

2시간 허혈 후 재관류 시간 경과에 따라 나타나는 혈청 사이토카인의 발현에 미치는 허혈양상화의 효과

진정한¹, 김성재¹, 서윤경², 김신영³

¹한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

²한양대학교 간호학부, ³안산대학교 물리치료학과

(2016년 5월 14일 접수, 2016년 6월 22일 수정접수, 2016년 6월 23일 게재승인)

간추림 : 일시적인 허혈과 수술로 인한 허혈 후 재관류 시 대량의 활성산소가 발생하여 세포에 손상이 발생한다. 이러한 허혈-재관류 손상으로 인해 국소적 손상이 초래되고, 전신적 손상이 발생하기도 한다. 따라서 허혈-재관류 손상을 감소시키기 위한 필요성이 대두되었고 이와 관련하여 허혈 전에 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 허혈양상화에 대한 연구가 진행되었다. 허혈양상화는 허혈시 염증반응을 감소시킴으로 허혈 손상에 대해 조직을 보호한다고 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 세포조직이 허혈과 재관류 손상에 대해 내성의 기전을 갖게 하면서 조직을 보호한다고 알려진 허혈양상화를 기본으로 하였고, 허혈-재관류 손상에서 나타나는 염증반응에서 중요한 역할을 하는 물질이 사이토카인이기 때문에, 재관류 시간에 허혈양상화 방법론 고찰과 허혈양상화가 사이토카인 발현에 미치는 영향에 대한 상관관계를 분석하였다.

40~45 g 수컷 생쥐의 왼온엉덩동맥을 허혈처리 하였으며 2시간 허혈처리만 시행한 허혈군, 5분간의 짧은 허혈과 재관류를 3회 처리한 허혈양상화군, 허혈양상화 처리 후 2시간 허혈을 시행한 허혈양상화 및 허혈군으로 하는 실험군을 구성하였고 각 실험군에서의 처리 후 비교를 위한 재관류 시간은 30분, 1시간, 2시간, 4시간을 시행하였다. 연구 결과는 다음과 같다.

첫째, 허혈군이 허혈양상화군과 허혈양상화 및 허혈군과 비교했을 때 친염증성 사이토카인 IL-1 β 의 수치가 가장 높게 발현되었다($p < .001$). 둘째, 항염증성 사이토카인인 IL-4는 허혈군, 허혈양상화 및 허혈군과 비교했을 때 허혈양상화군에서 가장 높게 발현되었다($p < .001$). 셋째, 항염증성 사이토카인인 IL-10은 허혈군, 허혈양상화 및 허혈군과 비교했을 때 허혈양상화군에서 가장 높게 발현되었다($p < .001$).

위의 결과들을 종합했을 때 정도에 따라 차이는 있지만, 허혈양상화 처리는 허혈군과 허혈양상화군보다 허혈양상화 및 허혈군의 친염증성 사이토카인 IL-1 β 를 감소시켰고, 항염증성 사이토카인 IL-4와 IL-10은 허혈양상화군에서 허혈군과 허혈양상화 및 허혈군보다 증가하였다.

찾아보기 낱말 : 생쥐, 허혈양상화, 허혈-재관류 손상, IL-1 β , IL-4, IL-10

서론

장기를 절제하는 시술이나 이식술을 시행할 때 혈액손실을 줄이기 위한 허혈은 불가피하다[1]. 허혈 상태의 지속은 혈류와 산소의 결핍으로 세포 손상을 야기하기 때문에 이를 막기 위해서는 허혈되어 있던 장기에 다시 혈류가

저자(들)는 ‘의학논문 출판윤리 가이드라인’을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 김신영 (안산대학교 물리치료학과)
전자우편 : sykim@ansan.ac.kr

흐르도록 하는 재관류(reperfusion) 처치가 필요하다. 그러나 재관류 시기에도 조직 손상이 발생하는데 이를 허혈-재관류 손상이라 한다. 이러한 허혈 또는 허혈-재관류 손상은 전신성 염증반응 증후군이나 다발성 장기 부전증을 유도하여 환자를 사망에 이르게 할 수도 있다고 알려져 있다[2]. 허혈 손상 또는 허혈-재관류 손상을 감소시키기 위한 연구가 시행되어 왔으며, 허혈 전에 짧은 허혈과 재관류를 반복하는 허혈양상화(ischemic preconditioning, IP) 처치를 함으로 허혈-재관류 손상으로부터 조직을 보호하려는 연구가 상당히 진행되었다.

허혈양상화는 짧은 허혈과 재관류의 반복이 허혈시 일어나는 근육세포의 세포자멸사와 조직의 괴사를 감소시킨다는 Murry 등[3]의 연구결과가 보고되면서 처음 알려졌다. 또한 국소부위에서 시행한 허혈양상화가 허혈 및 재관류가 일어난 근원지에서 멀리 떨어져 있는 장기를 보호한다는 원거리 허혈양상화(remote IP) 효과에 대한 실험들도 진행되고 있다.

염증반응은 허혈-재관류 손상의 요인 중 하나로 알려져 있다[4]. 염증을 촉진시켜 질병을 악화시키는 친염증성 사이토카인과 염증을 감소시키는 역할을 하는 항염증성 사이토카인[5]이 임상치료에서 허혈-재관류 손상의 수준이나 회복 여부를 파악하는 여러 연구들이 시행되어지고 있지만, 효과적으로 활용되지 못하고 있다.

사이토카인은 면역반응, 감염, 외상, 염증 등에 대한 반응을 조절하고 세포와 세포 사이의 신호를 전달하는 물질이다[6,7]. 친염증성 사이토카인은 IL-1 (IL-1 α , β), IL-6, IL-8, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, interferon (IFN)- γ , CXCL1, CXCL2 등이 있으며 염증을 유발하고 상승시키는 데 중요한 역할을 하고 세포손상을 매개하며, 허혈과 재관류가 일어나는 동안 허혈조직과 허혈되지 않은 다른 장기들은 친염증성 사이토카인을 생성하고, 이들은 염증세포의 축적을 유도하여 장기에 염증과 손상을 유발시키기도 한다[8]. 항염증성 사이토카인은 IL-4와 IL-10은 친염증성 사이토카인의 발현과 생성을 억제하고[9,10], 염증반응과 생체에 적합하지 않은 면역반응을 제한하는 기능을 하고, 체액성 면역반응을 유도한다[11].

친염증성 사이토카인 IL-1 β 는 단핵구와 큰포식세포에 의해 1차적으로 생성되고[12], 혈관 내피에서 부착분자들의 발현을 촉진하고 호중구의 결합을 유도하여 손상을 유발한다[8]. 항염증성 사이토카인 IL-4는 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 하며, 림프구, 호중구, 비만세포에 의해서 발현된다[13]. IL-4는 조직 유착 및 염증반응에서도 중요한 역할을 하는데, 혈관 내피세포에서 작용하여 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)의 발현을 유도한다고

알려져 있다[14]. IL-10은 비만세포, 큰포식세포, 자연살해세포 등에 의해 생성되며, TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 친염증성 사이토카인을 억제하고[15], 큰포식세포에 의한 일산화질소 대사작용을 감소시킨다[16].

사지의 허혈양상화 처치는 토니켓과 같은 외부 장치를 이용하거나, 혈관을 직접 폐쇄하여 시행하기도 한다. Abu-Amara 등[17]은 생쥐의 경우 외부 압력에 의해 신경근육 연결이 쉽게 손상될 수 있기에, 절개하여 직접 혈관을 폐쇄하면 다른 구조물의 손상을 최소화할 수 있고 염증반응을 감소시킬 수 있다고 하였다. 이에 저자들은 생쥐의 원온영덩동맥에 직접 허혈 처치를 하였다. 허혈양상화는 허혈과 재관류를 각각 5분씩 3회 반복하였다. 2시간 허혈이 조직의 병리학적 변화와 허혈 손상이 적게 나타나고 비교적 회복이 용이하여[18] 허혈시간을 2시간으로 설정하였다.

저자들은 2시간 허혈 후 재관류 시간에 따른 사이토카인의 변화 양상을 확인하기 위해 재관류 30분, 1시간, 2시간, 4시간으로 실험군을 세분하였으며, 허혈 후 친염증성 사이토카인 IL-1 β 와 항염증성 사이토카인 IL-4, IL-10의 변화를 확인하였고, 허혈양상화가 이들의 변화에 미치는 영향을 확인하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 대상

실험동물은 (주)오리엔트 바이오(Orient Co, Seongnam, Korea)에서 8주령 ICR계 수컷 생쥐 구입한 후 한양대학교 실험동물실에서 4~5주간 물과 사료를 공급하여 사육하였고, 무게 40~45 g이 되었을 때, 대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군은 실험처치에 따라 허혈군, 허혈양상화군, 허혈양상화 및 허혈군으로 구분하였고, 각 실험군은 재관류 시간에 따라 30분, 1시간, 2시간, 4시간군으로 다시 세분화하였다. 대조군과 모든 실험군에 8마리의 실험동물을 배정하여 총 104마리의 실험동물을 사용하였다. 본 실험은 한양대학교 동물실험윤리회 승인을 받은 후 진행하였다(HY-IACUC-2014-0315).

2. 실험동물 처치

실험동물들은 졸레틸[®] (Virbac, France)과 럼폰[®] (Bayer, Korea), 생리식염수를 1:1:8 비율로 혼합한 용액을 배 안에 주사(0.1 mL/10 g)하여 마취시킨 후 실험을 하였다.

실험군은 개복 후 원온영덩동맥을 생쥐용 혈관집계를 사용하여 2시간 허혈을 시행하였고, 허혈양상화군은 원온영

덩동맥을 5분 허혈과 5분 재관류하는 과정을 3회 실시하였으며, 허혈양상화 및 허혈군은 허혈양상화 실시 후 2시간 허혈을 실시하였다. 모든 실험군의 왼은영덩동맥의 혈관집계를 제거하여 재관류 시켰으며 재관류 30분, 1시간, 2시간, 4시간 뒤에 심장에서 혈액을 채취한 후 경추탈골 하였다. 대조군은 개복 후 아무런 처치를 하지 않았으며, 곧바로 심장에서 혈액을 채취한 뒤 경추탈골 하였다. 채취한 혈액은 원심분리 후 얻은 혈청을 -70°C 에 보관하였다.

3. 혈액 준비 및 ELISA 분석방법

IL-1 β , IL-4, IL-10이 특이 반응하게 처리된 ELISA kit (Q-PlexTM Array, Quansisbio, USA)를 사용해 분석하였으며 antigen standard powder에 sample diluents 500 μL 를 첨가한 후 표준용액을 사용하여 희석하였다. Microtiter plate (96 wells)의 각 well에 혈청을 500 μL 씩 분주하여 실온에서 500 rpm의 속도로 교반기에서 1시간 반응시켰다. 이후 wash buffer로 3회 세척하고 각 well에 detection mix 용액을 50 μL 씩 분주 후 실온에서 500 rpm 속도로 교반시켰다. 3회 세척 후 streptavidin-HRP용액을 50 μL 씩 well당 분주하여 실온에서 500 rpm 속도로 15분간 교반기에서 반응시켰다. 6회 세척 후 substance A와 substance B용액을 각각 3 mL를 혼합하여 각 well당 50 μL 씩 분주한 뒤 15분 이내에 ChemiDoc XRS Plus System (Bio-Rad, USA)으로 plate image를 촬영하였다. 촬영 결과는 Q-PlexTM Software (Quansys bio, USA)로 분석하였다.

4. 통계 처리방법

통계처리는 SPSS/WIN 통계프로그램 21.0을 활용하였고, 실험군과 재관류 시간에 따른 사이토카인의 차이를 알아보기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA), 사후검증으로 Scheffe's 방법을 사용하였고 유의 수준 $p < .05$ 이하인 경우 유의성이 있다고 해석하였다. 각 실험군의 재관류 시점에 따른 사이토카인의 차이를 알아보기 위해 이원변량분석(two-way ANOVA), 사후검증으로 Scheffe's 방법을 사용하였고 유의 수준 $p < .05$ 이하인 경우 유의성이 있다고 해석하였다.

실험결과

1. IL-1 β

재관류 시간에 따른 IL-1 β 는 허혈군에서 가장 높게 관

Table 1. The expression of cytokines IL-1 β in reperfusion time point by the experimental groups. * $p < .01$ versus control at baseline, ** $p < .001$ versus control at baseline.

			N	M	SD	F(p)
IL-1 β	SC	—	8	167.00	25.026	
	IC	0.5H	8	241.63	21.186	0.005 (*)
		1H	8	278.38	12.070	0.000 (**)
		2H	8	326.13	51.324	0.000 (**)
		4H	7	273.14	35.793	0.001 (**)
	IP	0.5H	8	207.25	30.626	0.005 (*)
		1H	8	242.88	39.668	0.000 (**)
		2H	6	221.83	73.725	0.000 (**)
		4H	8	223.25	27.354	0.001 (**)
	IP-IC	0.5H	8	192.88	27.300	0.005 (*)
		1H	6	207.33	34.110	0.000 (**)
		2H	8	171.88	39.223	0.000 (**)
		4H	8	192.38	36.820	0.001 (**)

SC: Sham control

IC: Ischemia

IP: Ischemia preconditioning

IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia

0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

찰되었고($p < .001$), 허혈양상화군과 허혈양상화 및 허혈군보다 허혈군의 IL-1 β 가 유의성 있게 높았다($p < .05$, Table 1, 2, Fig. 1).

허혈군의 IL-1 β 는 재관류 2시간까지는 증가하여 가장 높게 관찰되었고, 4시간에는 감소되었고, 허혈양상화군의 IL-1 β 는 재관류 1시간 증가한 후 감소되었다. 허혈양상화 및 허혈군의 IL-1 β 는 재관류 1시간까지 증가하고, 2시간에는 감소되었고, 4시간에는 재관류 30분에 관찰된 IL-1 β 수준까지 증가되었다($p < .05$, Fig. 1).

2. IL-4

재관류 30분에 관찰된 IL-4는 허혈양상화 및 허혈군에서 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다($p < .13$). 재관류 1시간($p < .05$)과 4시간($p < .001$)에는 허혈양상화군에서 높게 관찰되었고, 재관류 2시간에는 허혈군의 IL-4 수치가 가장 높게 나타났다($p < .05$, Tables 2, 3, Fig. 2).

허혈양상화군의 IL-4는 재관류 1시간에 증가, 2시간에 다시 감소한 뒤 4시간에는 재관류 1시간 수준까지 상승하였다. 허혈양상화 및 허혈군의 IL-10은 재관류 2시간까지는 큰 차이가 없었으나, 4시간에 감소되었다($p < .05$, Fig. 2).

3. IL-10

재관류 30분과 1시간에 관찰된 IL-10은 허혈양상화군에

Table 2. The difference of the expression of IL-1 β , IL-4, and IL-10 in reperfusion time point by the experimental groups. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

		0.5H			1H			2H			4H		
		M	SD	t(p)	M	SD	t(p)	M	SD	t(p)	M	SD	t(p)
IL-1 β	IC	241.63	21.186	3.990***	278.38	12.070	6.292***	326.13	51.324	6.754***	273.14	35.793	4.293***
	IP-IC	192.88	27.300	(.001)	199.88	33.160	(.000)	171.88	39.223	(.000)	192.38	36.820	(.001)
IL-4	IC	186.88	7.846	-1.662	203.25	17.442	.149	300.75	38.321	4.531***	264.88	26.734	6.259***
	IP-IC	205.38	30.482	(.119)	201.88	19.335	(.883)	220.63	32.147	(.000)	176.50	29.665	(.000)
IL-10	IC	101.00	13.342	-1.662	96.13	7.530	-2.289*	116.38	19.412	3.037**	96.75	9.618	2.879*
	IP-IC	94.50	18.716	(.135)	111.33	16.848	(.041)	94.50	6.188	(.009)	79.13	14.397	(.012)

IC: Ischemia

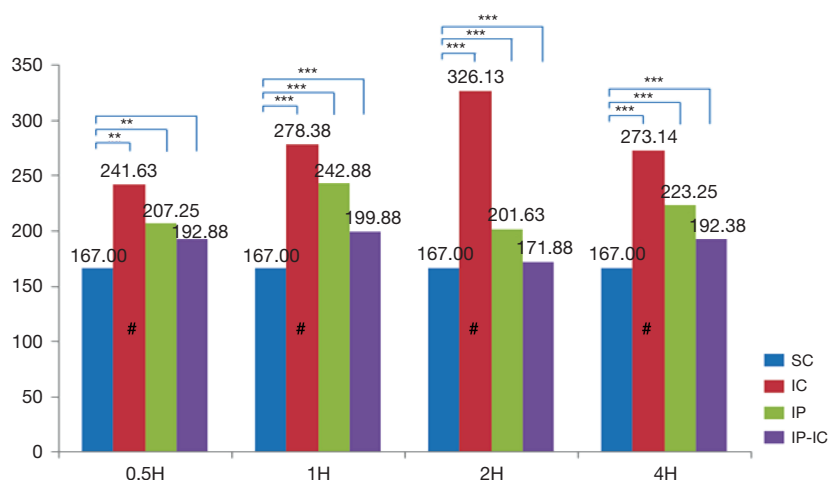
IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia

0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

**Fig. 1.** The difference in the expression of IL-1 β by reperfusion time. Data are presented as mean (pg/mL). IL-1 β level decreased more significantly in IP group and IP-IC group than in ischemia group. At all the time points of reperfusion, IL-1 β levels were lower in IP group than in IC group, and were the lowest in IP-IC group. Values are mean. * $p < .01$ versus control, ** $p < .001$ versus control. # $p < .001$ versus IP-IC group. SC: Sham control; IC: Ischemia; IP: Ischemia preconditioning; IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia; 0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning.

서 가장 높게 관찰되었고($p < .05$), 재관류 2시간에 관찰된 IL-10은 허혈군과 허혈양상화군에서 높게 나타났다($p < .05$). 재관류 4시간에 관찰된 IL-10은 허혈양상화군에서 높게 나타났다($p < .05$, Tables 2, 4, Fig. 3).

허혈양상화군의 IL-10은 재관류 1시간에서 가장 높았고, 2시간에 가장 낮았다. 허혈군의 IL-10은 재관류 시간에 따라 증가 또는 감소되었다. 허혈양상화 및 허혈군의 IL-10은 재관류 1시간에서 가장 높았고, 이후로는 시간이 흐를수록 감소되었다($p < .05$, Fig. 3).

고 찰

저자들은 허혈 후 변화되는 친염증성 사이토카인 IL-1 β 와 항염증성 사이토카인 IL-4와 IL-10을 관찰하였고, 허혈-재관류 손상을 줄여준다고 알려진 허혈양상화가 IL-1 β 와 IL-4, IL-10의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

본 실험에서 IL-1 β 는 대조군과 비교했을 때 모든 실험군에서 증가되었고, 허혈군에서 관찰된 IL-1 β 가 허혈양상화군과 허혈양상화 및 허혈군보다 유의하게 높게 발현되는 것을 알 수 있었다($p < .001$). IL-1 β 와 같은 친염증성 사이

토카인은 축적되면서 염증으로 인한 손상을 유발하며 혈관 내피에서 부착 분자들의 발현을 촉진하고 호중구의 결합을 유도하는 등 다양한 병태학적 과정들을 심화시킨다고 알려져 있다[8]. Serafin 등[19]은 흰쥐의 간동맥과 간문맥을 60분 허혈 후 6시간 재관류시킨 허혈군보다, 허혈양상화를 처치한 허혈양상화군에서 IL-1 β 가 3.5배 가량 감소한다고 하였고, Pera 등[20]은 중간대뇌동맥을 90분 허혈시키기 3일 전에 15분씩 한 쪽의 중간대뇌동맥을 허혈

Table 3. The expression of cytokines IL-4 in reperfusion time point by the experimental groups. * $p < .001$ versus control at baseline.

			N	M	SD	F (p)
IL-4	SC	—	8	187.25	8.812	
		0.5H	8	186.88	7.846	0.130 ()
		1H	8	203.25	17.442	0.000 (*)
		2H	8	300.75	38.321	0.000 (*)
	IP	0.5H	8	187.88	12.811	0.130 ()
		1H	8	278.88	42.650	0.000 (*)
		2H	6	240.83	33.054	0.000 (*)
		4H	8	278.25	39.176	0.000 (*)
	IP-IC	0.5H	8	205.38	30.482	0.130 ()
		1H	6	202.33	22.853	0.000 (*)
		2H	8	220.63	32.147	0.000 (*)
		4H	8	176.50	29.665	0.000 (*)

SC: Sham control

IC: Ischemia

IP: Ischemia preconditioning

IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia

0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

양상화 처치를 하면, 허혈양상화를 처치하지 않은 실험군보다 검색범위가 51% 감소하고, IL-1 β 가 2.9배 감소된다고 하였다. 이들의 실험결과를 고려하면, 허혈군에서 증가된 IL-1 β 는 허혈양상화군과 허혈양상화 및 허혈군보다 염증반응을 증가시키고 허혈 손상을 가중시킬 수 있다고 생각되었다.

항염증성 사이토카인 IL-4는 대조군과 비교했을 때 모든 실험군에서 증가되었고, 허혈양상화군에서 관찰된 IL-4가 허혈군 그리고 허혈양상화 및 허혈군보다 더 높게 발현되었다. 항염증성 사이토카인은 친염증성 사이토카인의 작용을 억제한다고 알려져 있으며[21], IL-4는 TNF- α 와 IL-1 β 를 감소시킨다고 알려져 있다[22]. Kim 등[23]은 게르빌루스쥐를 대상으로 온목동맥을 5분 허혈 처치하기 전, 2분의 허혈양상화를 시행하고 해마의 CA1의 조직을 면역조직화학염색 후 IL-4의 발현을 확인했을 때, 허혈양상화군이 대조군과 5분 허혈처치만 시행한 허혈군보다 IL-4의 발현이 높게 나타났고 재관류 120시간에 허혈군은 IL-4의 발현이 사라진 반면, 허혈양상화군에서는 IL-4의 발현이 지속된다고 하였다. 또한 이들은 허혈군에서는 피라미드세포가 유의하게 감소되지만, 허혈양상화군에서는 신경세포의 감소를 초래하지 않으며, IL-4 발현이 허혈재관류 손상을 감소시킨다고 하였다. 본 실험에서도 모든 실험군에서 대조군보다 IL-4가 상승했는데, 이는 재관류 손상에서 발생한 염증반응을 감소시키기 위해서 상승한 것으로 생각되어진다. 또한 허혈군이 허혈양상화 및 허혈군보다 더 높은 수치가 높은 것으로 보아 재관류 초기 단계에서는 허혈군에서 허혈재관류 손상을 감소시키는 활동이 더 빠른 시

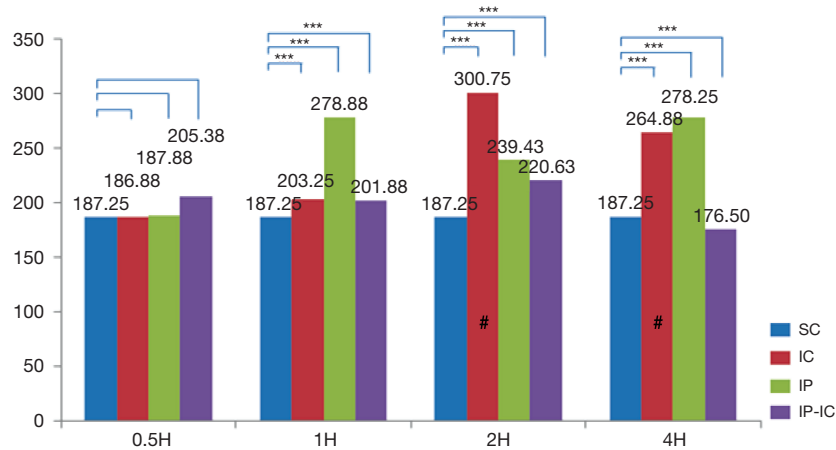


Fig. 2. The difference in the expression of IL-4 by reperfusion time. Data are presented as mean (pg/mL). At 0.5H, IL-4 was highest in IP-IC group. At 1H and 4H, IL-4 were highest in IP group. At 2H, IL-4 in IC group was higher than in IP group. * $p < .001$ versus control, # $p < .001$ versus IP-IC group. SC: Sham control; IC: Ischemia; IP: Ischemia preconditioning; IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia; 0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

기에 나타나고 있다고 생각할 수 있다.

IL-10의 경우에는 대조군과 비교했을 때 모든 실험군에서 대조군보다 높게 발현되었고, 이 중 허혈양상화군에

Table 4. The expression of cytokines IL-10 in reperfusion time point by the experimental groups. IL-10 showed the highest expression level in IP group. In IC group, IL-10 was the highest at 2H. In IP group, IL-10 was the highest at 1H. In IP-IC group, IL-10 was the highest at 1H. * $p < .05$ versus control at baseline, ** $p < .01$ versus control at baseline, *** $p < .001$ versus control at baseline.

			N	M	SD	F (p)
IL-10	SC	—	8	85.75	2.053	
		IC	8	101.00	13.342	0.005(**)
	IP	1H	8	96.13	7.530	0.005(**)
		2H	8	116.38	19.412	0.047(*)
		4H	7	97.57	10.081	0.000(***)
		0.5H	8	123.63	16.396	0.005(**)
	IP-IC	1H	8	135.25	30.089	0.005(**)
		2H	6	113.50	24.023	0.047(*)
		4H	8	121.63	18.213	0.000(***)
		0.5H	8	94.50	18.716	0.005(**)
	IP-IC	1H	6	111.33	16.848	0.005(**)
		2H	8	94.50	6.188	0.047(*)
		4H	8	79.13	14.397	0.000(***)

SC: Sham control

IC: Ischemia

IP: Ischemia preconditioning

IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia

0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning

서 가장 높게 발현되었으나 유의성은 없었다. 이는 Wei 등 [15]이 2분 허혈과 재관류를 2번 반복하였을 때 재관류 후 IL-10이 증가되나, 상승폭이 작다고 하였고 재관류 시간 5분, 1시간, 4시간 중에서 1시간에서 가장 높게 IL-10이 발현된다고 한 결과와 유사하였다. 그러나 본 실험에서는 허혈양상화군이 재관류 4시간에서 121.63 (pg/mL)을 유지하였고, 허혈양상화 및 허혈군에서 79.13 (pg/mL)을 유지한 반면, Wei 등 [15]은 IL-10이 4시간에 감소된다고 하였다. 재관류 시간에 따른 IL-10의 차이는 Wei 등 [15]의 실험과 본 실험의 실험 설계가 다르기 때문이라고 생각되었다. IL-10은 재관류 1시간 전후에서 대조군보다 증가되었는데, 이는 허혈 초기의 보호 효과에 IL-10 관여하는 것으로 생각되었다. 허혈양상화 및 허혈군의 IL-10은 대조군 또는 허혈군과 비교했을 때 큰 차이가 나지 않았으며, 재관류 2시간과 4시간에는 오히려 허혈군보다 유의성 있게 감소되는 현상이 나타났는데, 앞으로 추가적인 연구를 통해 이러한 현상의 원인을 찾아야 할 것이다.

또한, 허혈양상화 직후 4시간 이내 재관류 시기에서만 실험을 하였기 때문에, 재관류 24시간 후부터 다시 나타나 72시간에서 96시간까지 지속되는 보호시기의 지연기에 나타나는 후기 효과에 대해서는 확인할 수가 없다. 따라서 향후 보호시기의 지연기에 해당하는 재관류 후기 시간에 대해서도 추가 실험이 이루어진다면 효과적인 허혈양상화 처치를 실시할 수 있는 시간설정을 할 수 있고 차후의 연구들에 좋은 근거자료가 될 수 있다고 생각한다.

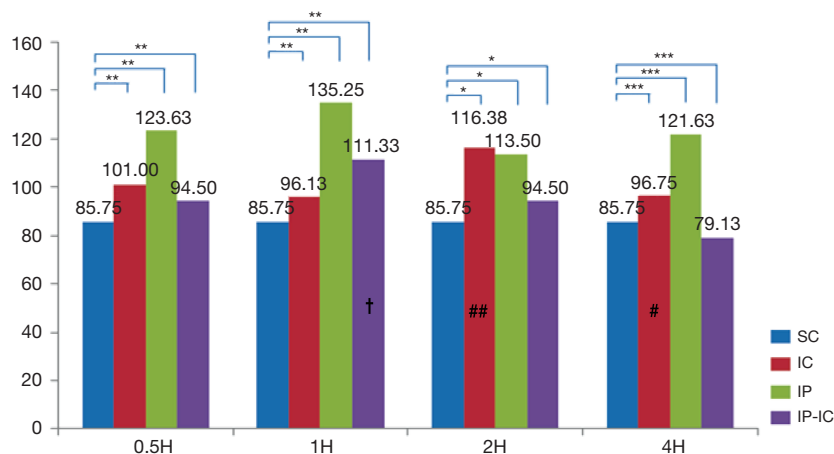


Fig. 3. The difference in the expression of IL-10 by reperfusion time. Data are presented as mean (pg/mL). IL-10 showed the pattern of repeated increase and decrease in all the groups. At 0.5H and 1H, IL-10 was the highest in IP group. At 2H, IL-10 was the highest in IC group. At 4H, IL-10 was the highest in IP group. * $p < .05$ versus control at baseline, ** $p < .01$ versus control at baseline, *** $p < .001$ versus control, # $p < .05$ versus IP-IC group, ## $p < .01$ versus IP-IC group, † $p < .05$ versus IC group. SC: Sham control; IC: Ischemia; IP: Ischemia preconditioning; IP-IC: Ischemia preconditioning and ischemia; 0.5H: Half an hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 1H: 1 hour reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 2H: 2 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning; 4H: 4 hours reperfusion after ischemia or ischemia preconditioning.

또한 본 실험에서는 허혈 또는 허혈-재관류로 인한 조직 손상을 직접 확인하지 못하였다. 비록 친염증성 사이토카인의 증가가 염증과 허혈 손상의 증가를 유도한다고 하지만, 허혈 손상은 활성산소기, 항산화효소, 그리고 이들을 발현시키는 여러 전사인자와도 밀접한 관련이 있다. 따라서 이들에 대한 보강 실험을 추가적으로 시행하여, 사이토카인과 허혈 손상의 상관관계를 명확하게 확인하는 과정이 필요할 것이라 생각되었다. 이러한 허혈양상화의 보호 효과 기전을 이해하는 것은 허혈재관류 손상을 감소시킬 수 있는 비침습적 치료의 접근을 가능하게 할 수 있다고 생각한다.

REFERENCES

1. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999; 30:1481-9.
2. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004; 70:71-86.
3. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74:1124-36.
4. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 298:229-317.
5. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*. 2000; 118:503-8.
6. Epstein FH, Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998; 338:436-45.
7. Zhang F, Hu EC, Topp S, Lei M, Chen W, Lineaweaver WC. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg*. 2006; 22:641-7.
8. Zhang Z, Pan C, Wang Hz, Li YX. Protective effects of ost-hole on intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Exp Clin Transplant*. 2014; 12:246-52.
9. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*. 1991; 77:1859-70.
10. Engles RE, Huber TS, Zander DS, Hess PJ, Welborn MB, Moldawer LL, et al. Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 1997; 69:425-8.
11. Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol*. 1995; 15:121-9.
12. Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun*. 2004; 5:609-14.
13. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17:701-38.
14. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PL. IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol*. 1992; 149:1432-8.
15. Wei M, Kuukasj Rvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, et al. Cytokine responses in patients undergoing coronary artery bypass surgery after ischemic preconditioning. *Scand Cardiovasc J*. 2001; 35:142-6.
16. Zhai QH, Futrell N, Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci*. 1997; 152:119-24.
17. Abu Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Tapuria N, Seifalian M, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on liver ischemia/reperfusion injury using a new mouse model. *Liver Transpl*. 2011; 17:70-82.
18. Takhtfooladi MA, Jahanshahi A, Sotoudeh A, Jahanshahi G, Takhtfooladi HA, Aslani K. Effect of tramadol on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion : an experimental study. *J Bras Pneumol*. 2013; 39:434-9.
19. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 2004; 39:688-98.
20. Pera J, Zawadzka M, Kaminska B, Szczudlik A. Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia. *J Neurosci Res*. 2004; 78:132-140.
21. Kambayashi T, Jacob CO, Strassmann G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. *Cell Immunol*. 1996; 171:153-8.
22. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:3803-7.
23. Kim DW, Lee JC, Cho JH, Park JH, Ahn JH, Chen BH, et al. Neuroprotection of ischemic preconditioning is mediated by anti-inflammatory, not pro-inflammatory, cytokines in the Gerbil hippocampus induced by a subsequent lethal transient cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 2015; 40:1984-95.

The Effect of Ischemic Preconditioning on the Expression of Serum Cytokines after 2 Hours Ischemia and Timely Reperfusion in the Hindlimb of Mice

Jeong han Jin¹, Sung Jae Kim¹, Younkyoung Seo², Shinyoung Kim³

¹*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

²*College of Nursing, Hanyang University*

³*Department of Physical Therapy, Ansan University*

Abstract : The large volume of reactive oxygen species are generated during reperfusion after transient or post-procedural ischemia, which leads to cell injury. This ischemia-reperfusion (IR) injury may cause local and even systemic injuries. Thus, the need to reduce the IR injury has been highlighted and in this regard studies have demonstrated the ischemic preconditioning (IP) in which short ischemia and reperfusion are repeated before ischemia. Such IP is known to protect the tissues from IR injury by reducing inflammation response during ischemia.

Thus, this study was based on IP known to protect the tissue with developing the mechanism of resistance to ischemia and reperfusion injury in cellular tissue. As the substance that plays an important role in the inflammatory response during IR injury is cytokines, this study was intended to review and discuss the methodologies of IP as well as to analyze the correlation of its effects on the expression of cytokines.

Left common iliac artery in male mice of which weight was from 40 g to 45 g, was treated for ischemia. The animal groups consisted of ischemia (IC) group receiving 2-hour ischemic treatment alone; IP group receiving short 5-minute ischemia and reperfusion treatments repeated three times; and, ischemic preconditioning-ischemia (IP-IC) group receiving IP treatment followed by 2-hour ischemic treatment. Following these treatments in each group, reperfusion for intergroup comparisons was carried out at 30 minutes, and 1, 2 and 4 hours. The results of this study were as follows:

First, the expression level of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β was the highest in IC group receiving 2-hour ischemic treatment alone ($p < .001$). Second, the expression level of anti-inflammatory cytokine, IL-4 was the highest in the IP group ($p < .001$). Third, the expression level of anti-inflammatory cytokine, IL-10 was the highest in the IP group ($p < .001$).

In conclusion, even though the results had the degree of difference, the expression level of pro-inflammation cytokine, IL-1 β in IC group was significantly lower than that in IP group, and the expression levels of anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10 in IP were significantly higher than those in IC group and IP-IC group.

Keywords : Mouse, Ischemic preconditioning, Ischemia-reperfusion injury, IL-1 β , IL-4, IL-10