

## 스트레스성 자극에 의한 항산화효소 유도과 허혈/재관류 심장 보호효과

박종완 · 김영훈 · 김명석

서울대학교 의과대학 약리학교실

### Effects of in vivo-stresses on the Activities of the Myocardial Antioxidant Enzymes and the Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Hearts

Jong-Wan Park, Young-Hoon Kim and Myung-Suk Kim

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University,  
28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-799, Korea

(Received June 2, 1995)

(Accepted June 8, 1995)

**ABSTRACT:** It has been found that various stress challenges induce the myocardial antioxidant enzymes and produce an acquisition of the cellular resistance to the ischemic injury in animal hearts. Most of the stresses, however, seem to be quite dangerous to an animal's life. In the present study, therefore, we tried to search for safely applicable stress modalities which could lead to the induction of antioxidant enzymes and the production of myocardial tolerance to the ischemia-reperfusion injury. Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were exposed to various non-fatal stress conditions, i.e., hyperthermia (environmental temperature of 42°C for 30 min, non-anesthetized animal), immobilization (60 min), treadmill exercise (20 m/min, 30 min), swimming (30 min), and hyperbaric oxygenation (3 atm, 60 min), once a day for 5 days. The activities of myocardial antioxidant enzymes and the ischemia-reperfusion injury of isolated hearts were evaluated at 24 hr after the last application of the stresses. The activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), were assayed in the freshly excised ventricular tissues. The ischemia-reperfusion injury was produced by 20 min-global ischemia followed by 30 min-reperfusion using a Langendorff perfusion system. In swimming and hyperbaric oxygenation groups, the activities of SOD and G6PD increased significantly and in the hyperthermia group, the catalase activity was elevated by 63% compared to the control. The percentile recoveries of cardiac function at 30 min of the post-ischemic reperfusion were 55.4%, 73.4%, and 74.2% in swimming, the hyperbaric oxygenation and the hyperthermia groups, respectively. The values were significantly higher than that of the control (38.6%). In additions, left ventricular end-diastolic pressure and lactate dehydrogenase release were significantly reduced in the stress groups. The results suggest that the antioxidant enzymes in the heart could be induced by the apparently safe in vivo-stresses and this may be involved in the myocardial protection from the ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** Ischemia-reperfusion injury, Stress, Antioxidant enzyme

### I. 서 론

산소분자의 일가환원에 의해 생성되는 산소대사물 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $^1O_2$ )은 반응성이 매우 강하여 핵산, 지질, 단백질 등의 생체 주요 거대분자에 대하여 산화성 변성을 야기하는 독성을 가지고 있다 (Cadenas, 1989). 이러한 반응성 산소대사물은 정상적 호기성 세포에서도

소량이 끊임없이 발생되지만 세포의 내인성 항산화체계에 의해 적절히 제거되므로 정상상태에서는 세포독성을 나타내지 못한다 (Yu, 1994). 그러나 반응성 산소대사물의 생성이 급증하거나 항산화 방어능력이 감소되는 경우에 세포는 산화독성을 받게 된다 (Cadenas, 1989). 과거에 원인을 몰랐던 여러 질환들에서 이와 같은 반응성 산소대사물에 의한 산화독성이 발병기전으로 작용할 가능성이 있음이 밝혀지고 있으며, 허혈/재관류 심장에서도 역시 이러한 기전이 부정맥이나 조직손상을 매개한

\*본 연구는 1994년도 교육부 학술연구조성비(기초의학) 및 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어졌음.

다는 설이 많은 지지를 받고 있다 (Downey, 1990). 즉 허혈기간에는 심장세포내 reducing potential이 증가하기 때문에 재관류시 공급되는 산소의 일가환원이 쉽게 이루어져 반응성 산소대사물이 급증하고, 아울러 항산화효소 활성이 감소함으로써 심장은 산화손상을 받게 될 것으로 여겨진다. 이러한 반응성 산소대사물에 의한 세포손상에 근거하여 근자에 허혈심근의 재관류손상을 방지하기 위한 방법으로 항산화효소를 보충해주려는 시도가 있었다 (Jolly, 1984). 그러나 외부에서 투여한 항산화효소는 그 분자량이 크기 때문에 조직침투가 불량할 뿐 아니라 혈류공급이 중단된 허혈부위로 분포하기가 어려우며 또한 체내 반감기도 짧기 때문에 *in vivo*에서는 항산화효소의 효과가 기대에 미치지 못하였다 (Omar 등, 1991). 따라서 최근에는 항산화제를 투여하기 보다는 내인성 항산화효소의 생체내 합성을 유도하여 심장의 허혈/재관류손상을 방지하려는 시도가 있다. 즉 세균의 내독소 투여 (Bensard 등, 1990), 심장의 압력과 부하 (Kirshenbaum과 Singal, 1992), 잠정적 허혈 (Das 등, 1993), 중금속 (Hart 등, 1990), X선 조사 (Oberley 등, 1987), interleukin 전처치 (Maulik 등, 1993) 등이 심장에서 항산화효소를 유도한다는 보고들이 있으며, 이러한 조건들 중 내독소 투여와 허혈 그리고 interleukin 전처치의 경우에는 항산화효소 유도와 함께 심장의 허혈/재관류손상도 방지됨이 보고되었다. 그러나 이러한 조작들은 적출심장이나 실험동물을 이용한 실험적인 방법으로 그 효과가 *in vivo*에서 검증된 바가 없을 뿐 아니라 이를 실제로 생체에 응용하기도 곤란하다.

한편 최근에 *in vivo*로 가하는 스트레스성 자극이 항산화효소를 유도하고 허혈/재관류손상을 방지한다는 보고들이 있다. 즉 실험적으로 체온(직장온도)을 42°C로 15분간 유지시켜 고열자극을 가한 흰쥐의 심장에서 대조군 심장에 비하여 허혈후 심기능회복이 우수하고 세포질 효소의 유출이 감소할 뿐 아니라 (Currie 등, 1988, Karmazyn 등, 1990), 항산화효소인 catalase (Currie 등, 1988)와 superoxide dismutase (Liu 등, 1992) 활성이 증가하고 또한 catalase 활성 억제제에 의해 고열자극의 허혈보호효과가 소실된다는 (Karmazyn 등, 1990) 보고들이 있었다. 이러한 보고들은 전신적으로 가해진 고열이라는 스트레스성 자극이 항산화효소를 유도하고 따라서 허혈내성을 획득케 할 가능성이 있음을 시사하는 바라 여겨진다. 그러나 고열자극은 상당한 치사율을 남기는 매우 위험한 방법으로 이를 실행에 옮기기는 어렵다는 문제점을 또한 가지고 있다 (Currie 등, 1993). 그런데 이러한 고열자극 외에도 결박 (Sazontova 등, 1987)이나 신체적 운동 (Quintanilha, 1984) 등 위험하지 않을 정도

의 비교적 경한 스트레스성 자극으로도 항산화효소 증가를 유도할 수 있다는 보고가 있다. 그러나 이러한 자극에 의한 항산화효소 증가가 심장 허혈/재관류손상을 방지할 수 있는지에 대한 명확한 증거는 아직 없다. 본 연구에서는 치명적이지 않은 비교적 경한 스트레스성 자극으로도 항산화효소가 유도될 수 있는지와 이러한 방법에 의해 심장의 허혈/재관류손상이 방지될 수 있는지를 조사하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 연구 재료

실험동물은 체중 200 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 사용하였으며, 환경 및 감염에 의한 스트레스를 배제하기 위하여 동물실을 22°C 항온과 SPF 조건으로 유지시켰다. Glutathione reductase, reduced glutathione, oxidized glutathione, epinephrine, hydrogen peroxide, t-butyl hydroperoxide, sodium pyruvate, thiobarbituric acid, ADP, NADP, NADPH, NAD, NADH 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. 기타 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

### 2. 실험군의 설정

- (1) 대조군 : 스트레스를 가하지 않은 정상 흰쥐
- (2) 실험군 : 각종 스트레스를 가한 흰쥐  
다음과 같은 스트레스를 1일에 1회씩, 5일간 시행하고 24시간이 지난 후 심장을 적출하여 실험에 사용하였다.
- (a) 고온군 : 경미한 열자극을 가하는 실험군이다. 흰쥐를 마취하지 않은 상태로 42°C의 온도와 적정한 습도가 유지되는 chamber에 30분간 넣었다. 이러한 조건에서는 직장온도가 41°C에서 42°C 사이로 10분간 유지되며 고열에 의한 후유증이 없음을 예비실험을 통해 확인하였다.
- (b) 고압산소군 : 산화성 자극의 한 유형으로 선택하였다. 흰쥐를 3기압의 100% 산소가 유지되는 hyperbaric oxygen chamber에 넣어 1시간 동안 oxidative stress를 가하였다.
- (c) 결박군 : Mental stress의 한 유형으로 선택하였다. 흰쥐의 등이 나무판에 닿도록 하고 사지를 비닐테이프로 나무판에 1시간 동안 고정시켰다.
- (d) 운동군 : Physical stress의 한 유형으로 선택하였다. Treadmill을 이용하여 흰쥐를 20 m/min의 속도(경사

도 10")로 매일 30분씩 달리게 하였다.

(e) 수영군 : Mental stress와 physical stress가 혼합된 stress로 수영을 택하였다. 2 m×1.5 m×50 cm (세로×가로×높이)의 수욕조에 25°C의 물을 채우고 흰쥐를 넣어 30분간 수영시켰다.

### 3. 항산화효소 활성 측정

#### 1) 조직시료

대조군 및 스트레스군의 흰쥐로부터 적출한 심장을 3분간 K-H 완충용액으로 관류하여 혈액을 충분히 제거한 직후 액체질소로 급속동결시켜 -70°C에 보관하였다. 심장 무게 4배 (vol.: wt.) 용량의 균질용액 (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4)에 심장을 넣어 잘게 자른 후 polytron 조직분쇄기로 심장조직을 균질화하였다. 이 균질액을 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 균질화 되지 않은 조직이 제거된 상청액을 얻은 후 초음파 조직분쇄기로 모든 막구조를 분쇄시켜 조직시료로 사용하였다. 위의 모든 조작은 4°C 이하에서 시행하였다.

#### 2) Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성도는 epinephrine 자가 산화 방법 (Misra와 Fridovich, 1972)을 이용하여 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, pH 10.2 (2.930 ml), 10 mM epinephrine (40 µl)의 반응액에 첨가한 시료 (30 µl)에 의하여 epinephrine에서 adrenochrome으로의 산화가 억제되는 율을 30°C, 325 nm에서 UV-spectrophotometer로 측정하였다. Epinephrine 자가산화율을 50% 억제하는 효소 활성을 1 unit로 계산하였다.

#### 3) Catalase(CAT) 활성 측정

CAT 활성도는 이 효소에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분해시 발생하는 산소의 양을 oxygen monitor로 측정하는 Karmazyn 등 (1990)의 방법으로 측정하였다. 조직시료 (10-20 µl)를 5 ml 반응액 (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM pentetic acid, pH 7.4, 30°C)에 넣어 5분 동안 preincubation시킨 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (최종농도, 4.6 mM)를 첨가하여 산소의 생성물을 oxygen monitor(YSI, 5300)로 기록하였다. 효소의 활성은 정제된 catalase (Sigma)를 이용하여 작성된 표준직선을 토대로 계산하였다.

#### 4) Glutathione peroxidase(GPX) 활성 측정

GPX의 활성도는 t-butyl hydroperoxide를 기질로 사용

한 DelMaestro와 McDonald (1985) 방법으로 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.24 U/ml glutathione reductase, 1 mM GSH, 0.15 mM NADPH를 함유한 반응액 0.98 ml에 조직시료 10 µl와 120 mM t-butyl hydroperoxide 10 µl를 넣은 후 37°C에서 반응시키면서 NADPH 소모율을 340 nm에서 UV-spectrophotometer로 측정하였다. 상기 반응조건에서 1분 동안에 NADPH 0.5 mol을 소모하는 효소의 활성을 1 unit로 계산하였다.

#### 5) Glutathione reductase(GR) 활성 측정

GR의 활성도는 Goldberg와 Spooner (1983)의 방법을 이용하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 2.2 mM oxidized glutathione (GSSG), 0.15 mM NADPH, 시료 50 µl가 포함된 1 ml 반응계 (37°C)를 반응시키면서 340 nm에서 흡광도 변화를 관찰하였다. 상기 반응조건에서 1분 동안에 NADPH 0.5 mol을 소모하는 효소 활성을 1 unit로 계산하였다.

#### 6) Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)의 활성 측정

G6PD의 활성도는 Deutsch (1983) 방법에 따라, 50 mM Tris/HCl (pH 7.0), 0.38 mM NADP, 6.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM glucose 6-phosphate의 1 ml 반응계에 조직시료 0.1 ml를 넣고 NADPH 생성량을 340 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다. 반응은 30°C에서 시행하였으며 1분 동안에 1 µmol의 NADPH를 생성시키는 효소 활성을 1 unit로 계산하였다.

### 4. 심장 허혈/재관류손상 유도

각 실험군의 흰쥐에 sodium pentobarbital (30 mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 인공호흡 상태에서 흉부를 절개하였다. 대동맥을 절개하고 카놀라를 삽입한 다음 폐장을 포함한 주위조직을 제거하고 곧이어 Langendorff 관류장치에 대동맥 삽입관을 연결시켜 역방향 관류를 하였다. 관류액은 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>로 포화시킨 Krebs-Henseleit (K-H) 완충용액 (NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 27.2 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, glucose 10 mM, pH 7.4)을 80 cm H<sub>2</sub>O의 일정 압력으로 관류하고, 심장 온도를 37°C로 일정하게 유지하였다. 충분히 산소가 포화된 K-H용액으로 15분 동안 관류하여 심기능이 안정화되면 대동맥 삽입관에 장치된 3-way 코르크를 막아 심장허혈을

유도하였다. 20분 허혈을 지속한 다음 다시 3-way 코크를 열어 재관류시켰다. 모든 심장은 실험이 끝나면 종축으로 4등분하여 표면에 묻은 물기를 닦아 내고 무게를 측정하였다.

### 5. 심기능 및 심근세포 손상 측정

심기능의 지표로서 심박수와 좌심실 압력을 측정하였다. 좌심실 압력은 balloon tip을 승모판을 통해서 좌심실에 삽입하고 압력변환기에 연결한 후, 생리기록계를 이용해서 측정하였다. 이때 안정화된 심장의 좌심실 이완기말 압력(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 5 mmHg가 되도록 balloon을 팽창시켰다. 심박수는 1분간 기록된 수축 횟수로 계산하였고 좌심실 이완기말 압력은 심근의 contracture 정도를 그리고 수축기말 압력과 이완기말 압력의 차이(developed pressure)를 심근의 수축력을 나타내는 지표로 사용하였다. 또한 developed pressure에 심박수를 곱하여 심기능지수를 산출하였다. 허혈조작전의 심기능 지수를 기준으로 허혈 후 재관류 30분에 심기능 백분율을 계산하였다.

세포질 효소인 lactate dehydrogenase(LDH)의 유출을 심근세포 손상의 지표로 삼았다. 20분간의 허혈에 이은 재관류 초기 5분까지 관류액을 받아 관류량을 측정하고 이를 얼음 속에 보관하여 8시간 내에 효소측정 시료로 사용하였다. LDH 활성은 48 mM phosphate buffer(pH 7.5), 0.6 mM sodium pyruvate, 0.18 mM NADH를 함유한 반응계에 관류액 시료 0.5 ml를 첨가한 후 25°C에서 NADH가 NAD로 산화되는 과정을 340 nm에서의 흡광도 변화로 기록 측정하였다(Bergmeyer and Bernt, 1974).

## III. 결 과

### 1. 스트레스성 자극에 의한 항산화효소 유도

스트레스성 자극에 의한 항산화 효소의 변화를 조사하기 위하여 SOD, CAT, GPX, GR, G6PD 등의 효소 활성을 측정하였다. SOD의 활성은 수영군(mean, 27.24 U/mg protein)과 고압산소군(28.49)에서 대조군(20.95)에 비하여 약 30% 정도로 의미 있게 증가하였다(Fig. 1). CAT의 활성은 고온군(155.6 U/mg protein)에서 대조군(95.4)보다 63%의 증가를 보였다(Fig. 2). Glutathione 관련 효소인 GPX와 GR은 스트레스성 자극에도 활성 변화가 없었으며(Fig. 3, 4) NADPH를 생성하여 reduced glutathione의 재생에 기여하는 G6PD의 활성

이 수영군과 고압산소군에서 대조군(6.31 mU/mg protein)에 비하여 20-30% 정도 증가하였다(Fig. 5).

### 2. 스트레스성 자극에 의한 허혈/재관류 심장의 보호 효과

#### 1) 심기능 지수

적출한 심장을 15분간 관류하여 심수축이 안정화되면 이 때의 심기능 지수(심박수×수축력×10<sup>-3</sup>)를 기준으로 하여 이후의 심기능 변화를 산출하였다. 모든 실험군에서 적출심장의 관류를 차단하면 2분내에 심수축이 정지되며, 허혈후 약 15분이 되면 이완기말 압력이 상승하는 허혈 경축이 관찰되었다. 20분간의 허혈에 이어 재관류를 시행하면 심장은 곧 매우 불규칙적인 수축과 동시에 점차 경축이 더 심해져 2분만에 수축이 매우 약화되

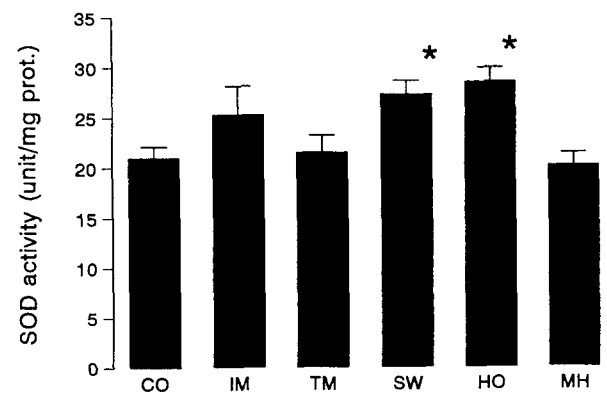


Fig. 1. Superoxide dismutase (SOD) activity in the hearts of stressed rats. SOD activity was measured as described in Methods. CO: control, IM: immobilization, TM: treadmill, SW: swimming, HO: hyperbaric oxygenation, MH: mild hyperthermia. Each bar represents the mean±SE of six experiments. \*: p < 0.05 vs control in Student's t-test.

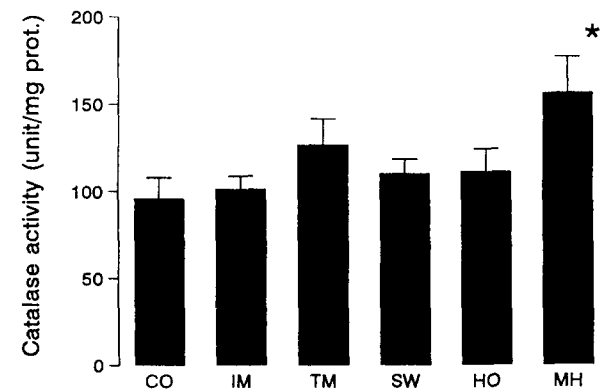
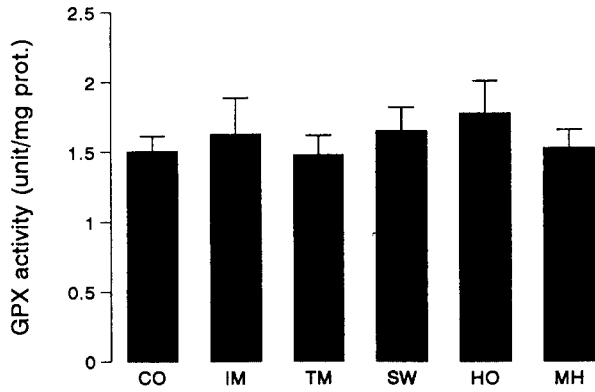
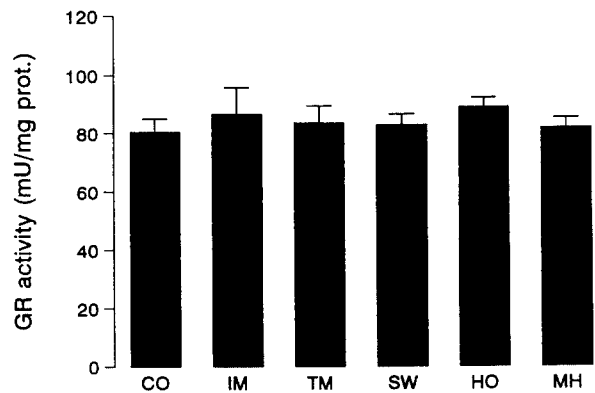


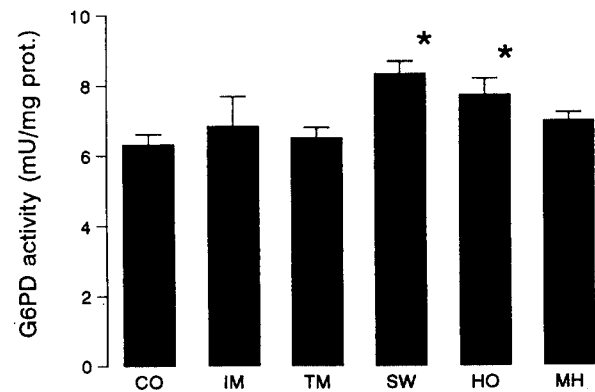
Fig. 2. Catalase activity in the hearts of stressed rats. The enzyme activity was measured as described in Methods. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean±SE of six experiments. \*: p < 0.05 vs control in Student's t-test.



**Fig. 3.** Glutathione peroxidase (GPX) activity in the hearts of stressed rats. GPX activity was measured as described in Methods. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of six experiments.

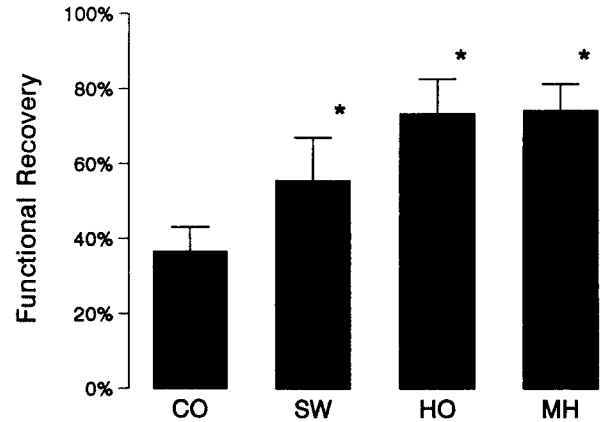


**Fig. 4.** Glutathione reductase (GR) activity in the hearts of stressed rats. GR activity was measured as described in Methods. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of six experiments.

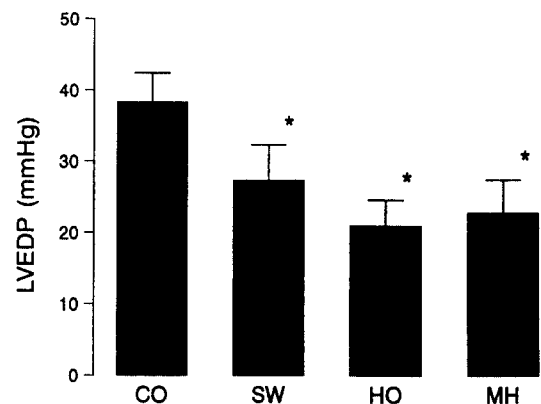


**Fig. 5.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in the hearts of stressed rats. G6PD activity was measured as described in Methods. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of six experiments. \*,  $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.

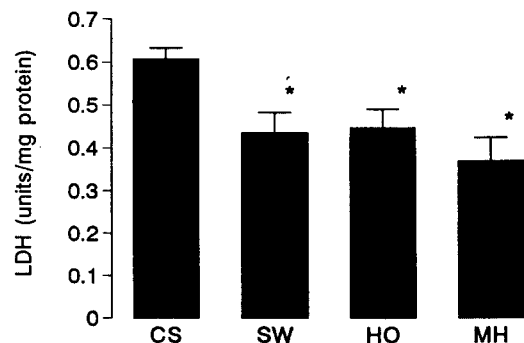
었다. 심수축은 재관류 5분부터 서서히 회복하며 이완기 말 압력도 점차 낮아졌다. 재관류 30분에는 심기능이 다



**Fig. 6.** Functional recovery in post-ischemic reperfused hearts of stressed rats. The percentile recovery of cardiac function was measured at 30 min of reperfusion after ischemia. The calculation method for percentile recovery was described in Methods. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 12-18 experiments. \*,  $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.



**Fig. 7.** Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) in post-ischemic reperfused hearts of stressed rats. LVEDP was measured at 30 min of reperfusion after ischemia. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 12-18 experiments. \*,  $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.



**Fig. 8.** Lactate dehydrogenase (LDH) release in post-ischemic reperfused hearts of stressed rats. The amount of LDH released into the coronary effluent during the first 5 minute period of the reperfusion phase was measured by an enzymatic method. The abbreviations are the same as those in Fig. 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 12-18 experiments. \*,  $p < 0.05$  vs control in Student's t-test.

소 회복되며 이후로는 더 이상 심기능 회복에 차이가 없었다. 이와 같은 허혈/재관류에 따른 심기능 회복 정도는 대조군 (mean  $\pm$  SE,  $38.6 \pm 0.07\%$ )에 비하여 수영군 ( $55.4 \pm 11.5\%$ )과 고압산소군 ( $73.36 \pm 9.28\%$ ) 그리고 고온군 ( $74.2 \pm 7.06\%$ )에서 뚜렷이 향상되었다 (Fig. 6).

## 2) 이완기말 압력

좌심실 이완기말 압력의 증가는 심실근 경축의 상태를 나타내는 것으로 이는 허혈/재관류 손상의 정도를 가늠하는 지표의 하나이다. 허혈기간 및 재관류 초기에 상승되었던 이완기말 압력은 재관류 시간이 경과함에 따라 점차 낮아져 30분에는 모든 실험군에서 초기 상승 압력의 절반 수준 이하로 낮아졌다. 대조군 ( $38.4 \pm 4.10$  mmHg)에 비하여 수영군 ( $27.3 \pm 5.04$ )과 고압산소군 ( $20.96 \pm 3.68$ ) 그리고 고온군 ( $22.8 \pm 4.66$ )에서 이완기말 압력의 감소가 빨리 진행되었으며 재관류 30분에는 모든 스트레스군에서 대조군보다 유의한 감소를 보였다 (Fig. 7).

## 3) LDH 유출

세포손상의 지표로 세포막 투과성 증가에 따른 LDH 유출을 측정하였다. 재관류 초기 5분에 관류액으로 유출되어 나온 LDH의 활성이 대조군 ( $0.60 \pm 0.026$  unit/mg wet weight)에 비하여 수영군, 고압산소군, 고온군에서 30% 내지 40% 정도의 의미 있는 감소를 보였다 (Fig. 8).

# IV. 고 찰

본 연구에서는 여러 형태의 스트레스성 자극에 의한 항산화 효소의 유도 가능성과 허혈/재관류 심장의 보호 효과를 조사하였다. 연구결과, 수영군과 고압산소군에서 SOD와 G6PD 효소활성이 증가되었고 고온군에서는 CAT 활성이 증가되었으며, 항산화효소가 증가된 스트레스군의 심장에서 허혈/재관류 손상이 감소하였다. 이러한 결과들은 경한 스트레스성 자극으로도 항산화 효소가 유도되어 허혈내성이 획득될 수 있음을 시사한다고 생각된다.

SOD( $O_2^{\cdot-}$  제거), CAT( $H_2O_2$  제거), GPX( $H_2O_2$  및 organic peroxide 제거), GR(GSH 재생), G6PD(GSH 재생 과정에 필요한 NADPH 공급) 등은 세포의 산화손상을 방어하는 주요 내인성 항산화 효소이다 (Yu, 1994). 이러한 항산화 효소의 증가는 더 많은 산소 대사물을 제거할 수 있기 때문에 산화 손상에 대하여 내성을 유도할 수 있다. 허혈심장의 재관류 손상에서도 산소 대사물이 주요 매개물질로 작용함을 생각해 볼 때, 항산화 효소의

증가는 허혈/재관류손상에 대한 내성 또한 획득케 할 수 있다고 여겨진다. 허혈/재관류 심장에서 심근세포손상을 보호하고 심기능 회복을 촉진하기 위한 방법으로 근자에 스트레스를 이용하여 심장의 항산화효소를 증가시키려는 연구가 시도된 바 있으나 그 효과에 있어서는 일관성이 없었다. 일례로 treadmill 운동과 같은 격렬한 운동으로 골격근과 심장에서 산소라디칼 생성이 증가하며 (Jenkins, 1988) 항산화효소가 유도된다는 (Quintanilha, 1984) 보고가 있는 반면 항산화효소가 증가되지 않는다는 주장도 많이 있다 (Kanter 등, 1985). 이러한 상반된 주장들에 대하여 Powers 등 (1993)은 항산화효소 활성이 운동의 강도에 비례해서 증가되기 때문에 선택한 운동의 강도에 따라 항산화 효소 유도의 결과에 일관성이 없을 수 있음을 지적하였다. 본 연구에서는 treadmill 운동으로 항산화효소가 유도되지 않았는데, 이러한 형태의 신체적 스트레스로 SOD가 유도된다는 다른 보고들 (Quintanilha, 1984, Powers 등, 1993)에서 보면 선택한 스트레스 기간이 8내지 10주로 본 연구의 시행기간 (5일)보다 훨씬 장기간이다. 따라서 본 연구에서 시행한 treadmill 운동은 그 기간이 짧아 항산화효소의 유도가 관찰되지 않았을 수도 있다.

수영은 treadmill 운동과 마찬가지로 신체적 스트레스가 될 뿐 아니라 물에 익숙하지 않은 흰쥐에게는 상당한 정신적 스트레스도 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 수영을 정신적 스트레스와 신체적 스트레스의 혼합형 자극으로 이용하였다. 이러한 수영자극에 의해 흰쥐 심장에서 SOD와 G6PD가 약 30% 증가되었으며 (Fig. 1, Fig. 5), 이러한 결과는 생쥐에게 수영을 장기간 시키는 경우 골격근의 SOD와 G6PD 활성이 증가한다는 Pereira 등 (1994)의 보고와 어느 정도 일치하는 소견이다. 수영에 의한 항산화효소의 활성 변화는 심장이나 골격근뿐만 아니라 다른 여러 조직에서도 관찰되는데 이에 관련된 대부분의 연구에서 시행한 수영조건은 총 수영시간이 100내지 200 시간 정도로 본 연구에서 시행한 총 수영시간 (2.5시간)에 비하면 무려 40내지 80배가된다. 이렇게 본 연구에서 시행한 수영기간이 매우 짧음에도 불구하고 심장에서 항산화효소 활성의 증가가 뚜렷할 뿐 아니라 (Fig. 1, Fig. 5) 허혈/재관류손상에 대한 보호효과도 우수하였던 결과 (Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8)를 고려해 본다면 지금까지 통상적으로 선택했던 수영기간이 너무 길지 않았나 생각된다.

고압산소처치는 조직내 산소공급을 효과적으로 증가시킬 수 있으므로 일산화탄소중독, 혐기성 세균 감염, 각종 장기의 허혈질환 등의 치료에 널리 이용되고 있다. 그러나 산소압력이 너무 높거나 고압산소에 장기간 폭

로되면 산소독성이 또한 나타날수 있다. 즉 고압산소처치시에는 의해 세포내 산소분압이 상승하여 산소대사물의 생성률이 증가되며, 그 결과 각종 조직이 산화손상을 받을 수 있다(Cadenas, 1989). 그러나 본 연구에서 시행한 조건(3기압, 1시간)은 발작이나 호흡부전 등의 산소독성이 유발되지 않는 비교적 안전한 조건이라고 판단되었으며, SOD와 G6PD 활성이 증가되는 것으로 볼 때 적당한 조건의 고압산소요법은 오히려 세포가 산소독성에 대비할 수 있도록 적응시키는데 도움을 주리라 생각된다(Fig. 1, Fig. 5). 고압산소의 항산화효소 유도에 관한 대부분의 연구들은 산소독성이 주로 뇌와 폐장에서 유발된다는 점 때문에 이들 장기에 국한하여 이루어졌다. 즉 Harabin 등(1990)과 Boadi 등(1991)은 SOD와 G6PD를 포함한 일부 항산화효소가 이들 장기에서 증가한다고 보고하였다. 이러한 결과들은 비록 장기는 다르나 심장에서 SOD와 G6PD 활성이 증가된 본 연구 결과와 일치하는 소견으로, 고압산소에 의한 산소분압 상승은 일부 장기에 국한하지 않고 전신적으로 항산화효소를 유도할 가능성이 있음을 시사하는 바를 여겨진다.

심장의 허혈내성을 유도하기 위해 처음으로 시도된 전신적 자극형태는 고열자극이다(Currie 등, 1988). 이들은 전신을 heat pad로 감싸 직장온도를 42°C로 상승시킨(15분 유지) 마취된 흰쥐로부터 24시간 후에 적출한 심장에서 허혈/재관류손상이 방지됨을 관찰하였고, 그 이후로는 이러한 조건이 고열자극실험에서 표준적인 방법으로 다른 연구자들에 의해서도 이용되었다. 그러나 흰쥐의 직장 온도가 42°C에서 1°C라도 상승하면 쉽사리 치명적인 단계에 이르고 정확히 온도를 유지한다 해도 스트레스 반응의 개체차이로 약 10% 가량 사망하게 되며(결과 미발표), 실험동물에 따라서는(예: 토끼) 고열에 더욱 민감하여 자극후 40시간 이내에 20%나 호흡기 후유증으로 사망한다는 보고(Currie 등, 1993)도 있는 등 고열자극방법은 매우 위험한 방법으로 안전하게 실행하기에는 어려운 면이 있다. 이러한 위험성을 감안하여 본 연구에서는 직장온도가 아닌 주위환경의 온도를 42°C로 유지하여 열자극 강도를 낮춘 고온자극을 1일 1회씩 5일 동안 반복하였다. 그 결과 이러한 고온자극으로는 사망한 흰쥐가 없었으며 뚜렷한 신체적 변화나 행동장애도 관찰되지 않았을 뿐 아니라 심장의 CAT 활성이 약 50% 증가되었으며(Fig. 2) 허혈/재관류시 심기능의 회복이 약 2배 증가하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 Currie 등(1988)의 고열자극실험과 비교할 때 CAT 활성 증가나 허혈/재관류손상 방지효과에 있어서 유사한 결과로서, 본 연구의 고온자극 방법이 위험한 기존의 고열자극보다 안전하게 시행할 수 있음을 제시하는 바를

여겨진다.

항산화효소의 생합성 조절기전에 대하여는 아직 밝혀진 바가 매우 적다. 일부 장내세균에서 OxyR과 SoxRS regulon을 통해 항산화효소의 발현이 조절됨이 보고된 바 있으나(Farr와 Kogoma, 1991), 포유류에서는 각종 자극에 의한 항산화효소의 발현 증가가 어떠한 기전에 의 하여 이루어지는지 거의 밝혀지지 않았다. 그러나 포유류에서도 어떤 형태이든 산소대사물을 증가시킬 수 있는 자극이 있을 경우 그에 대한 적응반응의 하나로 항산화효소를 궁극적으로 유도할 수 있으리라 생각되고 있다. 본 연구에서 시행한 고압산소는 산소분압을 상승시켜 산소대사물의 생성을 촉진하며, 수영이나 운동 그리고 결박 등 신체적 정신적 스트레스는 심장활동 증가 및 산소대사율을 증가시켜 산소대사물의 생성 증가를 유발할 수 있다. 한편 열자극은 전신적인 대사증가에 따른 산소대사물 증가뿐 아니라 단백질의 열변성, 세포내 칼슘유입, 세포내 산성화 등 복잡한 대사변화를 초래하므로(Welch, 1990) 다른 자극과 상이한 조절기전을 동원할 수 있고 그 결과 항산화효소 유도의 양상에도 차이가 있으리라 추측된다.

## 참고문헌

- Bensard, D.D., Brown, J.M., Anderson B.O., Banerjee, A., Shanley, P.F., Grosso, M.A., Whitman, G.J.R., Harken A.H. (1990): Induction of endogenous tissue antioxidant enzyme activity attenuates myocardial reperfusion injury, *J. Sug. Res.*, **49**, 128-131.
- Boadi, W.Y., Thaire, L., Kerem, D., Yannai, S. (1991): Effects of dietary factors on antioxidant enzymes in rats exposed to hyperbaric oxygen, *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**, 105-109.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 79-110.
- Currie, R.W., Karmazyn, M., Kloc, M., Mailer, K. (1988): Heat-shock response is associated with enhanced postischemic recovery, *Cir. Res.*, **63**, 543-549.
- Currie, R.W., Karmazyn, M. (1990): Improved post-ischemic ventricular recovery in the absence of changes in energy metabolism in working rat hearts following heat-shock, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **22**, 631-636.
- Currie, R.W., Tanguay, R.M., Kingma, J.G.Jr. (1993): Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts, *Circulation* **87** : 963-971.
- Das, D.K., Engelman, R.M., Kimura, Y. (1993): Molec-

- ular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischemia, *Cardiovasc. Res.*, **27**, 578-584.
- Delmaestro, R.F., McDonald, W. (1985): Oxidative enzyme in tissue homogenate in *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald, R. A. (Ed), CRC Press Inc, Florida, p. 291-296.
- Deutsch, J. (1983): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. in *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd, vol 3, Bergmeyer, H. U. (Ed), Weinheim Co., Florida, p. 190-197.
- Downey, J. (1990): Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion, *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 487-504.
- Farr, S.B., Kogoma, T. (1991): Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Microbiol. Rev.*, **55**, 561-585.
- Goldberg, D.M., Spooner, R.J. (1983): Glutathione reductase in *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd, vol 3, Bergmeyer, H.U. (Ed), Weinheim Co., Florida, p. 258-265.
- Harabin, A.L., Braisted, J.C., Flynn, E.T. (1990): Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen, *J. Appl. Physiol.*, **69**, 328-335.
- Hart, B.A., Voss, G.W., Shatos, M.A., Doherty, J. (1990): Cross-tolerance to hyperoxia following cadmium aerosol pretreatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103**, 255-270.
- Hiro, H., Higo, K., Satow, Y., Lee, J.Y. (1987): Induction of hsp70-like protein during organ culture of rat embryonic heart, *Biochem. Int.*, **15**, 727-733.
- Jenkins, R.R. (1988): Free radical chemistry; relationship to exercise, *Sports Med.*, **5**, 156-170.
- Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, G.D. (1984): Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration, *Circ. Res.*, **54**, 277-285.
- Kanter, M.M., Hamlin, R.L., Unverferth, D.V., Davis, M.W., Merola, A.J. (1985): Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin, *J. Appl. Physiol.*, **59**, 1298-1303.
- Karmazyn, M., Mailer, K., Currie, R.W. (1990): Acquisition and decay of heat-shock enhanced post-ischemic ventricular recovery, *Am. J. Physiol.* **259** : H424-H431.
- Kirshenbaum, L.A., Singal, P.K. (1992): Antioxidant changes in heart hypertrophy: significance during hypoxia-reoxygenation injury, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **70**, 1330-1335.
- Liu, X., Engelman, R.M., Moraru, I., Rousou, J.A., Flack, J.E., Deaton, D.W., Maulik, N., Das, D.K. (1992): Heat shock : A new approach for myocardial preservation in cardiac surgery, *Circulation* **86** : II358-II363.
- Maulik, N., Engelman, R.M., Wei, Z., Lu, D., Rousou, J.A., Das, D.K. (1993): Interleukin-1 alpha preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury, *Circulation*, **88**, II384-394.
- Mitsra, H.P., Fridovich, I. (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170-3175.
- Oberley, L.W., Clair, D.K., Autor, A.P., Oberley, T.D. (1987): Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **254**, 69-80.
- Omar, B., McCord, J. and Downey, J (1991): Ischemia-reperfusion in *Oxidative Stress*, Sies, H. (Ed.), Academic Press, New York, p. 493-527.
- Pereira, B., Costa, R.L.F., Safi, D.A., Medeiros, M.H., Curi, R., Bechara, E.J. (1994): Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats, *Physiol. Behav.*, **56**, 1095-1099.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Lieu, F.K., Ji, L.L., Herb, R.A. (1993): Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium, *Am. J. Physiol.*, **265**, H 2094-2098.
- Quintanilha, A.T. (1984): The effect of physical exercise and/or vitamin E on tissue oxidative metabolism, *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 403-404.
- Sazontova, T.G., Arkhipenko, Iu.V., Meerson, F.Z.T. (1987): Increased enzymatic activity of antioxidant protection of the heart in the adaptation of rats to short-term stress exposure, *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **104**, 411-413.
- Welch, W.J. (1990): The mammalian stress response: cell physiology and biochemistry of stress proteins in *Stress Proteins in Biology and Medicine*, Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 223-278.
- Yu, B.P. (1994): Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.*, **74**, 139-162.