

# Kainate 유발 간질모델에서 Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease의 빠른 소실과 이에 따른 세포고사

신하영 · 이두재 · 조경주 · 김미애 · 이용현 · 허 경 · 김경환 · 이병인

연세대학교 의과대학 신경과학교실

## Rapid Loss of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease and Subsequent Apoptosis in Kainate-Induced Seizure Model

Ha Young Shin, M.D., Doo Jae Lee, Ph.D., Kyuong Joo Cho, M.S.,  
Mi Ae Kim, M.D., Yong Hyun Lee, B.S., Kyoung Heo, M.D., Ph.D.,  
Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D. and Byung In Lee, M.D.

Department of Neurology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

**Purpose** : The DNA repair enzyme, apurinic/aprimidinic endonuclease (APE) plays a role in base excision repair pathway involved in repairing apurinic/aprimidinic (AP) site after oxidative stress. To reveal the relationship between APE and neuronal apoptosis associated with oxidative stress after kainate treatment, the temporal change of APE expression was investigated in kainate-induced seizure model.

**Methods** : Status epilepticus was induced by unilateral intrahippocampal injection of kainate. Superoxide anion radical production and DNA oxidation were evaluated by in situ detection of oxidized hydroethidine and 8-hydroxyguanine (8-OHG) immunoreactivity. APE expression was examined by Western blot and immunohistochemical analysis. DNA fragmentation was visualized with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) staining.

**Results** : Cell loss occurred at 24 hr in CA1, CA2, and CA3 after kainate-injection. 8-OHG immunoreactivity and oxidized hydroethi-

dine were increased comparing with control after kainate-injection. APE immunoreactivity was decreased 4 and 24 hours in the hippocampus after kainate-injection. TUNEL-positive cells were observed 24 hours but not 4 hours in hippocampus after kainate-injection. In double labeling with APE and TUNEL, TUNEL-positive cells did not show APE immunoreactivity. These data showed that cellular oxidative stress was increased, thereby APE was decreased in the hippocampus after kainate-injection. Also, it was shown that the reduction of APE preceded DNA fragmentation.

**Conclusion** : This study suggests that rapid loss of APE may produce the failure of DNA repair-machinery and then induce neuronal apoptosis following kainate-injection. (J Korean Epilep Soc 2004;8(2):108-115)

**KEY WORDS** : Kainate · Epilepsy · 8-hydroxyguanine · APE · Apoptosis.

## 서 론

Apurinic/aprimidinic endonuclease(APE)는 다기능 단백질로서, 손상된 DNA의 복구에 관여하며 Fos, Jun,

Received 20 October 2004

Accepted 18 November 2004

**Corresponding author:** Byung In Lee, M.D., Department of Neurology, Yonsei University, College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

E-Mail: bilee@yumc.yonsei.ac.kr

This work was supported by a grant from the Korea Health Industry Development Institute (02-PJ1-PG3-21301-0019).

NF- $\kappa$ B 등 몇몇 전사인자(transcription factor)의 DNA 결합을 조절하기도 한다.<sup>1</sup> 이 단백질은 산화적 스트레스에 의해 흔하게 생기는 DNA 손상인 apurinic/aprimidinic (AP) sites를 복구하는 base excision repair(BER)에서 중요한 역할을 한다.<sup>2</sup> 여러 이유로 DNA 염기(Base)에 손상이 일어나 변형되면, DNA glycosylase에 의해 이 손상 받은 염기가 잘려나간다. 그 결과 염기가 빠지고 DNA 골격을 이루는 sugar phosphate만 남게 되어 AP sites가 형성된다. APE은 바로 이 AP site에서 sugar phosphate 골격을 잘라내는 단계에 작용을 한다. 이 과정 이후에 DNA 중합효소(DNA polymerase)와 DNA 연결효

소(DNA ligase)가 작용하여 DNA 손상을 복구할 수 있게 된다.<sup>1</sup> 최근 논문에 의하면 일정 수준까지는 반응성 산소종(reactive oxygen species)이 증가함에 따라 APE의 발현이 증가한다고 한다.<sup>3</sup> 또한, 뇌허혈과 외상성 뇌 손상 동물 모델에서 DNA 분절현상(fragmentation)이 일어나기 전에 APE 발현의 감소가 일어난다고 보고 되고 있다.<sup>4-7</sup> 따라서, 뇌 손상 이후 APE와 같은 DNA 복구 효소가 소실될 경우, 반응성 산소종에 의해 생성되는 DNA 손상을 복구하는 세포 능력이 저하되고, 이러한 과정이 세포고사(apoptosis)의 기전과 관련이 있을 것으로 추측되고 있다.

Kainate는 흥분성 아미노산으로 kainate receptor를 활성화시켜 신경 세포의 탈분극을 유발시키며 결과적으로 흥분성 신경세포 손상이 일어나게 된다. 설치류에 kainate를 투여할 경우 간질을 유발시킬 수 있으며, 이때 주로 변연계에 신경 손상이 동반된다.<sup>8-10</sup> 실험 동물에 kainate 투여 이후 지속되는 발작에 의해서 세포고사와 같은 세포 죽음(cell death)이 나타나는 것은 최근에 잘 알려진 사실이다.<sup>11</sup> Liang 등은 흰쥐에 kainate를 투여한 실험에서 해마 부위의 세포고사가 일어나기 전에 미토콘드리아에서 반응성 산소종이 증가하고, 산화적 DNA 손상이 늘어난다는 사실을 증명하였다.<sup>12</sup> 따라서, kainate 투여에 의해 반응성 산소종이 증가되고, 반응성 산소종의 증가가 DNA 복구 단백질의 변화 및 세포고사 유발에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 그러나 아직까지 kainate 유발 간질 모델에서 DNA 복구 단백질인 APE에 대한 연구가 이루어지지 않았다. 따라서 본 실험에서는 kainate 투여에 의한 간질모델에서 간질중첩발작 후 해마에서 APE 발현의 변화 및 이에 따르는 세포고사를 살펴보기 위하여 연구를 수행하였다.

## 대상과 방법

### Kainate 유발 간질모델

모든 동물들은 연세대학교 의과대학 동물 실험 윤리위원회의 지침에 따라 실험에 사용되었다. 3개월 된 35~40 g 수컷 ICR 마우스를 이용하였다. 한 우리(cage) 당 5마리씩 사육되었고, 실내온도는  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지되었으며, 12시간 간격으로 낮과 밤의 주기를 두었다. 그리고 물과 먹이는 자유롭게 접근하도록 하였다. 실험 동물들을 2.5% isoflurane과 질소와 산소 혼합 기체(70%/30%)로 마취시켰다. 수술 도중 가열 받침(heating pad)와 가열 전등(heating lamp)으로 정상 체온을 유지시켰다. 동물의 머리를 정위 장치(stereotaxic frame)에 고정시킨 후, 두피의 정

중선을 절개하여 두개골을 노출시킨 다음, bregma의 위치를 확인하였다. 우측 해마 위치(anteroposterior(AP) = -2.0 mm ; mediolateral(ML) = -1.7 mm ; and dorsoventral(DV) = -1.8 mm)에 32 gauge의 가는 관을 통하여 kainate(0.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  in 0.9% saline)를 5분에 걸쳐 투여했다. 주사 바늘 제거 후 나타날 수 있는 kainate의 역류를 막기 위하여 kainate 투여 후 주사 바늘을 5분간 더 그 자리에 위치시켰다. 마취에서 풀린 뒤, 실험에 쓰인 모든 쥐에서 간질중첩증이 나타났다. 이를 중단시키기 위하여 kainate 처치 30분 뒤에 diazepam(2.5 ml/kg)을 복강내로 주사하였다.

### 크레질 바이올렛(cresyl violet) 염색

조직 절편을 2~3시간 이상 건조시킨 후 자일렌에 3분간 2번 담가두었다. 그 뒤 100%, 90%, 70% 에탄올에 차례대로 1분 30초 씩 담근 후 증류수에 3분간 2번 담가 흡수과정을 거쳤다. 흡수과정을 마치고 절편을 크레질 바이올렛(cresyl violet, Sigma, USA) 염색액에 8분간 담가두었고, 이후 탈수과정으로 증류수와 70%, 90%, 100% 에탄올에 순서대로 넣었다가 자일렌으로 세척 후 퍼마운트(Permount ; Fisher Scientific, USA)로 봉입하여 커버글라스를 덮어 광학 현미경으로 관찰하였다.

### Kainate 유발 간질모델에서의 뇌파 검사

뇌파 검사를 하기 위해서 kainate 투여 후 정위 장치를 이용하여 해마부위에 전극을 삽입하고, 마취가 깨었을 때부터 지속적으로 뇌파기계(Comet Portable EEG ; Grass-telefactor, USA)에 연결하여 행동 변화와 뇌파 변화를 관찰하였다. 뇌파는 배경 뇌파(background activity)와는 전혀 다른 극파가 3초 이상 지속적으로 나오는 경우를 간질의 발작기 뇌파로 간주하였으며, 행동 변화가 동반된 경우를 ictal electroencephalography(EEG) 그리고 행동 변화 없이 뇌파의 변화만이 있는 경우를 subclinical ictal EEG로 분류하여 분석하였다.

### 산소 음이온 라디칼(superoxide anion radical, $\text{O}_2^-$ ) 검출

반응성 산소종의 일종인 산소 음이온 라디칼( $\text{O}_2^-$ )을 찾아내기 위하여 예전에 기술되었던 *in situ* detection of oxidized hydroethidine(HEt) 방법을 수정하여 이용하였다.<sup>15</sup> Dihydroethidium(Molecular Probes, USA)을 dimethylsulfoxide에 용해시켜 500 mg/ml 농도의 용액을 만들고 이것을 다시 phosphate buffer saline(PBS)에 1 mg/ml로 희석시켰다. 이때 발생된 침전물을 녹이기 위하여 초음

파로 분쇄하였다. 이 용액 200  $\mu$ l를 kainate 처치 3시간 뒤에 정맥으로 주사하였고, 1시간 뒤 동물을 희생시키고, 10 U/ml heparin이 들어있는 0.9% saline과 3.7% formaldehyde를 심장을 통하여 관류시키고, 뇌를 적출하여 3.7% formaldehyde에 고정하였다. 고정된 뇌를 vibratome을 이용하여 50  $\mu$ m의 두께로 잘라내어 형광현미경으로 관찰하였다. 또 일부 절편은 암실에서 세포핵을 염색하는 Hoechst 33258 ( $2.5 \times 10^{-3}$  mg/ml in PBS)에 15분간 반응시킨 후 증류수로 세척하고 Aquamount (ThermoShandon, USA)로 봉입하여 커버글라스를 덮었고 이 절편을 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

### 산화적 DNA 손상 검출

Kainate에 의한 발작 후, 해마에서 반응성 산소종에 의해 나타나는 DNA 손상을 규명하기 위하여 이전에 보고된 방법에 따라 8-hydroxyguanine (8-OHG)에 대한 항체를 이용하여 산화된 DNA를 확인하였다.<sup>13</sup> 뇌 조직을 적출 후 잘게 부순 드라이 아이스 속에서 급냉시키고, 동결 절편기를 이용하여 20  $\mu$ m 두께로 절편을 만들고 슬라이드 글라스에 올려놓은 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 이 슬라이드를 꺼내어 실온에서 1시간 이상 건조 시킨 뒤  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 70% ethanol에 10분간 담가두었다. 그 후 PBS로 5분간 3번 세척하였다. DNase-free RNase (Roche, USA)를 PBS로 희석하여 한 슬라이드 당 5  $\mu$ g 씩 가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에 한 시간동안 반응시킨 후 4N HCl로 7분간 변성 과정을 거쳤고, 50 mM Tris-base로 7분간 중화 시켰다. 그 후 1% BSA가 포함되어있는 PBS로 5분간 3차례 세척하였고, DAKO kit (DAKO ARK kit, USA) 안에 있는 peroxidase block을 가하여 5분간 배양시켰다. 다시 5분간 3차례 1% BSA가 포함되어있는 PBS로 세척을 하였고, 8-OHG에 대한 항체 (1 : 300 ; QED bioscience, USA)와 biotin 용액을 가하여 실온에서 15분간 배양한 후, 1% BSA가 포함되어있는 PBS로 세척하였다. 여기에 이차항체를 15분간 반응시켰고, 1% BSA가 포함되어있는 PBS로 세척 후 diaminobenzidine으로 염색한 후에 세포핵을 염색하는 methyl green으로 다시 염색하였다.

### APE 면역조직화학염색검사

Urethane으로 마취하고, heparinized 0.9% saline과 3.7% formaldehyde로 관류하고, formalin으로 고정 후, vibratome을 이용하여 50  $\mu$ m 두께로 뇌 절편을 만들었다. 이 절편을 Kim 등<sup>13</sup>이 사용한 방법과 같이 blocking solution에 넣어 incubation하였고 anti-APE polyclonal

antibody (Novus Biologicals, USA)를 1 : 200으로 희석하여 반응시켰다. 그 후 avidin-biotin-peroxidase complex 방법을 이용하여 면역조직화학검사를 시행하였다. 그리고 methyl green으로 세포핵을 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

### DNA 분절현상(fragmentation) 검출

위와 같은 방법으로 고정하고 두께를 30  $\mu$ m로 만든 조직 절편에서 DNA 분절현상을 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL)을 시행하였다. 이 염색은 이전에 기술되었던 방법에 따라 진행되었다.<sup>13</sup> 절편을 0.3% Triton X-100가 있는 PBS에서 30분간 incubation한다. PBS로 세척한 후, 2.5 mmol/l의 cobalt chloride와 200 mmol/l의 potassium cacodylate가 들어있는 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 완충액 (pH 7.2) (Boehringer Mannheim, USA)에서 15분간 놓아두었다. 300 U/ml TdT (GibcoBRL, USA)와 TdT 완충액으로 40  $\mu$ mol/l로 희석된 biotinylated 14-dATP (GibcoBRL, USA)로  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응 시켰다. 150 mmol/l의 NaCl, 15 mmol/l sodium citrate와 2% bovine serum albumin이 포함되어있는 PBS (pH 7.4)로 15분간 두 차례 세척하고, VECTASTAIN Elite ABC Kit를 이용하여 30분간 반응시켰다. 그 후 0.175 mol/l sodium acetate로 세척하고 diaminobenzidine (0.25 g/l)와 nichel chloride (10 g/l)로 염색했다. 이 절편들은 농도가 70%에서 100%로 올라가는 ethanol로 탈수시키고, 자일렌에 담근 뒤, Permount로 봉입하여 커버글라스를 덮었다.

### APE 단백질검사(Western blot)

Kainate 주입 후 각각 0 hr, 1 hr, 4 hr, 24 hr에 해마에서 dentate gyrus를 잘라내고 나머지 해마부위를 적출하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관한 후 사용하였다. 각 조직을 10배 용량의 lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)로 homogenize하고  $4^{\circ}\text{C}$ , 8,000 g에서 20분 동안 원심 분리한 후 상층액을 분리하여 사용하였다. 분리한 단백질을 Bradford 법으로 정량하고 단백질 10  $\mu$ g을 10% SDS-PAGE에서 전기영동한 후, PVDF membrane으로 옮겼다. 이 membrane을 PBS-0.1% Tween 20으로 세척하고 5% skim milk로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간 이상 blocking하였다. 1차 항체는 1 : 200으로 희석한 anti-APE polyclonal antibody (santa cruz biotech-

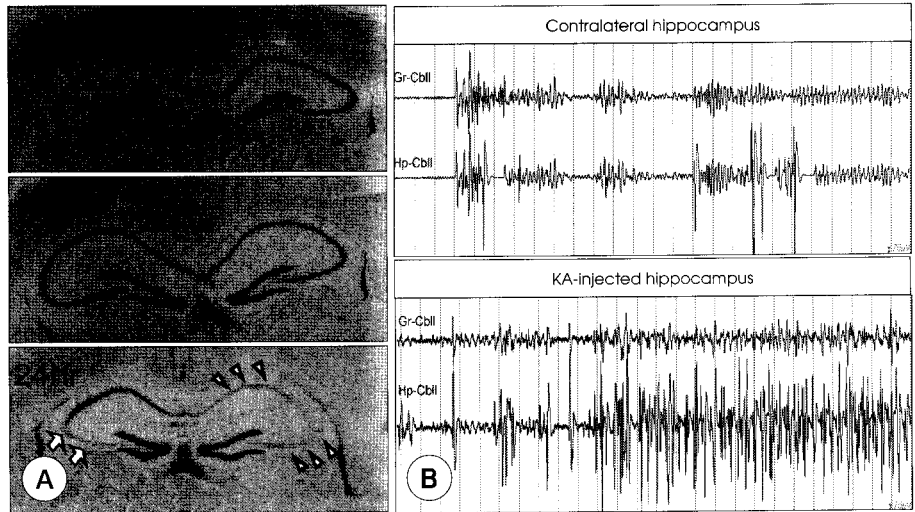
nology, USA)을 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각각의 horseradish peroxidase-linked secondary 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰고, ECL Plus kit (Amersham Life Sciences, USA)를 이용하여 필름에 감광시켜 검출하였다. 이 필름을 LAS 1000(Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였고, TINA 2.0 소프트

웨어(Raytest Isotopenmeßgerate GmbH, Germany)를 사용하여 정량 하였다.

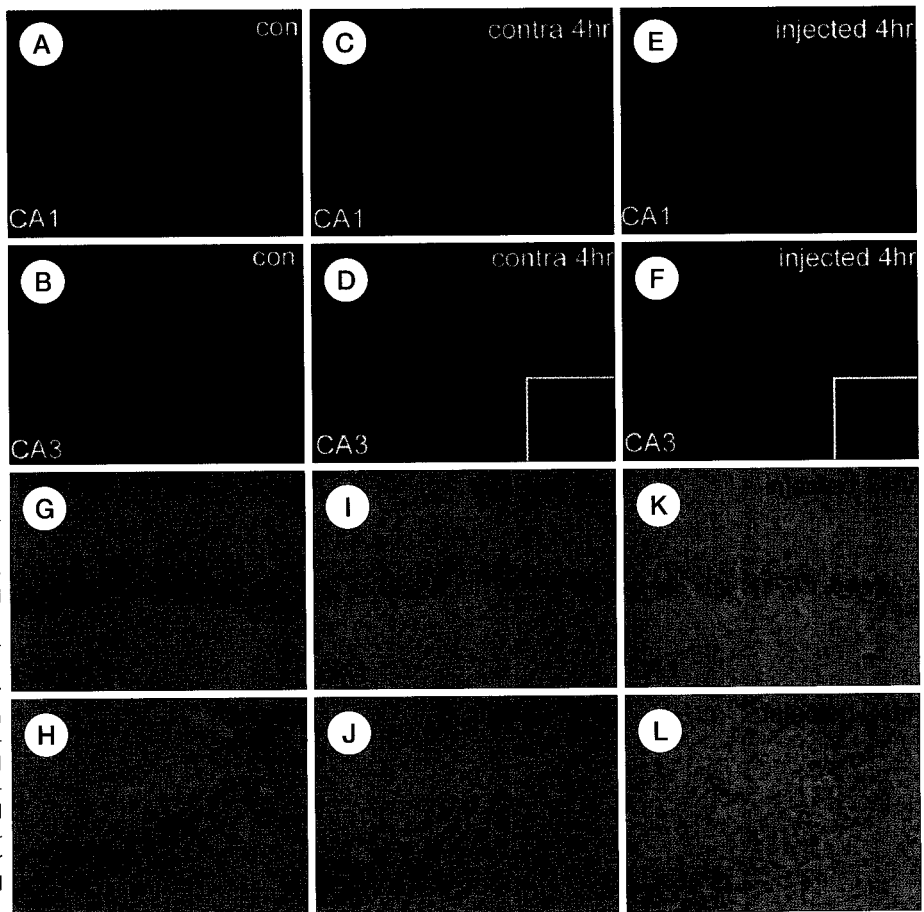
**통계 처리**

자료 분석도구로 StatView (Version 5.0.1, SAS Institute, USA)를 사용하였다. Western blot에서 얻은 정량

**Figure 1.** Cresyl violet staining and EEG recording after kainate treatment. A : Histological change did not occur in the hippocampus 4 hr after kainate injection. However, cell loss was appeared in CA1, CA2, and CA3 of the kainite-injected hippocampus (arrow) 24 hr after kainate injection (original magnification  $\times 40$ ). B : Depth EEG recording during status epilepticus induced by kainate. EEG recording showed continuous epileptiform discharges in the injected hippocampus and intermittent epileptiform discharges in contralateral hippocampus (Gr, ground; Hp, hippocampus).



**Figure 2.** Oxidative stress in hippocampus after kainate treatment. Superoxide anion radical production was visualized by the oxidized HET signals (the oxidized HET signal indicates red ; A-F, original magnification  $\times 400$ ). After kainate treatment, there was a significant increase of oxidized HET signals in injected (E, F) hippocampus compared with the control (A, B) and contralateral hippocampus (C, D). Inserts in D and F showed red granular pattern of oxidized HET signals, which located in the perinuclear area (nucleus indicates blue) in the contralateral and injected hippocampus respectively (original magnification  $\times 1000$ ). The oxidative DNA lesions were detected by anti-8-OHG antibody in the injected hippocampus 4 and 24 hr after kainate injection (I-L, original magnification  $\times 400$ ).



값을 상대적인 단백질량(relative protein level)으로 전환해 주었으며, ANOVA(*Post Hoc Test*)를 이용하여 통계 처리하였고,  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

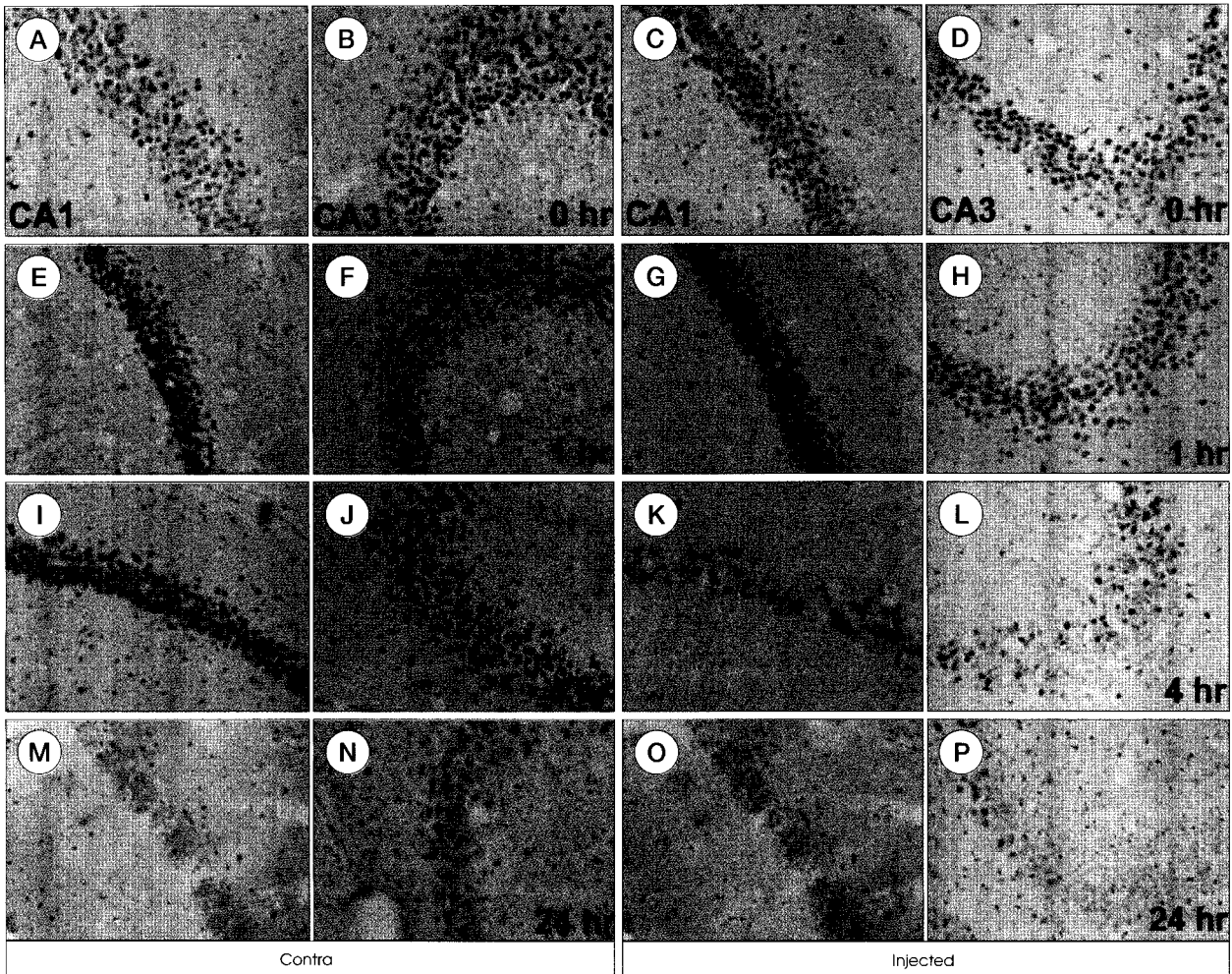
### 해마 손상의 조직학적 분석

Fig. 1A에서 보듯이 kainate 주입 후 4시간에 시행한 Cresyl violet 염색 결과는 정상군의 결과와 비교할 때 큰 변화가 관찰되지 않았다. 즉 4시간째 절편에서는 해마 부위의 세포 형태가 유지되었다. 하지만 kainate를 주입하고 24시간 뒤에는 kainate가 주입된 쪽의 해마에서는 dentate gyrus를 제외한 CA1, CA2, 그리고 CA3 모든 부위에서 신경세포 니슬소체의 염색 정도가 현저히 줄어들었

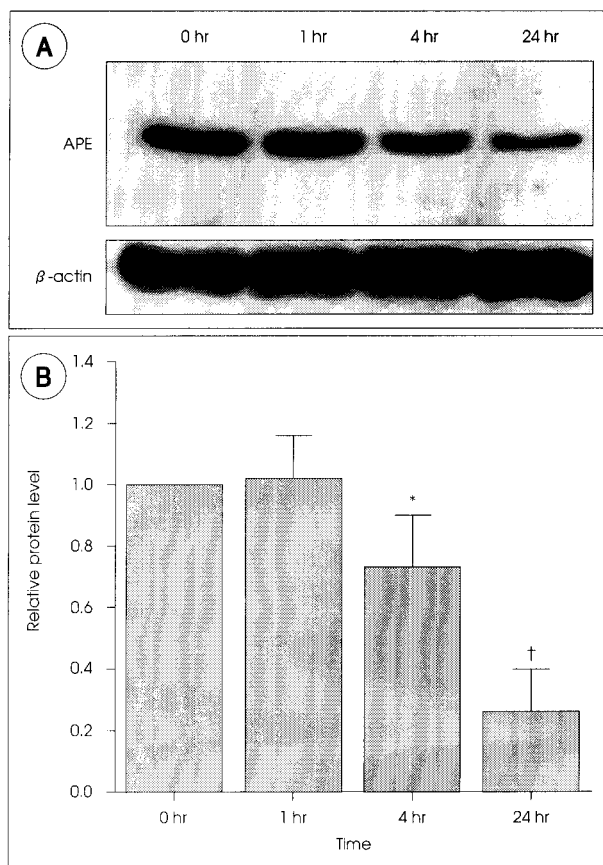
다. 또한 kainate 주입 반대편 해마에서도 CA3에서 니슬소체 염색이 약하였다. 또한 kainate 주입 후, 간질 중첩 현상이 나타나는 것을 확인하기 위해서 뇌파를 분석하였다. 심부 뇌파(Depth EEG)을 관찰한 결과, kainate를 주입한 해마(KA-injected hippocampus)에서는 연속적인 간질형 방전이 관찰되었고, 반대편 해마(contralateral hippocampus)에서도 간헐적 간질형 방전이 나타났다(Fig. 1B).

### 산소 음이온 라디칼 생성 및 산화적 DNA 손상 분석

산화된 hydroethidine 확인 검사와 8-OHG 번역조직 화학 검사를 각각 시행하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인하였다. 산소 음이온 라디칼 생성 정도와 그 위치를 확인하기 위하여 kainate 처치 3시간 뒤 hydroethidine를 주입하였고 1시간 뒤 검사 결과, 정상군(Fig. 2A,



**Figure 3.** Immunohistochemistry of APE. APE immunoreactivity was not changed in KA-injected hippocampus compared with control 1 hr after kainate treatment (G, H). But APE immunoreactivity was significantly decreased in KA-injected hippocampus 4 hr after kainate injection (K, L). APE immunoreactivity was further decreased in KA-injected hippocampus at 24 hr after kainate injection (O, P). APE immunoreactivity was also decreased in contralateral CA1 and CA3 24 hr after kainate treatment (M-N, original magnification  $\times 400$ ).



**Figure 4.** Western blot analysis of APE after kainate treatment. APE expression was shown as 37-kDa and was significantly decreased in the kainate-injected hippocampus 4 hr and 24 hr after kainate treatment (ANOVA, \* $p < 0.05$ , † $p < 0.01$ ).

B)에 비하여 kainate 주입 반대측 해마(Fig. 2C, D)와 kainate 주입한 해마 전반에 걸쳐 ethidine의 붉은 형광 빛이 더 강하였다(Fig. 2E, F). 특히 kainate 주입한 쪽의 해마에서 현저히 강하였고, 해마 부위 중에서도 CA1과 CA3에서 그 증가가 현저하였다(Fig. 2C, G). 또한 Hoechst을 같이 염색 하였을 때 산소 음이온 라디칼의 생성이 세포핵 주변에서 강하게 염색되었다(Fig. 2F, 삽입된 그림). 또한, 8-OHG에 대한 항체를 이용하여 산화적 DNA 손상을 검출하였다. 정상군(Fig. 2G, H)에 비하여, kainate 주입 후 4시간째 해마 CA1과 CA3의 세포핵에 8-OHG 항체의 면역반응이 증가되었다(Fig. 2I, J). Kainate 주입 후, 24시간째 해마에서는 4시간째 보다 8-OHG 항체의 면역반응이 현저히 증가되었다(Fig. 2K, L).

**APE 면역조직화학염색분석**

정상군에서 APE에 대한 면역조직화학염색을 시행하였을 때, APE는 주로 세포핵에 염색되었다(Fig. 3A-D). Kainate 주입 1시간 후 반대쪽 해마 CA1과 CA3에서

APE에 대한 염색이 정상군에 비하여 약간 증가하였고(Fig. 3E, F), kainate 주입한 해마 CA1에서 APE에 대한 염색이 약간 증가하였지만(Fig. 3G), CA3에서는 대조군에 비하여 변화가 없었다(Fig. 3H). 하지만 kainate 주입 4시간 후 반대쪽 해마 CA1과 CA3에서는 1시간에 비해 APE염색의 변화가 없었고(Fig. 3I, J), kainate 주입한 쪽 해마 CA1과 CA3에서 1시간에 비해 APE 염색이 현저하게 감소하였다(Fig. 3K, L). 24시간 뒤에는 APE 염색의 감소가 더욱 진행되어 kainate 주입 반대쪽 해마 CA3에서 APE 염색의 정도가 감소하였고(Fig. 3M, N), 특히, kainate 주입한 쪽의 해마 CA1과 CA3 부분에 APE 염색이 거의 보이지 않았다(Fig. 3O, P).

**APE 단백질검사 분석(Western blot)**

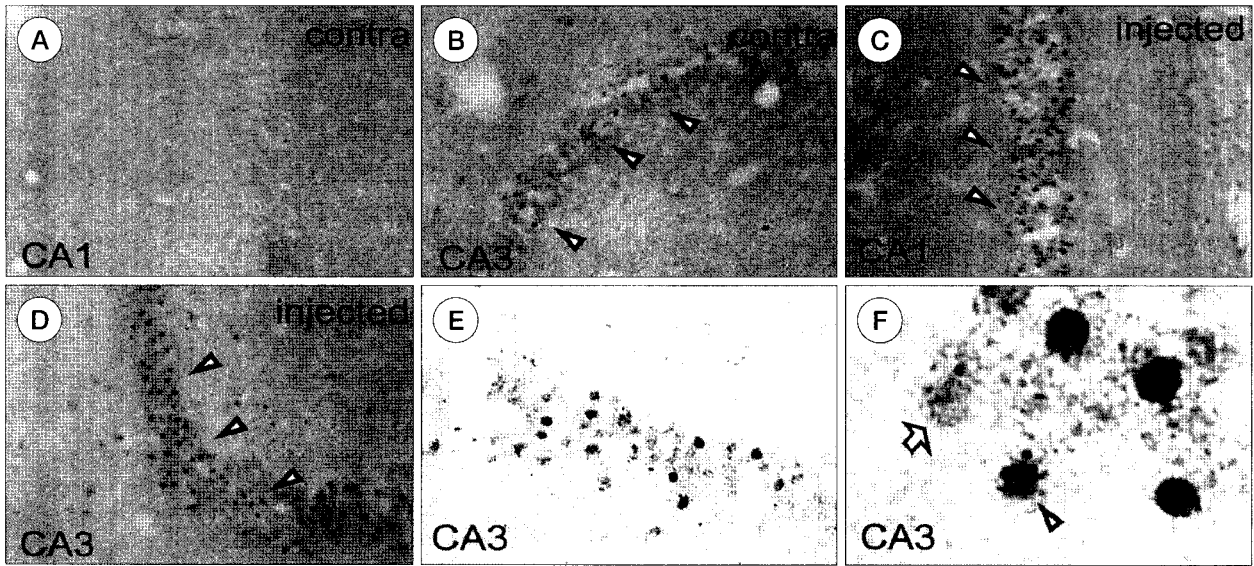
Western blot 검사에서 37 kDa에 해당하는 부분에 APE 항체에 반응한 띠(band)들이 관찰되었다. 또한, APE의 면역조직화학검사와 비슷한 양상의 결과를 얻었다. 즉, kainate를 주입한 쪽의 해마에서 1시간째에는 APE의 양이 변화가 없었으나(상대적인 단백질량=1±0.15), 4시간째에는 정상군에 비하여 유의성 있게 감소되었고(상대적인 단백질량=0.75±0.2,  $p < 0.05$ ), 24시간에서는 현저하게 감소하였다(상대적인 단백질량=0.23±0.18,  $p < 0.01$ ) (Fig. 4A, B).

**TUNEL 염색분석과 APE/ TUNEL의 이중염색분석**

Fig. 1의 kainate 주입 24시간째에 cresyl violet 염색에서 세포 소실이 보인 부위에서 TUNEL 양성 세포들이 많이 관찰되었다. 특히, kainate를 주입한 해마의 CA1과 CA3(Fig. 5C, D)에서 반대쪽 해마의 CA1과 CA3(Fig. 5A, B) 보다 TUNEL 양성 세포들이 더 많이 관찰 되었다. APE 면역조직화학 검사 결과와 비교해 볼 때, TUNEL 양성 세포들이 관찰된 부위는 모두 APE 염색 정도가 매우 약하였다. 또한 kainate 주입 후 24시간째 해마 CA1과 CA3에서 APE/TUNEL의 이중염색을 시행한 결과, APE가 염색된 세포에서는 TUNEL 염색이 보이지 않았다(Fig. 5E, F).

**고    찰**

본 실험의 결과를 요약하면 일측 해마에 주입된 kainate에 의해 유발된 발작에 의해서 해마의 신경세포 소실이 유발되었고, kainate 주입 후 양측 해마에서 간질형 방전이 관찰 되었다. 또한, kainate 주입 4시간째 해마에 위치해있는 세포들의 핵 주변에 산소 음이온 라디칼 생성이 증가 되었으며, 산화적 DNA 손상도 관찰되었다. 그리고 세포소



**Figure 5.** TUNEL staining and double staining of APE/TUNEL 24 hr after kainate treatment. TUNEL-positive cells appeared in CA1 (C : original magnification  $\times 400$ ) and CA3 (D : original magnification  $\times 400$ ) of KA-injected hippocampus. TUNEL-positive cells showed in CA3 (B : original magnification  $\times 400$ ) of contralateral hippocampus after kainate injection. However, there was no TUNEL-positive cell in CA1 of contralateral hippocampus (A : original magnification  $\times 400$ ). In double staining of APE/TUNEL, APE positive cells did not show TUNEL staining (E : original magnification  $\times 400$ ). In high power field (F : original magnification  $\times 1000$ ) TUNEL-positive cells had no APE immunoreactivity (F, arrowhead), and APE positive cells showed no TUNEL staining (F, arrow).

실이 나타나는 부위에 DNA 분절현상이 관찰되었으며, 이 DNA 분절현상이 일어나기 전에 DNA 복구 효소인 APE 단백질이 먼저 빠르게 소실되었다.

Kainate에 의한 발작 이후 산화적 스트레스가 증가하고, 이것이 세포 손상에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>12</sup> 산소 음이온 라디칼을 측정하는 방법으로 *in situ* HEt 방법이 사용되고 있으며, HEt은 반응성 산소종에 의해서 붉은 색 형광을 띠는 ethidine과 기타 소량의 기타 산화물로 산화된다. 뇌허혈 모델, 3-nitropropionic acid 신경독성 모델, 외상성 뇌 손상 모델, 그리고 pilocarpine으로 유발된 간질 모델에서 HEt을 이용하여 산소 음이온 라디칼의 생성 정도를 확인한 결과들이 밝혀졌다.<sup>14-17</sup> 본 실험에서는 kainate에 의해 유발된 발작 후에 해마 부위에서 산소 음이온 라디칼의 생성 정도를 확인하기 위하여 *in situ* HEt 방법을 이용하였고, 산소 음이온 라디칼의 세포내 위치를 알아보기 위하여 Hoechst로 같이 염색하여 비교하였다. 이 실험을 통하여 kainate 처치 후 산소 음이온 라디칼의 생성이 증가되었고, 주로 세포질에 있는 미토콘드리아에 위치해 있음을 추정할 수 있었다.

산화적 손상을 더욱 규명하기 위하여 산화적 DNA 손상을 8-OHG 항체에 대한 면역반응 검사로 확인하였다. Kainate에 의해 유발된 발작 후에 산소 음이온 라디칼이 증가되고, 이것이 superoxide dismutase에 의해  $H_2O_2$ 로 변환된 뒤 Fenton 반응에 의해  $HO^\cdot$  (hydroxyl radical)가 생

성될 수 있다. 이렇게 생성된  $HO^\cdot$ 이 DNA 염기와 반응하면 8-OHG와 같은 병변이 나타날 수 있다.<sup>19</sup> DNA의 산화적 손상은 뇌허혈, 뇌 외상 그리고 kainate로 유발시킨 간질 모델에서 입증되었다.<sup>7,20-22</sup> 본 실험 결과, kainate 주입 4시간 후에는 8-OHG 면역 반응 정도가 약하게 보였다. 하지만 kainate 주입 24시간 뒤에는 주입한 쪽 해마에 8-OHG 면역 반응 정도가 현저히 증가되었다. Kainate 주입 4시간 뒤에 *in situ* HEt 방법으로 확인한 결과 산화적 스트레스가 크게 증가되어 있었지만 8-OHG 검사로 확인한 산화적 DNA 손상은 크게 나타나지 않았다. 그리고 24시간째 8-OHG 면역반응이 크게 증가하였고 그 시간대에 TUNEL 양성 세포들이 나타나기 시작하였다. 이것은 APE 등 DNA 복구 효소의 작용으로 4시간째에는 산화적 DNA 손상이 복구되어 8-OHG 양성반응이 거의 나타나지 않다가 APE의 양이 현저히 줄어든 24시간째에는 8-OHG 양성으로 표현되는 DNA 손상이 복구되지 못하고 점차 누적되어 결국 세포 고사에 이르게 되었을 가능성을 제시한다.

뇌 허혈과 뇌 외상 모델에서는 APE에 대하여 실험되었지만 간질 모델에서는 아직 APE의 변화와 세포고사에 대한 실험이 이루어지지 않았다. Rat에서 심정지 후 나타나는 광범위 뇌 허혈(global ischemia) 모델을 이용한 이전 실험에서 해마의 CA1 부분에서 APE 단백질이 감소하였으나 APE의 mRNA는 오히려 증가되어 있다고 보고 되

고 있다.<sup>4</sup> 그리고 또 다른 실험들에서 뇌에 손상이 가해져 세포고사가 일어나기 전에 APE 단백질이 감소되는 현상을 밝혀내었다.<sup>5-7</sup> 본 실험에서도 kainate를 투여 후 발작을 일으킨 마우스 해마에서 세포고사가 일어났으며, 이 세포고사가 나타나기 전에 APE가 먼저 감소되었다. Western blot 검사에서도 APE의 양은 감소되었으나  $\beta$ -actin의 양은 일정하였다. 이 사실은 APE의 감소가 kainate에 의해 유발된 발작 후 무작위적인 단백질 분해에 의한 결과가 아님을 시사한다. 그리고 APE/TUNEL의 이중 염색 검사에서 APE 양성인 세포들에서 TUNEL에 대한 반응이 일어나지 않았다. 게다가 APE에 대한 western blot 결과 APE는 4시간 쯤 이미 감소되었으나 이때 Cresyl violet 염색에서 세포손상이 거의 관찰되지 않았고 TUNEL 양성 세포도 거의 관찰되지 않았다. 이는 선행되는 APE의 소실과 DNA 복구 기능 부전이 마우스에서 kainate에 의한 발작 이후 나타나는 DNA 분절현상과 세포고사의 원인이 될 수 있음을 시사한다.

APE 단백질이 감소되는 기전은 잘 알려져 있지 않다. 그 가능성으로 APE 단백질 분해의 증가와 이 단백질의 합성 감소 그리고 산화적 스트레스에 의한 APE 단백질의 구조 변화를 원인으로 추측하고 있다.<sup>5,7</sup> Kainate 유발 간질모델에서 APE 단백질의 빠른 소실은 세포고사에 중요한 역할을 할 것이라 생각되며, APE 단백질의 감소를 막을 수 있는 방법과 손상된 DNA를 복구 할 수 있는 APE 단백질을 증가시켜 줄 수 있는 유전자 치료법에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

REFERENCES

1. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83-108.
2. Nakamura J, La DK, Swenberg JA. 5'-nicked apurinic/aprimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:5323-8.
3. Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5061-6.
4. Gillardon F, Bottiger B, Hossmann KA. Expression of nuclear redox factor ref-1 in the rat hippocampus following global ischemia induced by cardiac arrest. *Mol Brain Res* 1997;52:194-200.
5. Kawase M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Reduction of apurinic/aprimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis. *Stroke* 1999;30:441-8.
6. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, Chan PH. Early decrease in apurinic/aprimidinic endonuclease is followed by DNA fragmen-

- tation after cold injury-induced brain trauma in mice. *Neuroscience* 1999;93:1465-73.
7. Lewen A, Sugawara T, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Oxidative cellular damage and the reduction of APE/Ref-1 expression after experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 2001;8:380-90.
8. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403.
9. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000;23:580-7.
10. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 1980;5:991-1014.
11. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10432-7.
12. Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 2000;101:563-70.
13. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003;23:8733-42.
14. Peterson SL, Morrow D, Liu S, Liu KJ. Hydroethidine detection of superoxide production during the lithium-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res* 2002;49:226-38.
15. Kim GW, Copin JC, Kawase M, et al. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:119-29.
16. Murakami K, Kondo T, Kawase M, et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-13.
17. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 1999;19:3414-22.
18. Patel M, Liang LP, Roberts LJ. 2nd. Enhanced hippocampal F2-isoprostanone formation following kainate-induced seizures. *J Neurochem* 2001;79:1065-9.
19. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995;18:1033-77.
20. Lan J, Henshall DC, Simon RP, Chen J. Formation of the base modification 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation following seizures induced by systemic kainic acid in the rat. *J Neurochem* 2000;74:302-9.
21. Hayashi T, Sakurai M, Itoyama Y, Abe K. Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res* 1999;832:159-63.
22. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000;14:955-67.
23. Laval J, Jurado J, Sagarbaev M, Sidorkina O. Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat Res* 1998;402:93-102.
24. Walton M, Lawlor P, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. Loss of Ref-1 protein expression precedes DNA fragmentation in apoptotic neurons. *Mol Brain Res* 1997;44:167-70.