).

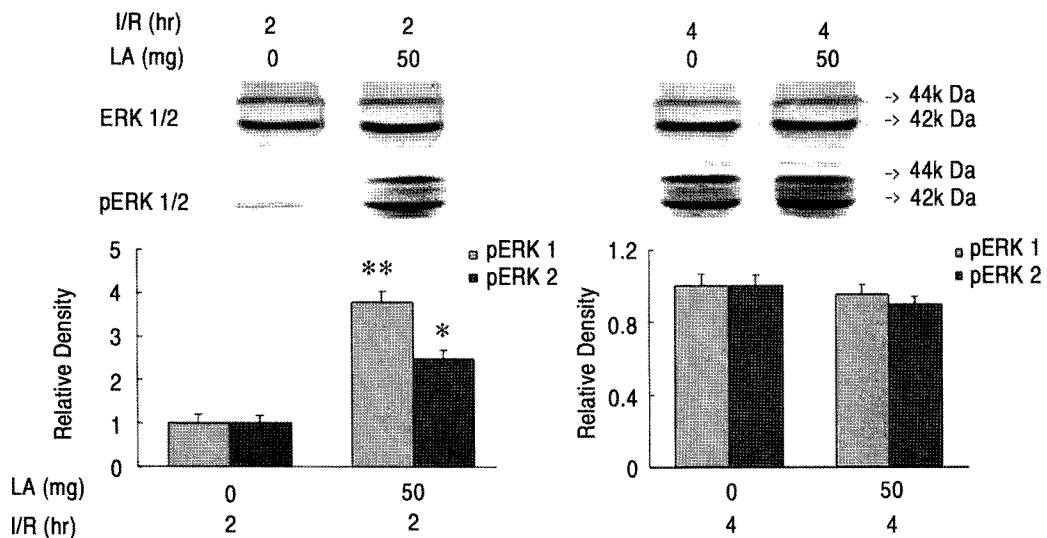


Fig. 6. The effect of α -lipoic acid on expression of pERK1/2 protein in the SOL following ischemia for 4 hours followed by reperfusion for 2 and 4 hours. Upper photographs, results of Western blot for ERK1(44kDa), ERK2(42kDa), pERK1, and pERK2 proteins from the whole cell lysate of the SOL. Lower bar graphs show relative levels of pERK1/2 proteins expression. The mean value of pERK1/2 of I/R 2 and 4 hours injured rats without LA is expressed as 1, respectively. The integrated optical density of pERK1/2 was normalized with that of ERK1/2. Data are mean \pm S.D. of 4 independent experiments. Significant difference between control and LA treated group(*P<0.05, ** (P<0.01).

Ⅳ. 고 찰

허혈-재순환 손상의 병리기전에는 백혈구의 혈관 내막으로의 부착과 활성 산소의 생성이 관련된 것으로 보인다.¹ 골격근에서 활성산소의 분자수준의 근원은 아직 명확히 규명되어 있지 않으나, 관련되는 것은 미토콘드리아 전자전달계, 세포막과 세포액(cytosol)에 존재하는 oxidoreductase, xanthine oxidase, phospholipase A₂의 활성화에 의해 활성산소가 생성되는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹⁰

골격근은 다양한 종류의 스트레스를 잘 견디는 독특한 능력을 갖고 있다.¹¹ 이런 능력으로 인해 골격근은 허혈-재순환 손상의 대상으로 뇌나 심장 만큼 많은 관심을 끌지 못하고 있다. 그러나 골격근도 충분한 시간의 허혈-재순환 손상 후에 미세순환의 점진적인 손상과 근육의 괴사로 이어질 수 있으며 이는 사지 재접합과, 구획증후군, 혈전-색전증, 유리피판술 같은 임상상황에서 매우 중요하다.¹²

하지의 허혈-재순환 손상에 대한 실험모델로 흰쥐에서 고무밴드로 후지 상부를 압박하여 후지 혈류를 차단함으로써 허혈 손상을 유도한 다음 다시 고무밴드를 제거하여 재순환을 유도하여 재순환 손상을 일으키는 tourniquet 허혈-재순환 손상 모델이 널리 사용되고 있다. 또한 대퇴동맥이나 총장골동맥(common iliac artery)을 폐쇄한 후 일정한 시간이 지난 다음, 혈관폐쇄를 중단하고 재순환을 유도하는 혈관폐쇄법이 이용되고 있다. 그러나 전자는 근육에 직접적인 압박이 가해짐으로 인해 허혈-재순환 손상 이외에 압력에 의한 근육세포의 손상이 반영될 수 있으며, 후자는 근위 혈관을 폐쇄시킴으로 인해 재순환 손상을 유발 시킬때 전신적인 염증반응을 유발할 가능성이 많다고 사료된다. 따라서 선택적으로 골격근에 대한 허혈손상을 유발하기 위해 혈관경에 거저한 피판 실험모델의 필요성이 제기된다. 피판 모델로 박근(gracilis) 피판이나 고환 거근(cremaster) 피판 등이 이용되고 있다.^{13,14}

세포는 다양한 외부자극에 반응하여 성장, 사멸, 세포형태의 진화 등을 하게 된다. 이러한 세포 반응은 세포내 신호전달체계의 활성화에 의해 이루어지며 특히 protein kinase의 활성화가 중요한 역할을 수행한다. Extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2)는 세포내 신호전달체계인

mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 집합체 중의 하나이다. ERK1/2 신호전달체계는 기계적 신장, G단백결합 수용체 자극제, 허혈, 염증반응 등 다양한 자극에 의하여 활성화 된다. 이러한 자극들은 GTP-결합단백인 Ras(21kDa)를 인산화시켜 활성형인 pRas를 생성시키고 다시 pRas는 Raf와 함께 MAPK/ERK kinase (MEK)를 인산화시켜 pMEK1/2 단백을 생성한다. 활성형인 pMEK1/2 단백질에 의하여 ERK1/2가 인산화 형태인 pERK1/2 형태로 전환되며 pERK1/2 단백질은 다양한 세포기능들을 조절한다². 예를 들어 pERK1/2 단백질은 세포질 내에 phospholipase A₂ 효소활성을 증가시켜 arachidonic acid의 유리 및 lysophospholipids의 생성을 증가시킨다. 또한 활성형인 pERK1/2 단백질은 세포핵 안으로 전위되어 Elk1 단백을 인산화 시켜 c-fos와 erg-1과 같은 immediate early gene의 전사를 조절한다.¹⁵

이 연구에서 pERK1/2 단백질은 4시간의 허혈 자극에 의해 증가하기 시작하여 재순환 10분 후에 가장 많은 증가를 보였고, 재순환 4시간에 2차 증가가 있었고, LA 투여에 의해 재순환시 pERK1/2 단백질의 발현은 유의하게 증가하였다. 골격근에서 허혈-재순환 손상에 관련된 pERK1/2 단백질발현에 대한 연구 결과에 대하여 많은 보고가 이루어지지 않은 실정이다. 그러나 골격근을 제외한 다른 장기 및 세포에서 pERK1/2 발현과 산화성 스트레스에 대한 연구에 따르면 Aikawa 등은 산화성 스트레스가 ERK1/2를 활성화 시키며 ERK1/2 활성화는 산화성 스트레스에 의한 세포 고사(apoptotic cell death)로 부터 심근세포를 보호하는데 중요하다고 제안하였다.¹⁶ 또한 Arany 등은 신장세포에서 ERK1/2의 활성화가 H₂O₂에 의해 유발된 세포독성을 감소시킨다고 보고하였다.¹⁷ 그러나 한편에서는 재순환 손상에서 ERK1/2 활성화가 척수에서 신경 손상을 유발하며, 항산화제인 N-acetyl cysteine이 arsenite에 의해 유발된 c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2와 ERK1/2의 활성을 억제한다는 보고도 있다.^{18,19} 따라서 골격근에서 pERK1/2 단백질 발현의 의의는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

비복근에서 4시간의 허혈손상 후 재순환 시간의 경과에 따른 pERK1/2 단백질 발현은 허혈 직후부터 증가하기 시작하여 재순환 10분 후 각각 sham 수술군의 3배로 유의하게 증가하였으며 그 후 감소하였다가 다시 4시간째 2.5배로 증가하는 이중 발현을 나타냈다. 비복근에서 LA 투여 시 재순환 손상 후 pERK1/2 발현이 유의하게 증가하였으며, 재순환 30분에는 대조군에 비해 5배 증가하였고, 재순환 2시간에는 3배 증가하였으나 재순환 4시간에는 LA 투여에 의한 유의한 증가는 없었다.

가자미근에서 4시간의 허혈손상 후 재순환 시간의 경과에 따른 pERK1/2 단백질 발현은 비복근에서처럼 재순환 10분과 4시간에 증가하였으나, sham 수술군과 비교하여 1.6배, 2배 증가하여 비복근보다는 미약한 반응을 나타냈다. 가자미근에서 LA 투여 시 비복근과 유사하게 pERK1/2 단백질 발현이 증가하였으며, 재순환 30분에는 대조군에 비해 4배 증가하였고, 재순환 2시간에는 3.8배 증가하였으나 재순환 4시간에는 대조군과 비슷한 발현이 되었다.

이상의 연구 결과들을 종합할 때 골격근에서 허혈-재순환 손상시 LA는 ERK1/2 신호 전달체계를 더욱 활성화시키며 이에 대한 의의는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Carden DL, Granger DN: *Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol* 190: 255, 2000.
- 2) Seger R, Krebs EG: *The MAPK signaling cascade FASEB J* 9:726, 1995.
- 3) Reed LJ, De Busk BG, Gunsalus IC, Schnakenberg GHF: *Crystalline α -lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. Science* 114:93, 1951.
- 4) Sachse G, Willms B: *Efficacy of thioctic acid in the therapy of peripheral diabetic neuropathy. In: Gries FA, Freund HJ, Rabe F, Berger H, eds. Aspects of autonomic neuropathy in diabetes. Horm Metab Res Suppl* 9:105, 1980.
- 5) Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V: *alpha-*

Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. Brain Res 717:184, 1996.

- 6) Packer L, Tritschler HJ, Wessel K: *Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. Free Radic Biol Med* 22:359, 1997.
- 7) Schonheit K, Gille L, Nohl H: *Effect of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid on ischemia/reperfusion injury of the heart and heart mitochondria. Biochim Biophys Acta* 1271:335, 1995.
- 8) Nohl H, Jordan W: *The mitochondrial site of superoxide formation. Biochem Biophys Res Commun* 138:533, 1986.
- 9) Sjodin B, Westing YH, Apple FS: *Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med* 10:236, 1990.
- 10) Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G: *PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Appl Physiol* 89:72, 2000.
- 11) Milnor WR: *Regional circulations. In: Mountcastle VB, Ed. Medical physiology (14th ed). St. Louis, MO: C.V. Mosby. 1980, p1102.*
- 12) Terry PO, Thomas FS, Howard PW, Linda LS, William AZ: *Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. Plast Reconstr Surg* 107:785, 2001.
- 13) Zamboni WA, Wong HP, Stephenson LL: *Effect of hyperbaric oxygen on neutrophil concentration and pulmonary sequestration in reperfusion injury. Arch Surg* 131:756, 1996.
- 14) Siemionow M: *A new experimental model for direct in vivo observation of microcirculation in microsurgery. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 54:1, 1989.
- 15) Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE: *ERK phosphorylation potentiate Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. EMBO J* 14:951, 1995.
- 16) Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y: *Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. J Clin Invest* 100:1813, 1997.
- 17) Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Tanaka S, Safirstein RL: *Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates H₂O₂ cytotoxicity in mouse renal*

- proximal tubule cells. Kidney Int 65:1231, 2004.*
- 18) Shackelford DA, Yeh RY: *Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) during reperfusion of ischemic spinal cord. Brain Res Mol Brain Res 115:173, 2003.*
- 19) Ansurudeen I, Naresh K, Chinmoy SD: *Differential activation of ERK and JNK by arsenite in mouse muscle cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 132:375, 2002.*