

백서 간의 재관류 손상에서 단기간 허혈전처치의 효과 : Interleukin-1 α 와 Nuclear Factor- κ B 발현

김윤섭 · 이수경 · 김선주 · 곽은경
박지영 · 박태인 · 배한익 · 손윤경
서인수

경북대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2002년 6월 25일
게재승인 : 2002년 8월 2일

책임저자 : 서인수
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50
경북대학교병원 해부병리과
전화: 053-420-5250
Fax: 053-426-1525
E-mail: issuh@knu.ac.kr

재관류 손상은 장기이식에서 기능부전의 중요한 원인이 되고 성공적인 이식 수술의 중요한 결정요소이다. 재관류 손상의 기전은 확실히 밝혀져 있지 않으나 자유 유리기가 중요한 인자로 작용할 것으로 보고 있다.^{1,2} 허혈에 의한 세포손상에는 괴사와 세포자멸사가 함께 관여하는 것으로 알려져 있는데 최근에는 세포자멸사에 대한 중요성이 더욱 강조되고 있다.³⁻⁶ 세포자멸사는 여러 생리적 또는 병적 상태에서 일어나는데, 형태학적 특징으로는 염색질의 응집과 세포자멸사체(apoptotic body) 형성을 관찰할 수 있고 이를 실질세포 또는 대식세포 등 이웃 세포들이 탐식한다. 생화학적으로는 시스테인 단백질분해효소의 일종인 caspase가 중요한 역할을 하는데, 이 단백질이 활성화되면 핵의 골격과 세포골격을 이루는 단백을 분해시키고 핵속핵산분해효소

The Effect of Ischemic Preconditioning in Rat Liver : The Expression of Interleukin-1 α and Nuclear Factor- κ B

Yoon Seup Kum, Soo Kyoung Lee, Sun Zoo Kim, Eun Kyoung Kwak,
Ji Young Park, Tae In Park, Han Ik Bae, Yoon Kyung Sohn, and In Soo Suh

Department of Pathology, Kyungpook University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : A short period of ischemia and reperfusion, called ischemic preconditioning, protects various tissues against subsequent sustained ischemic insult. Apoptosis of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells are a critical mechanisms of injury in the ischemic liver. Because nuclear factor- κ B (NF- κ B) has a significant role in the cell survival, we hypothesized that ischemic preconditioning protects by inhibition of apoptosis through the expression of NF- κ B, induced by interleukin-1 α (IL-1 α), which is known for enhancement of its transcription and activation. **Methods** : We induced ischemia and reperfusion on rat liver, and performed *in situ* terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling assay and polymerase chain reaction for IL-1 α mRNA and NF- κ B mRNA. **Results** : Apoptosis of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells, assessed by *in situ* TUNEL assay, was significantly reduced with preconditioning. The expression of IL-1 α mRNA and NF- κ B mRNA are seen on discrete monoclonal bands around 344 and 356 base pairs, in comparison with normal rat liver, but, there was no significant difference between the ischemia-reperfusion group and the preconditioning group. **Conclusions** : We suggest that ischemic preconditioning confers dramatic protection against prolonged ischemia via inhibition of apoptosis through the expression of IL-1 α inducing NF- κ B and its activation. However, we need further study in the activity of NF- κ B, such as nucleotide shift assay, because the activity of NF- κ B is regulated by binding of the inhibitory protein, I κ B.

Key Words : Reperfusion Injury-Ischemia-NF-kappa B-Interleukin-1

를 활성화시켜서 DNA를 절단시키는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹⁰ 이러한 허혈에 의한 세포 손해를 줄이는 노력이 많이 행하여졌는데, 1986년 Murray 등¹¹은 짧은 기간 허혈과 재관류를 시켰을 때 연속적인 허혈에 있어서 심근세포가 덜 손상되는 사실을 발견하였다. 이러한 현상은 허혈전처치라고 하며 골격근과 뇌조직 등 여러 장기에서 연구되었다.^{12,13} 세포에 허혈과 염증 등 여러 가지 자극이 있을 때 중앙괴사인자가 유도되어 nuclear factor (NF)- κ B/I κ B 전사인자 조절계를 통해 세포생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나 재관류 손상을 받는 동안 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀져 있지 않다. 최근 연구에 의하면 NF- κ B는 단백질전사 인자 중 rel 군에 속하는 이형접합체로서 주로 B 림프구나 형질세포에서 발견되었다.^{14,15} 또한 NF- κ B는

종양괴사인자나 interleukin (IL)-1 α 와 같은 여러 가지 시토카인들에 의해 강력히 유도된다고 알려져 있다.¹⁶ 최근에 밝혀진 바에 의하면 IL-1 α 는 종양괴사인자와 유사하게 감염이나 손상 등 여러 가지 해로운 자극이 있을 때 나타나는 급성기 반응을 구성하는 중요한 인자이다.¹⁷ 현재까지 재관류 손상 시 IL-1 α 의 발현과 NF- κ B의 역할은 잘 알려지지 않고 있다.

저자들은 본 연구에서 먼저 단순 재관류 손상만을 주었을 때 발현되는 IL-1 α mRNA와 NF- κ B mRNA를 중합효소연쇄반응을 통해 살펴 보고, 허혈전처치시킨 군과 형태학적으로 세포자멸사 검사(terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling: TUNEL)를 통해 세포자멸사된 정도를 비교하여 IL-1 α 와 NF- κ B의 역할을 알아보려고 하였다.

재료와 방법

재료

체중 200-250 g의 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 백서 20마리를 실험군 (n=10)과 대조군(n=10)으로 분류하였다. 대조군은 30분간 허혈시킨 후 3시간 동안 재관류를 시켰고, 실험군은 허혈전처치로서 10분간 허혈과 15분간 재관류를 시킨 후 대조군과 같은 방법으로 실험하였다. 모든 실험군과 대조군은 간 문맥과 간 동맥을 혈관 클램프(bulldog clamp)로 차단해 허혈시켰다. 3시간 동안 재관류를 시킨 후 간 조직을 채취하였는데 이 시기에 세포자멸사가 가장 왕성하다고 알려져 있다.^{18,19}

광학현미경검사

채취된 간 조직을 절제한 후 10%중성 포르말린 용액에 고정 한 후 파라핀에 포매하고 4-5 μ m 두께로 박절한 후 HE 염색을 시행하였다.

TUNEL 염색

TUNEL assay는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사의 *In situ* cell death detection kit, POD를 사용하였다. 파라핀포매 조직을 크실렌으로 처리하여 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 70% 에탄올을 거쳐 탈수하고, 인산염 완충액으로 수세한 후 5 μ g/mL 농도의 단백분해효소 K를 상온에서 30초 동안 반응시켰다. 인산염 완충액으로 수세하고 TUNEL 반응 혼합액을 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 인산염 완충액으로 수세하였다. 수용성 봉입액으로 봉입하여 형광현미경하에서 양성세포의 수를 측정하였다.

중합효소연쇄반응에 의한 NF- κ B와 IL-1 α mRNA의 발현

RNA 추출

실험쥐로부터 간 조직을 적출한 다음 바로 액화질소에 넣어 RNA의 퇴화를 방지하였다. 액화질소에 얼린 간 조직을 잘게 갈아서 14 M의 구아니딘과 요소가 함유된 변성용액 1 mL에 5분간 두어 핵단백복합체가 완전히 변성될 수 있도록 하였다. 여기에 0.2 mL의 클로로포름을 더한 다음 15초간 흔들어 섞어 주었고, 얼음 위에 5분간 두었다. 원심분리한 다음 얻어진 상층액을 새 시험관으로 옮겨 0.2 mL의 isopropanol과 RNA가 흡착할 수 있는 수지를 30 μ L 넣어 흔들어 잘 섞어 주었다. 원심분리로 침전된 수지를 75% 에탄올로 세척하였으며 다시 원심분리하여 수지를 침전시켰다. 이와 같은 세척 과정을 두 번 반복한 다음 침전된 수지에 DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 처리된 물을 30 μ L 넣어 RNA를 녹였다. 얻어진 RNA는 분광측광기로 흡광도를 읽어 얻어진 양과 순도를 측정하였는데, 대부분의 표본이 A₂₆₀/A₂₈₀이 1.5 이상의 순도를 보여 주었다.

중합효소연쇄반응

간에서 추출한 total RNA 1 μ g으로부터 AMV 역전사효소를 이용해 cDNA를 합성하였으며, 이를 template로 중합효소연쇄반응을 수행하여 NF- κ B와 IL-1 α 의 발현 정도를 알아보았다. 사용한 primer는 바이오니아(주)에서 합성하였으며 primer의 염기서열은 다음과 같다.

Primer	Sequence
NF- κ B forward	5'-ACTCTCATGGACAACACTATGAGGTC
NF- κ B reverse	5'-CTAAATTTTGCCTTCAATAGGTCC
IL-1 α forward	5'-TCCTAGGAAACAGCAATGGTCG
IL-1 α reverse	5'-TTCATCCCATACACACGGACAAC

반응 혼합물은 10 \times PCR (polymerase chain reaction) buffer 2.5 μ L, 10 mM dNTP mixture 2 μ L, 25 mM MgCl₂ 1.5 μ L, 10 pmole primer 1 μ L, cDNA 1 μ L (100 ng), AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, U.S.A.) 1 unit 등으로 구성했으며, Perkin-Elmer의 GeneAmp PCR system 9600을 이용하여 PCR을 수행하였다. 먼저 NF- κ B와 IL-1 α 의 PCR에 앞서 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)에 대한 PCR을 수행하여 동일한 양의 cDNA가 template로 사용될 수 있도록 하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 95°C에서 10분간 초기 변성과 AmpliTaq Gold의 pre-activation을 시킨 후, 94°C에서 30초간 변성, 55°C에서 30초간 소환, 72°C에서 30초간 연장 반응하여 30주기를 실행하였고, 마지막 주기 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였다. 반응 산물 중 5 μ L를 취하여 1.8% 아가로즈겔에서 전기영동하였으며 EtBr (ethidium bromide)로 염색해 발현 정도를 확인하였다.

결 과

조직학적 소견

대조군에서는 소엽중심대에 울혈이 보이고 중등도의 유동 확장을 관찰할 수 있었다. 문맥 주위로 경한 염증 세포 침윤이 있

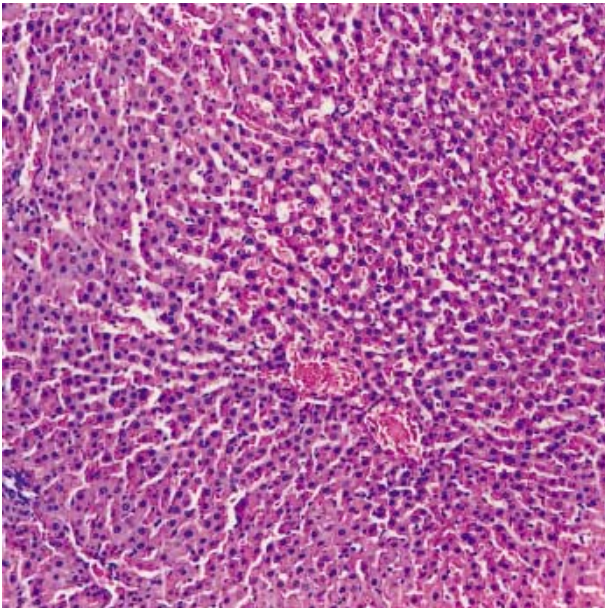


Fig. 1. Three hours reperfusion after 30 minutes ischemia in rat liver shows moderate sinusoidal dilatation and congestion.

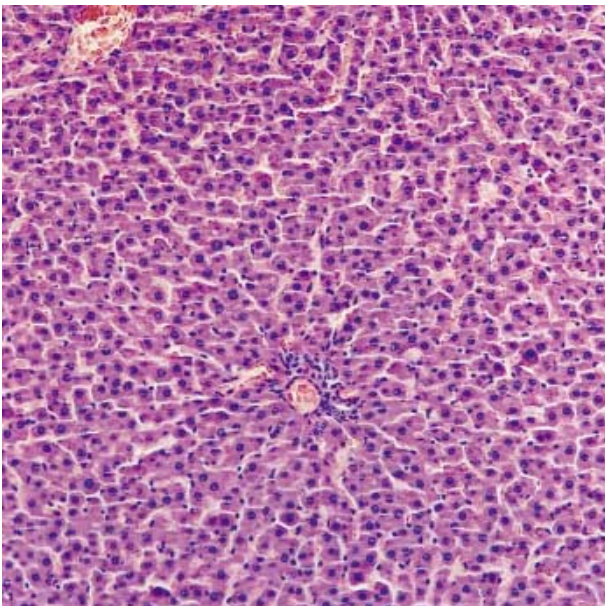


Fig. 2. Ischemic preconditioning in rat liver shows slight sinusoidal dilatation and congestion.

었으나 괴사는 관찰할 수 없었다. 실험군에서도 소엽중심대에 울혈과 유동 확장을 관찰할 수 있었으나 정도가 경미하였다. 문맥 주위로 경한 염증 세포 침윤이 있었으나 괴사는 관찰할 수 없었다(Fig. 1, 2).

TUNEL 소견

유동 내피세포나 간세포 등에서 TdT (terminal deoxyribonucleotidyl transferase) 양성 세포를 열 개의 고배율($\times 400$) 시야에서 관찰하여 평균과 표준편차를 구하였다. 대조군과 실험군 모두 TdT 양성 세포는 주로 동양혈관내에서 관찰되었고 간세포에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 세포자멸사의 수는 대조군에서는 2.61 ± 0.42 개이며 실험군은 1.3 ± 0.61 였다($p < 0.05$).

중합효소연쇄반응에 의한 NF- κ B와 IL-1 α mRNA의 발현

House keeping gene인 GAPDH 유전자를 중합효소연쇄반응방법으로 증폭하였을 때 516 bp 크기의 띠를 관찰하여 정상적으로 mRNA가 분리되었음을 확인하였다. 그리고 모형(template)으로 이용되는 mRNA의 양을 조절하여 같은 양의 중합효소연쇄반응산물이 얻어지도록 하였다. 같은 양의 모형으로 중합효소연쇄반응을 실행한 결과, 정상 간 조직에서는 NF- κ B와 IL-1 α mRNA의 발현을 관찰할 수 없었고, 대조군과 실험군에서는 356 bp와 344 bp 크기의 NF- κ B와 IL-1 α mRNA 띠가 존재하였다(Fig. 4).

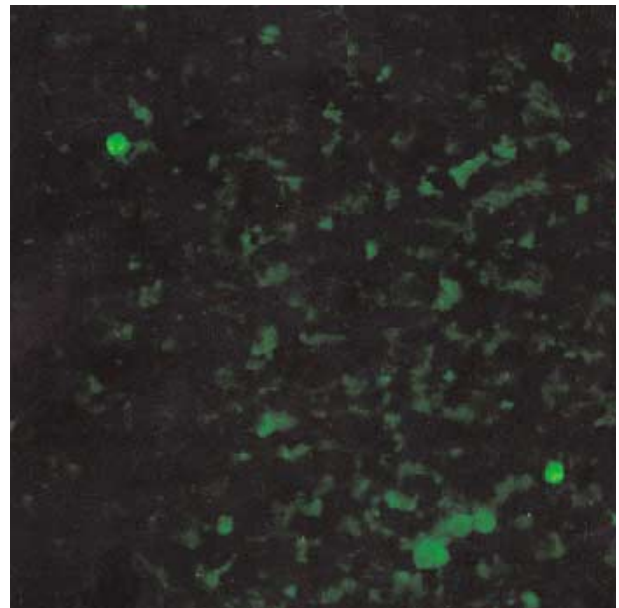


Fig. 3. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assay of ischemic preconditioning in rat liver shows mild bright greenish stained cells.

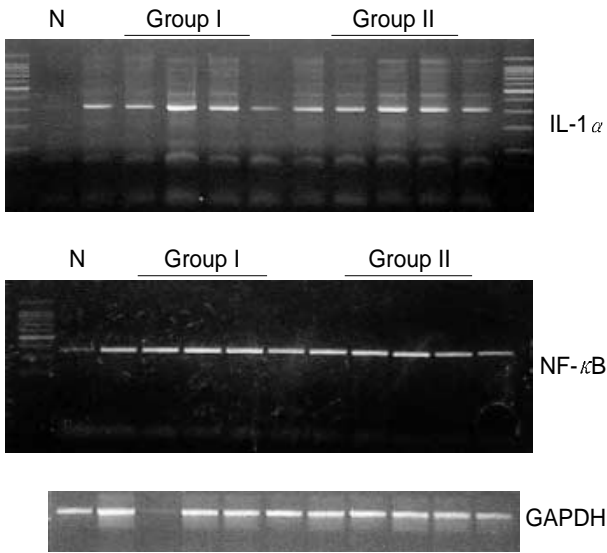


Fig. 4. Polymerase chain reaction (PCR) amplification using the interleukin (IL)-1 α and nuclear factor (NF)- κ B primers. Ethidium bromide-stained 2% agarose gel shows discrete monoclonal bands around 344 and 356 bp. N: normal rat liver. Group I: 3 hours reperfusion after 30 minutes ischemia in rat liver. Group II: Ischemic preconditioning in rat liver. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

고찰

여러 가지 원인에 의해 유발된 세포사는 크게 괴사와 세포자멸사로 구분할 수 있다. 최근 연구에 의하면 특히 허혈과 재관류 손상 시 세포자멸사가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.³⁻⁶ 세포자멸사는 오래 전부터 알고 있었던 세포사의 한 형태로, 최근에는 세포사의 독특하고 중요한 한 유형으로 인정되고 있다. 이러한 세포자멸사는 여러 생리적 또는 병적 상태에서 일어나게 된다. 현재까지 밝혀진 여러 가지 세포자멸사의 기전을 살펴보면 Fas-Fas ligand 결합에 의한 것, 세포독성 T 림프구에 의한 것, DNA 손상에 의한 것과 종양괴사인자에 의한 것 등이 있고, 지금도 세포자멸사의 기전에 대한 연구가 진행되고 있다. 세포자멸사의 기전은 신호 단계, 조절과 통합 단계, 실행 단계와 처리 단계의 네 단계로 구분되는데, 최근 조절과 통합 관계에 대한 연구가 활발하다. 세포자멸사의 기전에 관여하는 인자의 하나인 caspase는 시스테인 단백질분해효소이며, 활성화되면 핵의 골격과 세포골격을 이루는 단백을 분해시키고 핵색소산분해효소를 활성화시켜 DNA를 절단해서 형태학적으로 독특한 염색질 응축이나 세포자멸사체 형성을 유발한다.²⁰ 이와는 반대로 세포에 허혈과 염증 등 여러 자극이 있을 때 종양괴사인자가 유도되어 NF- κ B/I κ B 전사인자 조절계를 통해 세포 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{14,15} NF- κ B는 단백질 전사 인자 중 rel 군에 속하는 이형접합체로서 주로 B 림프구나 형질세포에서 발견된다. NF- κ B는 세포질내에서 I κ B라는 억제 단백질과 결합하고

있으나 어떠한 자극에 의해 신호 단계를 거쳐 I κ B가 분해되면 활성화되어 세포핵 안으로 들어가 세포 생존에 필요한 유전자를 발현하는 것으로 알려져 있다. 이러한 NF- κ B는 IL-1 α 와 같은 시토카인들에 의해 강력히 유도된다.

본 실험에서는 백서 간에 허혈전처치를 하였을 때 나타나는 효과를 알아보기 위해 세포자멸사 정도를 살펴보고, 이에 관계되는 인자를 조사해 보았다. 간 조직의 광학현미경 소견에서 실험군과 대조군 모두 심한 차이가 없는 급성 허혈 시 관찰되는 소엽중심대에 울혈이 보이고 동양구조의 확장을 관찰할 수 있었다. 또, 문맥 주위로 경한 염증 세포 침윤이 있었으나 괴사는 관찰할 수 없었다. 세포자멸사 검사를 통해 세포자멸사를 관찰하였을 때, 실험군과 대조군 모두 주로 동양혈관내 세포들이 양성 반응을 보였고, 간세포에서는 관찰되지 않았다. 이는 동양혈관내피세포가 허혈에 대해 간세포보다 더 민감하다고 보고한 여러 문헌과 일치된 소견이었다.^{18,19} 세포자멸사의 수는 실험군이 대조군보다 약간 감소하였다. 이는 허혈전처치가 재관류 손상에 있어 어느 정도 효과가 있음을 형태학적으로 나타낸 것으로 보이며, 여기에는 여러 가지 인자가 관여할 것으로 생각된다. Surinder 등²⁰은 허혈전처치가 시스테인 단백질분해효소의 한 종류인 caspase의 활성도를 낮추어 세포자멸사를 줄인다고 주장하였다. 허혈전처치뿐만 아니라 아데노신^{21,22}이나 독소루비신^{23,24} 등을 이용한 전처치도 caspase의 활성도를 낮추는 것으로 알려져 있다. 저자들은 caspase와는 반대로 세포 생존 신호의 일종인 NF- κ B의 발현을 보고자 했다. 이 단백질의 강력한 유도 물질로 알려진 IL-1 α 는 종양괴사인자와 유사하게 감염이나 손상 등 여러 가지 해로운 자극이 있을 때 나타나는 급성기 반응을 구성하는 중요한 인자로 알려져 있다. 간의 허혈손상을 주었을 때 NF- κ B와 IL-1 α mRNA의 발현 정도를 중합효소연쇄반응으로 살펴본 결과, 정상 간 조직과는 달리 356 bp와 344 bp 크기의 NF- κ B와 IL-1 α mRNA가 뚜렷한 띠로 존재하였다. 이는 세포상해가 있을 시, 세포는 세포사의 형태로 이행할 수 있으나, 이에 대항하는 여러 가지 인자를 분비하여 세포 생존 신호를 유도할 수 있다고 생각한다. 간에서는 쿠퍼 세포가 동양혈관 내벽에 위치하여 여러 가지 시토카인을 분비하는 것으로 보아 후자의 역할을 한다고 생각된다. 실험군과 대조군에 있어 NF- κ B와 IL-1 α mRNA의 발현 정도를 비교하여 보았을 때 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 NF- κ B가 세포질내에서 I κ B라고 불리는 저해 단백질과 결합하고 있기 때문에 그 활성도를 단순히 유도된 mRNA 양으로서 비교하는 것은 어렵다고 생각한다. 정확한 비교를 위해서는 NF- κ B가 활성을 띠게 되어 전사인자로서의 역할을 수행하는지를 살펴보아야 한다. 즉 NF- κ B가 표적유전자에 가서 결합하는지를 살펴보는 것이 필요하다. 만약 NF- κ B가 저해단백과 떨어져 표적유전자에 결합했다면 전기영동 등의 방법으로 이동된 띠를 관찰할 수 있을 것이다. 본 실험의 성적을 종합하면, 세포자멸사가 주로 동양혈관 내피세포에서 관찰되는 원인과 쿠퍼 세포의 역할에 대해서는 좀 더 연구해야

할 것으로 생각된다. 그리고, 허혈전처치를 시행하는 군이 단순 제관류만을 시행하는 군보다 형태학적으로 세포자멸사가 적게 일어났으며, 이는 허혈로 인해 여러 세포들에서 분비된 IL-1 α 가 강력히 NF- κ B를 유도하여 세포 생존에 기여하는 것으로 추측된다. IL-1 α 뿐만 아니라 NF- κ B가 세포 생존에 중요한 역할을 할 것으로 추정되며 이를 위해 이 방면에 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Kontos HA. Oxygen radicals in CNS damage. *Chem Biol Interact* 1989; 72: 229-55.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-23.
- Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996; 79: 949-53.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-7.
- Choi D. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 667-72.
- Yue X, Mehmet H, Penrice J. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23: 16-24.
- Kothakota S, Azuma T. Caspase 3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 5336-8.
- Rudel T, Bokoch G. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997; 276: 1571-4.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-81.
- Namura S, Zhu J, Fink K. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18: 3659-68.
- Murray CE, Jennigs RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
- Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 1546-57.
- Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 545-53.
- Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-32.
- Stancovski I, Baltimore D. NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299-302.
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-16.
- Lee EG. Failure to regulate TNF-induced NF- κ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; 289: 2350-4.
- Gao W, Bentley RC. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1652-60.
- Kohli V, Selzner M. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67: 1099-105.
- Surinder S, David K. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30: 1223-31.
- Parrat JR. Protection of the heart by ischemic preconditioning: Mechanism and possibilities for pharmacological exploitation. *Tips Reviews* 1994; 15: 19-25.
- Carmen P, Georgina H. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosin A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29: 126-32.
- Ito K, Ikeda S, Shibada T, Yano T. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in rat liver after ischemia. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 551-6.
- Koji I, Hisashi O, Katsuhiko S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 31: 416-9.