

## Pre-Exercise Protective Effects Against Renal Ischemic Reperfusion Injury in Hsp 70.1 Knockout Mice

Jin Lee and Won Kyu Kim\*

Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Received January 14, 2010 / Accepted March 24, 2010

The objective of this study was to investigate levels of serum creatinine, CuSOD and MnSOD protein expression in the kidney after renal ischemic reperfusion with pre-exercise using heat shock protein 70.1 in knock-out mice (KO). The C57/BL6 strain (Wild type: WT) and KO were divided into 4 groups as follows: Sham control group (Sham), pre-exercise group (Ex), pre-exercise +ischemia group (Ex+IR), and ischemia group (IR). CuSOD and MnSOD expression were significantly decreased ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) and blood creatinine concentration was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in the IR group of KO. In contrast, CuSOD and MnSOD expression in the Ex+IR group of KO were higher than the IR group, while creatinine concentration was significantly lower. These results suggest that Hsp70 is directly correlated to renal ischemic reperfusion injury. Pre-exercise in renal ischemia might prevent or inhibit positive oxidative stress inhibitory effects by increasing anti-oxidative enzymes (CuSOD, MnSOD) within the kidney and improve to prevent renal function. Thus, pre-exercise may have a protective role against renal injury after renal ischemia.

**Key words** : Hsp70.1 knock-out mouse, ischemia renal injury, pre-exercise, creatinine, SOD

### 서 론

급성신부전(acute renal failure)은 신장 내 허혈재관류에 의한 혈류장애로 oxygen free radicals 및 reactive oxygen species (ROS)와 같은 산화적 독성을 생성함으로써 조직내 상피 세포손상을 일으킨다[36]. 즉 산화적 독성들이 조직 내 미토콘드리아를 변화시켜 세포자멸사(apoptotic cell death)를 초래함으로써 조직을 손상시키는 원인이 되어[13] 결국 신장질환의 발병률과 사망률을 높이는 질환이 된다[20]. 하지만 세포내에는 산화적 독성을 제거시키는 효소가 있으며, 이것을 항산화효소(superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx))라 한다. 이중 SOD는 Cu/ZnSOD와 MnSOD로 구분하며, 초산소기(superoxide radical,  $O_2^{\cdot-}$ )를 대사시켜 반응이 높은 수산기 생성을 억제시키고, 과산화 음이온을 과산화수소와 산소로 환원시키기[2] 때문에 산화적 스트레스에 반응하는 표지자로서 지금까지 쉽게 분석되고 있는 물질이다. 더욱이 급성신부전에서 SOD 단백질조절과 생성은 산화적 스트레스 대응에 기인하는 효과적인 치료개발법이라 할 수 있지만 지난 수 십 년간 급성신부전에 대한 연구 성과가 지속적으로 이어져 왔음[7,20]에도 불구하고 여전히 그 효과적인 치료법에 대해 뚜렷한 것이 없다.

한편 Heat-shock protein (HSP)은 산화적 스트레스를 포함한 다양한 스트레스반응에서 유도되는 단백질이며, 항염증에

반응하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 억제시킬 뿐만 아니라 programmed cell death를 억제한다[8,29]. 그중 Hsp 70 kDa (Hsp 70) family는 세포속 단백질을 불안정한 상태에서 안정(folding)시키고, 샤페론(chaperones) 역할을 한다[14]고 알려져 있다. 특히 생쥐에게서 발현되는 Hsp70은 Hsp70.1과 Hsp70.3을 유도하게 되는데, 이들 유전자들은 17번 염색체에서 7kb만 분리되며 99%의 homology를 보이고[17,26], Hsp70의 단백질질을 생성한다. Hsp70의 생성은 치명적인 외부 공격으로부터 세포들을 보호[14]하기 때문에 이들 단백질의 활성요인들이 연구되고 있으며, 운동은 그중 하나의 방법으로 알려져 있다[25]. 운동은 체온증가 및 저산소와 같은 자극에 의해 Hsp70의 발현을 유도함으로써 항산화 효소를 증가시키고, 산화적 스트레스로부터 DNA 손상 및 세포사멸을 억제시키는 것[12,29]으로 보고되어 있다. 몇몇 연구결과[10,15]에 따르면, 허혈에 의한 조직손상에서 운동전처치는 확실히 억제효과가 있음을 제시하였다.

Marber 등[27]과 Rajdev 등[32]이 보고한 내용에 의하면, 허혈에 따른 조직손상에서 Hsp70의 과발현 유도는 조직손상을 억제시킨다고 하였고, Moran 등[28]도 유산소운동이 Hsp70의 발현을 증가시킴으로써 심장근육내 apoptosis를 억제할 뿐만 아니라 세포들을 보호한다고 하였다.

지금까지 급성신부전에 관한 실험은 주로 동물모델을 이용하여 이루어져 왔지만 Hsp70이 결핍된 실험동물에게서 급성신부전에 따른 항산화효소들의 변인은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 뿐만 아니라 운동전처치는 허혈과 관련된 산화적 스트레스에 긍정적인 효과를 준다고 알려져 있음에도 불구하고

#### \*Corresponding author

Tel : +82-2-2290-8196, Fax : +82-2-2281-7841

E-mail : kimwg@hanyang.ac.kr

허혈성신장손상에 대한 항산화효소들의 변인은 전무한 실정이다.

이에 본 연구에서는 허혈성신장조직손상에서 Hsp70의 발현이 관련되어 있다면, Hsp70의 결핍에 따라 산화적조직손상은 더욱 확실하게 나타날 것이라 가설하였다. 이러한 가설을 보다 확실하게 규명하기 위하여 약물 투여 없이 운동전처치만으로 산화적손상에 대한 방어와 신장기능에 대한 효과를 알아보고자 Hsp70.1의 KO생쥐를 이용하여 양쪽신장을 허혈한 후 CuSOD와 MnSOD의 단백질 변화와 신장기능손상의 지표인 creatinine 농도를 분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 8주령 C57/BL6계 숫컷생쥐(mouse)를 기반으로 Hsp70.1유전자조작법으로 결손시킨 생쥐(Hsp70.1 knock-out mouse: KO)와 C57/BL6 야생형생쥐(wild type mouse: WT)을 사용하였다. KO생쥐는 gene-targeting technique 이용하여 Hsp70.1 null allele된 생쥐를 (주)마크로젠에서 구입하였다[9,23]. 모든 실험동물은 H대학 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받은 후 SPF된 실험동물실에서 사육되었다. 실험동물 WT과 KO군들은 정상군(Sham, n=8), 운동군(pre-exercise: Ex, n=8), 허혈운동군(ischemia with pre-exercise: Ex+IR, n=8), 허혈군(ischemia: IR, n=8)으로 각각 8마리씩 4그룹으로 분류하여 사용하였다.

### 전처치 운동방법

운동방법은 설치류용 treadmill을 이용하였으며, 경사 0%에서 운동적용기 1주는 20 m/min의 속도( $VO_2$  max 60-70% 해당)로 시간을 점진적으로(5-30분) 증가를 시켰으며, 본 운동은 60분씩 7일 동안 실시하였다[1,34].

### 허혈성 신장손상유도모델 제작

모든 생쥐는 Rompun (5 mg/ml), Zoletil (5 mg/ml) 그리고 생리식염수를 1:1:8 비율로 혼합한 후 0.1 ml를 복강 내 주사하여 마취시켰다. 마취가 확인된 생쥐는 복강을 절개한 다음, 조심스럽게 양쪽신장을 노출하여 혈관클램프(clamp)로 신장뿌리(pedicle)의 혈류를 결찰함으로써 허혈신장손상을 유도하였다. 허혈동안 열패드(heating ped)를 이용하여 체온을 36-38°C를 유지시켰고, 체온측정은 탐침(probe)이 부착된 디지털 체온계를 이용하여 생쥐의 직장(rectum)에 삽입하여 관찰하였다. 허혈 25분 후 클램프를 제거하여 혈류가 잘 관류되는지 육안으로 확인한 후 절개된 피부를 봉합하였다. 정상군은 허혈군과 동일한 방법으로 신장만 노출시킨 25분 후 다시 봉합하였으며 허혈관류는 시행하지 않았다[24,33].

### 혈액 및 조직채취

수술을 마친 1시간 후 생쥐의 심장에서 채혈하였고 심장을 통해 생리식염수로 관류시킨 후 신장을 적출하였다.

### 혈청 creatinine 농도 측정

혈액은 실온에 30분간 두었고, 이후 원심분리기로 옮겨 실온에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였고, 상층액인 혈청만 모아 creatinine 측정용 kit (Vitros, Johnson & Johnson, USA)를 이용하여 발색된 색을 520 nm의 흡광도에서 농도를 측정하였다.

### Western Blot

적출한 신장은 lysis 완충액과 함께 homogenizer를 이용하여 조직을 균질화 하였다. 균질액은 4°C에서 13,500× g으로 15분간 2회에 걸쳐 원심분리한 후 상층액을 Bradford [5]법에 따라 총 단백질량을 정량하였다. 정량된 단백질은 35 μg으로 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 후 PVDF membrane (Amersham Bio, UK) 으로 전이시켰다. 전이된 membrane은 TBST 완충액과 함께 5% skim milk를 첨가한 후 1시간동안 실온에서 blocking 시켰다. CuSOD와 MnSOD의 1차 항체는 1:1,000 (Chemicon, USA)으로 각각 첨가된 5% skim milk 용액을 희석한 후 4°C에서 overnight 하였다. 이어서 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체(1:5,000)를 첨가된 5% skim milk용액과 함께 희석시킨 후 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 이후 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 ECL substrate (Amersham Bio, UK)로 1분간 발색한 후 X-ray film (Kodak, NY)를 이용하여 현상하였다. 단백질농도 측정은 Gel doc 2000 (Bio Rad, ITALY)를 이용하여 농도를 정량하였으며, 정량된 단백질의 농도를 수치화하여 WT의 정상군을 기준으로 다른 그룹간의 차이를 나타내었다.

### 통계 처리

모든 실험결과에 대한 통계처리방법은 SPSS 12.0을 이용하여 CuSOD, MnSOD 단백질변화와 creatinine 변화에 대한 평균과 표준오차를 산출하였으며, 측정변인별 평균 차이 검증을 위하여 이원변량측정(two way ANOVA)을 실시하였다. 모든 통계치의 유의확률은  $p < 0.05$  로 설정하였다.

## 결 과

### CuSOD의 변화

허혈로 유도된 신장손상이 운동전처치에 따른 CuSOD 단백질 발현양상을 관찰한 결과, WT의 허혈운동군은 허혈군에 비해 높게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이가 나타나진 않았으며 정상군과 비슷한 발현양상을 보였다. 하지만 허혈군은 다른 세군에 비해 가장 낮게( $p < 0.05$ ) 발현된 것으로 관찰되

었다. 반면 Hsp70.1 KO의 허혈운동군은 허혈군에 비해 유의하게 높은( $p < 0.05$ ) 발현을 하였으나 WT보다는 약한 발현을 보여주었으며, 허혈군 역시 WT을 포함한 다른 군들에 비하여 가장 낮은 발현으로 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.01$ )가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1A, B).

MnSOD의 변화

MnSOD 단백질 발현양상을 관찰한 결과, WT의 운동군은 정상군보다 높은 발현을 하였으며 유의한 차이( $p < 0.05$ )가 있는 것으로 나타났다. 또한 허혈운동군 역시 허혈군에 비해 높은 발현양상을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

반면 Hsp70.1 KO의 운동군은 정상군과의 발현 차이가 크게 나타나지 않았다. 게다가 허혈운동군에서는 정상군보다 MnSOD가 감소( $p < 0.05$ )된 것으로 나타났지만 허혈군에 비해 뚜렷하게 높은( $p < 0.05$ ) 발현을 하였고, 허혈군은 WT을 포함한 다른 군들에 비해 통계적으로 가장 낮게( $p < 0.05$ ) 발현되었다(Fig. 1A, B).

혈청 creatinine의 변화

25분 동안 허혈 시킨 생쥐의 혈청에서 creatinine 농도는 Fig. 2에서 나타난 것처럼 WT과 Hsp70.1 KO 모두 높게 나타났으며 WT에서의 4군 모두 유의한 차이가 나타나진 않았지만 Hsp70.1 KO의 허혈군에서 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.01$ )가

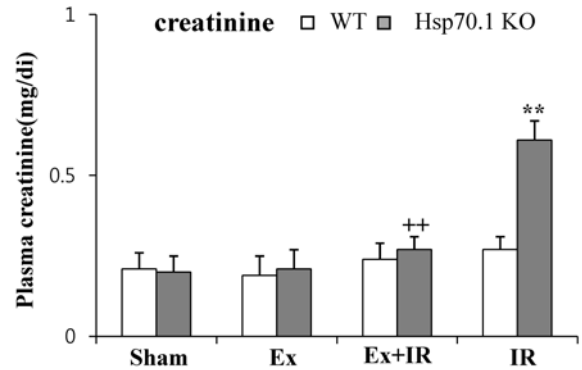


Fig. 2. The serum creatinine concentration graph. \*\* ( $p < 0.001$ ) denotes: significantly higher creatinine concentration in IR group of KO compared with Sham group. ++ ( $p < 0.001$ ) denotes: significantly lower creatinine concentration in Ex+IR group compared with Is group. Sham: Sham control, Ex: Exercise, Ex+IR: Ischemic injury with Exercise, IR: Ischemic injury.

있는 것으로 나타났다. 반면 Hsp70.1 KO군의 허혈운동군은 허혈군에 비해 낮은 creatinine 농도를 보여주었고 유의한 차이( $p < 0.01$ )가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

고 찰

실험동물을 대상으로 뇌와 심장에서 허혈전 운동처치는 매

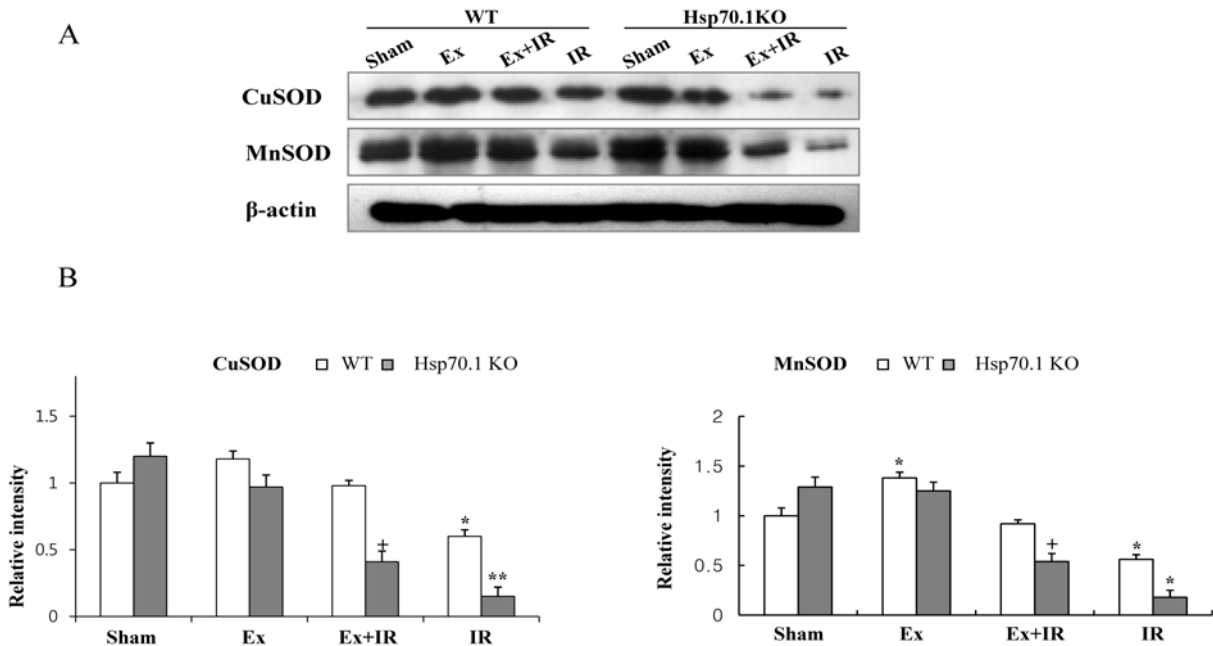


Fig. 1. Expression of CuSOD and MnSOD proteins (A) and graph (B) in kidney and statistics. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ) denotes: significantly lower CuSOD and MnSOD in IR group of WT and KO compared with Sham group. + ( $p < 0.05$ ) denotes: significantly higher CuSOD and MnSOD in Ex+IR group compared with IR group of KO. Sham: Sham control, Ex: Exercise, Ex+IR: Ischemic injury with Exercise, IR: Ischemic injury.

우 긍정적인 효과를 보여주었으며, 이러한 결과는 운동이 허혈에 따른 조직손상에 대해 예방과 치료의 가능성을 높인 것이라 할 수 있다[10,15]. 하지만 급성신부전과 같은 병태생리학적 신장질환에서 Hsp70의 발현이 신장손상으로 부터 예방치료를 증대한 영향을 미친다고 알려져 있지만, Hsp70의 결핍된 상태에서의 산화적손상에 대한 구체적인 연구결과와 운동전처치로 산화적 손상에 대한 항산화효소들의 발현결과는 여전히 전무한 실정이다. 이에 본 연구는 허혈에 따른 신장조직에서의 Hsp70의 직접적인 영향과 허혈전 운동적응으로 신장조직에서 CuSOD, MnSOD 단백질 그리고 혈청 creatinine의 농도변인을 규명하고자 Hsp70.1의 유전자를 결핍시킨 생쥐를 이용하였고, 운동전처치 후 허혈신장손상모델을 제작하였다.

그 결과 WT과 Hsp70.1 KO군의 허혈운동군에서 CuSOD와 MnSOD는 허혈군에 비해 높게 나타났으며, 유의한 차이는 Hsp70.1 KO에서만 나타났다. 혈청 creatinine 농도는 WT그룹에서 유의한 차이가 나타나진 않았지만, Hsp70.1 KO의 허혈운동군이 허혈군에 비해 유의하게 낮게 나타났다. 이러한 결과는 WT에서의 25분간 허혈재관류에 따른 신장손상에 크게 영향을 미치지 않았음을 의미한다. 반면 WT과 Hsp70.1 KO군의 허혈군에서 CuSOD와 MnSOD는 모두 낮게 발현 되었고, 특히 Hsp70.1 KO에서는 뚜렷하게 가장 약한 발현양상을 보여주었다(Fig. 1, 2). 이러한 결과는 Hsp70.1 유전자가 결핍된 상태에서는 산화적손상이 더욱 가중됨을 암시하며, 신장내 혈류장애로 인하여 생성된 ROS가 Hsp70이 결핍된 상태에서는 더욱 활성화되어 지질과산화(lipid peroxidation)를 유도하며, DNA의 손상 및 단백질의 기능장애를 초래하여 신장의 기능과 구조적 손상을 일으킨 것[6,33]으로 생각된다. 또한 허혈로 신장내 세포속에서 저장된 ATP가 고갈되면서 세포내 골격(cytoskeleton)과 세포부착 단백을 훼손시키고, 세포막과 미세소체에 있는 이온펌프의 기능장애를 만들어 막지질 분해효소(phospholipases) 및 단백분해효소들을 활성화시켜 신장을 손상시킨 것[4]으로 판단된다.

Lee 등[22]에 의하면, Hsp 70.1 유전자가 결핍된 생쥐의 뇌 허혈모델에서는 세포자멸사와 관련된 인자들이 더욱 활성화되어 뇌세포의 손상을 더 가중시킨다고 하였다. 이는 Hsp70이 단백질기능장애와 미세섬유를 안정화시킴으로써 허혈재관류에 따른 신장손상을 보호[18]하고 허혈과 관련된 지질막 분해를 감소시켜 산화적 스트레스를 경감시키는 효과[3, 35]를 가지고 있음을 암시한 결과라 사료된다. 그러므로 이것의 결핍은 조직내 산화적 스트레스를 더욱 높여 신장의 기능을 악화시킨 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 허혈에 따른 WT의 신장조직에서 CuSOD와 MnSOD의 발현차이가 유의하게 감소되진 않았지만 Hsp70.1 유전자가 결핍된 생쥐에게서는 CuSOD와 MnSOD의 발현과 활동이 억제[9]되어 산화적 스트레스 조절에 Hsp70이 직접적으로 관련되어 있음을 증명한 것이라 사료된다. 또한 사구체여과율과 직접적으로 관련된 혈청

creatinine의 농도 증가는 신장기능을 손상시키는 결과[24]이기에 Hsp70이 결핍된 상태에서는 더욱 손상되었음을 제시한 결과라 판단된다.

선행 연구에서 허혈에 따른 신장손상은 ROS를 제거하는 효소들의 활성화 혹은 이를 제거하는 치료약물을 투여함으로써 신장보호에 대해 긍정적인 연구결과들을 제시하였다[7,22]. Kim 등[22]의 보고에 의하면, 허혈후 증가된 산화적 스트레스가 MnSOD의 활성화와 발현으로 산화적스트레스를 감소시켰다고 하였다. 뿐만 아니라 신장에서의 CuSOD와 MnSOD의 활성화는 허혈후 재관류 되면서 생성된 free radical과 ROS를 제거시키는 효소로서 지질과산화와 과산화수소단계를 떨어뜨리고[33] 세포죽음을 감소[8]시키는데 효과가 나타났음을 밝힘으로써 이들 효소들의 활성화방안은 신장손상 예방 및 치료의 가능성을 높인 결과라 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 허혈 전 운동처치로 CuSOD와 MnSOD의 발현차이를 살펴본 결과 KO그룹에서 허혈군에 비해 CuSOD와 MnSOD의 증가하였고, 혈청 creatinine의 농도는 감소되었다(Fig. 1, 2). 이러한 결과는 운동으로 인하여 미토콘드리아내 호흡비율을 증가시킴으로써(ATP 대사증가) 산소의 소비량이 높아지게 되며, 이때 여러 부산물들은 체내 항산화 효소들을 활성화시켜 산소독성으로부터 방어체계를 형성[30]한 것으로 사료된다. 또한 운동은 혈관 내피세포에서 nitro oxide를 방출하여 혈관을 확장시키고, 조직내 항산화 효소의 발현을 증가시켜 DNA손상을 막는다. 게다가 운동은 움직임에 따른 체온 증가와 free radical 생성으로 항상성을 유지하기 위해서 Hsp family의 발현을 증가시키며, 이러한 결과는 산화적 손상으로부터 조직손상을 예방[12,16,36]시키는 효과가 있음을 보여준 결과라 할 수 있다. Hsp70 유전자가 결핍된 상태에서의 스트레스는 조직내 Bcl-2와 같은 항세포자멸인자의 발현을 감소시키지만 운동은 오히려 Bcl-2의 발현을 증가시켜 세포자멸사로부터 세포들을 보호한다[22].

Akita 등[1]에 의하면, 60~70% 최대산소섭취량에 해당되는 운동트레이닝은 GSH/ GSScT를 감소시키고, eNOS의 발현을 증가시켜 조직손상으로 부터 보호할 수 있다고 하였고, 매일 규칙적인 운동은 강력한 preconditioning 효과를 제공할 수 있음을 입증하였다.

Ding 등[10]은 뇌허혈모델 쥐를 대상으로 유산소 운동전처치를 시행하였으며, 그 결과 뇌에서 TNF-alpha I과 II의 발현이 억제되어 허혈성 뇌손상으로 부터 보호되었음을 보고하였다. Domenech [11]의 연구에서도 운동전처치로 인하여 심장근육의 경색부위가 크게 줄어들었음을 입증하여 심혈관질환과 관련된 심장손상에서 심장보호효과를 규명하였고, Ji [19]는 운동이 여러 조직에서 항산화효소의 활동을 자극시킬 수 있다고 하였으며, 이는 운동에 의한 산화적스트레스를 제어하기 위해 조직내에서 빠르게 SOD를 많이 만들어 조직을 보호한 것이라 하였다.

그러므로 Hsp70의 결핍된 상태에서 허혈에 따른 신장기능은 더욱 손상되지만, 운동처치는 신장내 CuSOD와 MnSOD의 발현을 활성화시켰고 혈청 creatinine의 농도를 감소시켰음을 알 수 있었다. 따라서 운동은 Hsp70이 결핍된 상태에서도 신장기능손상에 대한 방어효과에 긍정적으로 사용될 수 있음을 규명한 결과라 사료된다. 그러나 Hsp70의 결핍에 따라 CuSOD와 MnSOD의 활성 및 creatinine의 감소효과는 운동에 의해 나타났다 하더라도 세포자멸사의 변화로 세포손상에 직접적인 영향을 규명하지 못한 한계점이 있기에 신장손상에 대한 치료예방을 보다 확실히 밝혀내기 위해서는 apoptosis 관련인자들의 변인에 대해 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2008년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-328-2008-2-E00528).

### References

- Akita, Y., H. Otani, S. Matsuhisa, S. Kyoji, C. Enoki, R. Hattori, H. Imamura, H. Kamihata, Y. Kimura, and T. Iwasaka. 2007. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2051-2059.
- Alexandra, K., M. Adams, and M. Thomas. 2002. The role of antioxidants in exercise and disease prevention; *The physician & sports medicine* **1**, 30.
- Beck, F. X., W. Neuhofer, and E. Muller. 2000. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am. J. Physiol. Renal.* **279**, F203-215.
- Brady, H. R., M. R. Clarkson, and W. Lieberthal. 2004. Acute renal failure : Brenner & Rector's The kidney. Seventh ed. W. B. Saunders Company.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**, 248-254.
- Chen, S. W., M. Kim, M. Kim, J. H. Song, S. W. Park, D. Wells, K. Brown, J. Belleruche, V. D. D'Agati, and H. T. Lee. 2009. Mice that overexpress human heat shock protein 27 have increased renal injury following ischemia reperfusion. *Kidney Int.* **75**, 499-510.
- Chen, S. W., B. Siu, Y. S. Ho, R. Vincent, C. C. Chua, R. C. Hamdy, and B. H. Chua. 1998. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 2281-2289.
- Chien, C. T., P. H. Lee, C. F. Chen, M. C. Ma, M. K. Lai, and S. M. Hsu. 2001. De novo demonstration and co-localization of free radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 973-982.
- Choi, S., K. A. Park, H. J. Lee, M. S. Park, J. H. Lee, K. C. Park, M. Kim, S. H. Lee, J. S. Seo, and B. W. Yoon. 2005. Expression of Cu/Zn SOD protein is suppressed in hsp 70.1 knockout mice. *J. Biochem. Mol. Bio.* **38**, 111-114.
- Ding, Y. H., M. Mrizek, Q. Lai, Y. Wu, R. Jr Reyes, J. Li, W. W. Davis, and Y. Ding. 2006. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF- $\alpha$  receptor expression after hypoxia/ reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Curr. Neurovasc. Res.* **3**, 263-271.
- Domenech, R. J. 2006. Precondition. A new concept about the benefit of exercise. *Circulation.* **113**, e1-e3.
- Fehrenbach, E. and H. Northoff. 2001. Free radical, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.* **7**, 66-89.
- Fujimura, M., Y. Morita-Fujimura, K. Murakami, M. Kawase, and P. H. Chan. 1998. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. blood flow. metab.* **18**, 1239-1247.
- Georgopoulos, C. and W. J. Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634.
- Hartmann, S. and P. Bung. 1999. Physical exercise during pregnancy-physiological considerations and recommendations. *J. Perinat. Med.* **27**, 204-215.
- Husain, K. and S. R. Hazelrigg. 2002. Oxidative injury due to chronic oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochem. Biophys. Acta.* **1587**, 75-82.
- Hunt, C. and S. Calderwood. 1990. Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene* **87**, 199-204.
- Huot, J., F. Houle, D. R. Spitz, and J. Landry. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* **56**, 273-279.
- Ji, L. 1993. Antioxidant enzyme responses to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**, 225-231.
- Jones, D. R. and H. T. Lee. 2007. Protecting the kidney during critical illness. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **20**, 106-112.
- Kim, J., I. S. Kil, Y. M. Seok, E. S. Yang, D. K. Kim, D. G. Lim, J. W. Park, J. V. Bonventre, and K. M. Park. 2006. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **281**, 20349-20359.
- Lee, J., W. K. Kim, and C. S. Shim. 2008. Effects of exercise on Hsp70 Knock-out mice fetuses exposed to maternal hyperthermia. *Kor. J. Spo. Sci.* **19**, 34-43.
- Lee, S. H., M. Kim, B. W. Yoon, Y. J. Kim, S. J. Ma, J. K. Roh, J. S. Lee, and J. S. Seo. 2001. Targeted Hsp 70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* **32**, 2905-2912.
- Ling, H., C. Edelstein, P. Gengaro, X. Meng, S. Lucia, M. Knotek, A. Wangsiripaisan, Y. Shi, and R. Schrier. 1999. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am. J. Physiol.*

- 277, F383-390.
25. Locke, M. and E. G. Noble. 1995. Stress proteins: the exercise response. *Canadian. J. Appl. Physiol.* **20**, 155-167.
  26. Lowe, D. G. and L. A. Moran. 1986. Molecular cloning and analysis of DNA complementary to three mouse Mr=68,000 heat shock protein mRNAs. *J. Biol. Chem.* **261**, 2102-2112.
  27. Marber, M. S., R. Mestril, S. H. Chi, M. R. Sayen, D. M. Yellon, and W. H. Dillmann. 1995. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* **95**, 1446-1456.
  28. Moran, M., J. Delgado, B. Gonzalez, R. Manso, and A. Megias. 2004. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta. Physiol. Scand.* **180**, 157-166.
  29. Pokly, A. G. 2001. Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection. *Transplantation* **71**, 1503-1507.
  30. Powers, S. K., D. Criswell, J. Lawler, D. Martin, F. K. Lieu, L. L. Ji, and R. A. Herb. 1993. Rigorous exercise training increase superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* **265**, 2094-2098.
  31. Powers, S. K., H. Demirel, J. S. Coombes, H. Naito, K. L. Hamilton, R. H. Shanely, and J. Jessup. 1998. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.* **275**, R1468-1477.
  32. Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestril, W. Dillmann, P. R. Weinstein, and F. R. Sharp. 2000. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann. Neurol.* **47**, 782-791.
  33. Seok, Y. M., J. Kim, K. C. Choi, C. H. Yoon, Y. C. Boo, Y. Park, and K. M. Park. 2007. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney ischemia/reperfusion injury in mice. A role for antioxidant enzymes and heat-shock proteins. *J. Ethnopharmacol.* **112**, 333-340.
  34. Schefer, V. and M. I. Talan. 1996. Oxygen consumption in adult and aged c57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp. Gerontol.* **31**, 387-392.
  35. Snoeckx, L. H., R. N. Cornelussen, F. A. Van Nieuwenhoven, R. S. Van Der. Reneman, and G. J. Vusse. 2001. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.* **81**, 1461-1497.
  36. van Ginneken, M. M., E. de Graaf-Roelfsema, H. A. Keizer, K. G. van Dam, I. D. Wijnberg, J. H. van der Kolk, and E. van Breda. 2006. Effect of exercise on activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, c-Jun NH2 terminal kinase, and heat shock protein 27 in equine skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.* **67**, 837-844.

초록 : Hsp70.1 유전자결핍된 마우스에서 허혈 재관류 심장손상에 대한 전처치 운동의 보호효과

이진 · 김원규\*

한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실

이 연구는 Hsp70.1 유전자가 결핍된 생쥐를 이용하여 운동전처치에 따른 신장허혈재관류손상에서 혈청 크레아티닌, 신장에서 CuSOD와 MnSOD의 발현변화를 관찰하는데 그 목적을 두고 있다. 실험동물은 c57/BL6 계 수컷(wild type: WT)과 Hsp70.1 knockout (KO) 생쥐를 정상대조군(n=8), 운동군(n=8), 허혈운동군(n=8) 및 허혈군(n=8)의 4군으로 분류하여 이용하였다. 실험종료 후 마취를 한 후 혈청 creatinine을 분석하기 위해서 신장에서 혈액을 추출하였고, 신장을 적출하여 western blot 으로 eCuSOD와 MnSOD 발현변화를 비교하였다. KO 허혈군에서의 CuSOD, MnSOD는 다른 군에 비해 유의하게 낮게(p<0.001, p<0.05) 발현하였으며, creatinine은 높은(p<0.001)농도로 나타났다. 반면 WT에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. 흥미롭게도 KO허혈운동군에서의 CuSOD, MnSOD는 허혈군보다 뚜렷하게 증가하였으며, creatinine은 허혈군에 비해 현저히 감소(p<0.01)하였다. 이상의 결과를 종합하면 Hsp70은 신장허혈재관류손상에 직접적인 관련이 있음을 추정할 수 있다. 따라서 운동전처치는 허혈성신장기능저하에 예방할 수 있다고 생각된다.