

흰쥐 태아 대뇌조직에서 저산소증 손상에 의한 DNA 복구 효소의 발현 변화

이경진, 김정우, 민병운¹, 배난영², 강기영

서남대학교 의과대학 해부학교실, ¹한려대학교 임상병리학과, ²광양보건대학 임상병리과
(2011년 11월 16일 접수, 2011년 4월 12일 수정접수, 2012년 4월 27일 게재승인)

간추림 : 저산소증은 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인 중의 하나로 알려져 있다. 또한 저산소증에 의한 조직의 손상은 세포의 DNA 손상과 세포자멸사 등의 복합적인 기전을 통해 나타난다. 본 연구에서는 태아기 저산소증에 의한 대뇌조직의 손상과 동반된 8-hydroxyguanine glycosylase 1 (OGG1)과 apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)과 같은 DNA 복구 효소와 brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현 변화를 밝히 고자 하였다.

실험을 위해 임신 14.5일 및 15.5일된 흰쥐를 저산소 혼합가스(10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂)에 2시간 또는 4시간 동안 노출시킨 후 24시간이 경과된 다음 에틸에테르 마취하에 개복하여 태아를 적출하였다. 헤마톡실린-에 오신염색, 면역조직화학염색, western blot 등을 실시하여 결과를 분석하였다.

실험 결과 저산소증 손상을 유발한 대뇌조직에서 caspase-3의 발현이 증가되었다. OGG1과 APE1은 임신 14.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서는 노출 시간에 비례하여 발현이 증가되었으나 임신 15.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서는 유의한 차이가 없었다. BDNF는 임신 14.5일 실험군에서는 노출 시간에 비례하여 발현이 증가되었으나 임신 15.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서는 발현이 크게 감소되었다.

이러한 결과는 태아기 저산소증 손상은 신경세포들의 DNA 손상과 세포자멸사를 증가시키고 세포들은 이에 대한 방어기전으로 DNA 복구 효소와 신경영양인자의 발현을 증가시킴을 제시하며, 발달 시기에 따라 방어기전의 양상이 변화함을 나타낸다.

찾아보기 낱말 : 저산소증, 세포자멸사, OGG1, APE1, BDNF

서 론

산소는 호흡사슬에서 전자의 마지막 수용체로서 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 필요하며, 스테롤(sterol), 헴(heme), 지방산 등의 생합성에 이용된다. 세포가 저산소 환경에 노출되면 적응에 필요한 유전자들을 발현시키고 전사인자를 활성화시킴으로써 세포 내 에너지와 생합성 과정에 관여한다(Bunn과 Poyton 1996). 저산소증 또는 허혈에 의한 뇌조직 손상의 주요 기전은 에너지 결핍에 의한 세포막 기능부전, 흥분 전도 물

질의 과분비, 산소 자유기의 증가에 의한 세포 손상, 세포자멸 등이 일어나면서 세포 기능장애를 일으키거나 세포를 죽게 만든다(Berger와 Garnier 1999). 저산소증 손상에 의한 미성숙 뇌의 손상 정도는 주로 뇌의 시기적인 발달 정도와 연관되는데, 뇌세포 발육, 분화, 뇌세포 이동, 수초 발생 정도, 뇌 발달 과정에서 정상적으로 일어나는 세포자멸사(apoptosis) 등이 영향을 미친다. 따라서 미성숙 뇌의 저산소증 손상의 이해는 발생학적 측면과 분자 생화학적 이해가 함께 고려되어야 한다.

DNA가 산화적 스트레스(Oxidative stress)를 받으면 DNA의 변형 및 손상을 유발하는데 DNA의 4가지 염기 중 구아닌(guanine)이 산화되면 8번 탄소에 수산기(hydroxyl group, -OH)가 붙는 8-hydroxyguanine이 되고 수산기가 케톤기(ketone group)로 치환되어 8-oxoguanine

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 강기영 (서남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : anatomy@medigate.net

이 생성되기도 한다. 8-hydroxyguanine과 8-oxoguanine은 산화적 스트레스, 자외선 조사, 전리이온방사선 등에 의해 아주 쉽게 그리고 많이 생긴다(Chung 등 1991, Yamamoto 등 1992). 이 변형된 염기에서 유래한 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)은 산화적 스트레스 및 DNA의 손상 정도를 알아내는 지표로 이용되고 있으며, 발암, 노화 및 만성질환의 중요한 매개인자로 추정되고 있다(Kasai 등 1986, Suzuki 등 1995, Tsurudome 등 1999).

세포는 DNA 손상으로 인한 유전자 변이를 방지하기 위해 8-oxoguanine을 제거 수복하는 뉴클레오타이드 절제 수복(nucleotide excision repair, NER), 염기 절제 수복(base excision repair, BER)과 같은 방어체계를 가지고 있다. 특히 신경세포에서 8-oxoguanine를 제거하고 수복하는 BER 기전은 신경독소에 의한 신경세포손상을 예방하는 중요한 방어체제로 작용한다. 수복효소 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1)은 DNA로부터 8-oxoguanine을 제거하고 apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)은 OGG1의 작용으로 형성된 AP 부위(apurinic/aprimidinic site)의 OGG1을 치환함으로써 OGG1의 효소 활성을 증강시키는 역할을 한다(Boiteux와 Radicella 2000).

손상된 DNA의 수복 기전은 생체의 각종 산화적 스트레스로부터 생물체가 유전정보를 유지하고 생존하기 위한 중요한 방어기전이다. 허혈성 신경세포 손상에 대한 동물실험은 Levine (1960)에 의해 고안된 저산소증-허혈(hypoxia-ischemia) 모델을 비롯한 다양한 실험모델이 고안되어 사용되고 있으며, 이를 바탕으로 다양한 유전자의 발현 변화 및 약리학적 연구들이 진행되고 있다. 이에 저자들은 임신 중에 일시적으로 저산소증에 노출된 태아의 뇌조직에서 세포자멸사의 양상 변화를 확인하고 8-OHdG, OGG1, APE1, brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현 변화를 관찰함으로써 발달 중인 신경세포에서 산화적 손상과 방어기전과의 상호관계를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구를 위해 임신한 Sprague-Dawley 종의 흰쥐 12마리를 실험동물 공급업체 (Daehanbiolink Co., Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 실내 온도 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 50~60%, 명암 주기는 12시간 간격으로 조절

된 조건에서 사육되었으며 물과 사료는 충분히 공급하였다. 실험동물은 모두 1주일 동안의 순응기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

2. 저산소증 손상 유도

실험동물을 임신 14.5일과 15.5일에 각각 2마리씩 무작위로 선택하여 저산소 환경에 노출시켰다. 실험동물을 밀폐된 상자에 넣고 가스 공급 및 배출 밸브를 열고 2시간 또는 4시간씩 저산소(10% O_2 , 5% CO_2 , 85% N_2) 혼합가스(Air Liquide Korea Co., Seoul, Korea)를 분당 5L를 관류시켰다. 이후 실험동물을 사육상자에 옮겨 24시간 동안 회복시킨 후 에틸에테르로 마취시킨 다음 개복하여 태아를 적출하였다. 적출된 태아의 체중을 정밀저울(OHAUS, Pine Brook, NJ, USA)로 측정 후 조직처리 및 western blot을 시행하였다.

3. 조직처리

조직학적 관찰을 위해 적출한 태아를 4°C , 4% 중성포름알데하이드에 24시간 동안 침적 고정 후 통상적인 방법에 따라 파라핀을 침투시킨 후 블록을 만들었다. 각각의 블록을 박절기(Leica, Nussloch, Germany)로 $5 \mu\text{m}$ 두께로 절삭한 후 조직절편을 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 코팅된 슬라이드글라스에 부착하였다.

4. 일반염색

조직절편을 크실렌(xylene)과 단계적 농도의 에탄올(ethanol)을 이용하여 탈파라핀 및 함수처리한 후 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. 염색을 마친 조직절편은 탈수, 투명화 과정을 마친 후 Synthetic Mountant (Shandon, Cheshire, UK)를 이용하여 봉입하였다.

5. 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 avidin-biotin complex (ABC) 방법을 이용하여 시행하였다. 항체의 침투를 용이하게 하기 위해 탈파라핀, 함수과정을 거친 조직절편을 10mM 구연산염완충액(citrate buffer, pH 6.0)에 담가 가열처리를 하였다. 냉각 후 인산염완충식염수(phosphate buffered saline; PBS, pH 7.4)로 세척한 조직절편을 3% H_2O_2 로 20분간 처리하여 조직 내에 존재하는 과산화효소(peroxidase)의 활성을 억제시켰다. PBS로 조직절편을 헹군 다음 정상혈청용액(10% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100 in PBS)을 점적하여

1시간 동안 반응시켜 비특이적 항원-항체 반응을 억제시킨 후 1차 항체 (rabbit anti-caspase 3, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 가하여 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. PBS로 조직절편을 행군 다음 ABC가 부착된 2차 항체 용액 (ImmPRESS™ reagent, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 조직절편을 행군 다음 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) 용액을 점적하여 현미경하에서 발색 정도를 확인한 후 증류수로 세척하였다. 발색이 끝난 조직절편은 탈수, 투명화 과정을 거친 다음 Synthetic Mountant (Shandon)를 이용하여 봉입하였다. 염색을 마친 조직절편을 광학현미경 (Olympus BX-50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였으며, 디지털카메라 (Olympus C-4040Z, Olympus)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

6. Western blot

단백질 분리를 위해 각각의 임신쥐에서 채취한 태아들 중 3마리를 4°C PBS에 침적한 상태에서 입체현미경하에서 대뇌조직을 분리하였다. 적출한 조직을 각각 유리막대로 분쇄한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/mL Aprotinin, 1 µg/mL Leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF)를 가하여 4°C에서 30분간 단백질을 추출하였다. 단백질의 추출을 마친 후 12,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. Bradford 분석법을 이용하여 단백질량을 측정 후 30 µg의 단백질을 각각 취하여 전기영동 (SDS-PAGE)을 실시하였다. 전기영동을 마친 후 겔에 전개된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 전이시킨 후 5% 탈지분유용액 (5% non-fat dry milk in tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, TBS-T, pH 7.6)에 담가 비특이적인 항원-항체 반응을 억제시켰다. PVDF membrane을 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 1차 항체용액 (in TBS-T, 1:1,000 v/v)에 담가 진탕교반기에 올려 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit anti-8-OHdG, rabbit anti-OGG1, mouse anti-APE1, rabbit anti-BDNF (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. PVDF membrane을 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체용액 (in TBS-T, 1:5,000 v/v)에 담가 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 후 PVDF membrane을 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 제조사 지침에 따라 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)

를 적용하여 형광신호를 필름에 감광시킨 다음 현상하였다. 필름은 광학스캐너를 이용하여 이미지파일로 변환하였으며 ImageJ (Ver. 1.42, NIH, Bethesda, MD, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

7. 통계처리

태아의 체중, 조직학적 계측 결과, western blot 결과 등의 통계학적 분석을 위해 SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 프로그램을 이용하여 일원 분산분석 (one-way ANOVA)을 시행하였으며 *p* 값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 저산소증 손상에 의한 태아의 체중변화

적출된 태아 중에서 외형적 손상이 없는 개체를 무작위로 선택하여 태아의 체중을 측정하였다 (n=12). 임신 14.5일 실험군에서는 정상대조군 (0.250±0.017 g)과 4시간 동안 저산소증 손상을 유발한 실험군 (0.230±0.009 g) 간에는 유의한 차이가 확인되었으나 2시간 동안 저산소증 손상을 유발한 실험군 (0.246±0.017 g)과

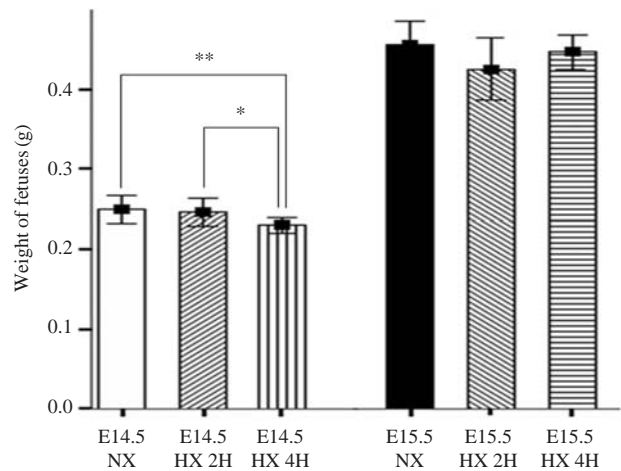


Fig. 1. Analysis of the weight of the fetuses. The fetuses of each group were randomly selected (n=12). Maternal hypoxic stress could cause fetal growth retardation and this influence was more significant at early stage of the development. E14.5 groups were exposed to experimental conditions at the postconception day 14.5 and sacrificed at the postconception day 15.5. E15.5 groups were exposed to experimental conditions at the postconception day 15.5 and sacrificed at the postconception day 16.5. NX, normal control groups exposed to normoxic gas; HX, experimental groups exposed to hypoxic gas for 2 or 4 hours (2H or 4H). Data represent mean ± SD with statistical differences (*, *p* < 0.05 or **, *p* < 0.01).

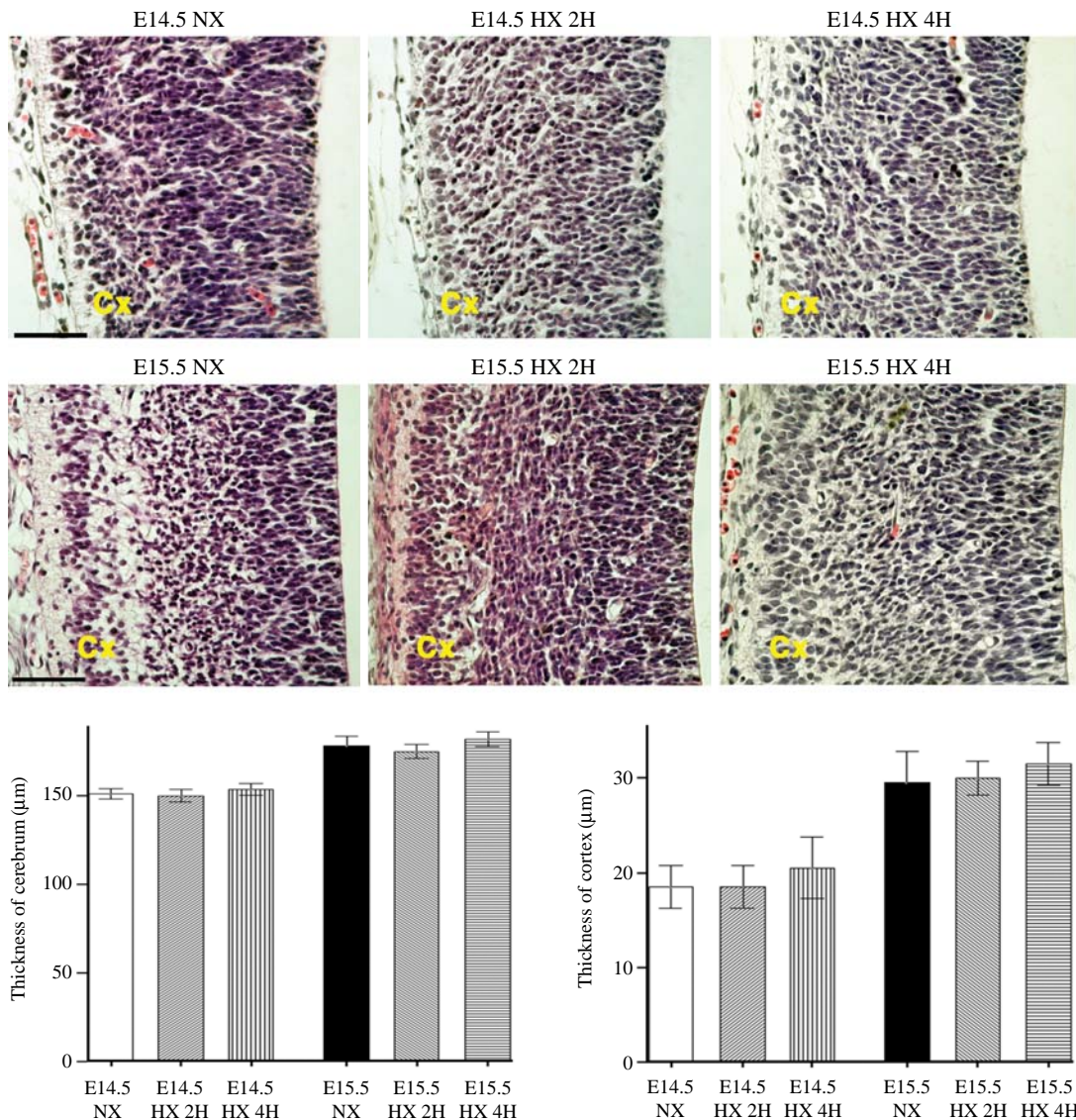


Fig. 2. Hematoxylin-eosin stain of the cerebral cortex of the rat fetus. In the hypoxic injury treated groups, the histological findings such as the morphology of the cortical neurons, structure of cortical tissues, thickness of the cortices, and thickness of cerebral tissues were not very different from those of the normal control group. The thicknesses of the cerebrum and the cerebral cortex were statistically analysed (n=5). The hypoxic stress did not have significant effects on the growth of the cerebral tissues and the proliferation of the cortical neurons. The symbol Cx indicates the cortical zone of cerebrum. Scale bar=50 µm. Data represent mean ± SD.

는 유의성이 없었다. 임신 15.5일 실험군에서는 정상대조군과 2시간 및 4시간 저산소증 손상 유발 실험군의 평균 체중이 각각 0.394 ± 0.026 g, 0.368 ± 0.034 g, 0.386 ± 0.019 g이었으며, 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

2. 조직학적 관찰

태아 뇌조직의 가로단면을 비교 관찰한 결과 임신 14.5일 및 임신 15.5일 실험군들에서 임신 기간의 경과

에 따른 세포증식과 뇌구조의 발달은 저산소증 손상의 유무와 상관없이 유사하게 진행되었다. 각각의 실험군에서 비슷한 뇌단면이 관찰되는 조직 절편을 선택하여 대뇌조직의 전체 두께와 대뇌겉질층의 두께를 측정된 결과도 저산소증 손상 유발에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 고배율의 광학현미경 소견에서도 각각의 임신 시기별 태아의 대뇌겉질층 신경세포들의 형태, 핵의 형태와 크기 및 세포질의 염색상 등은 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

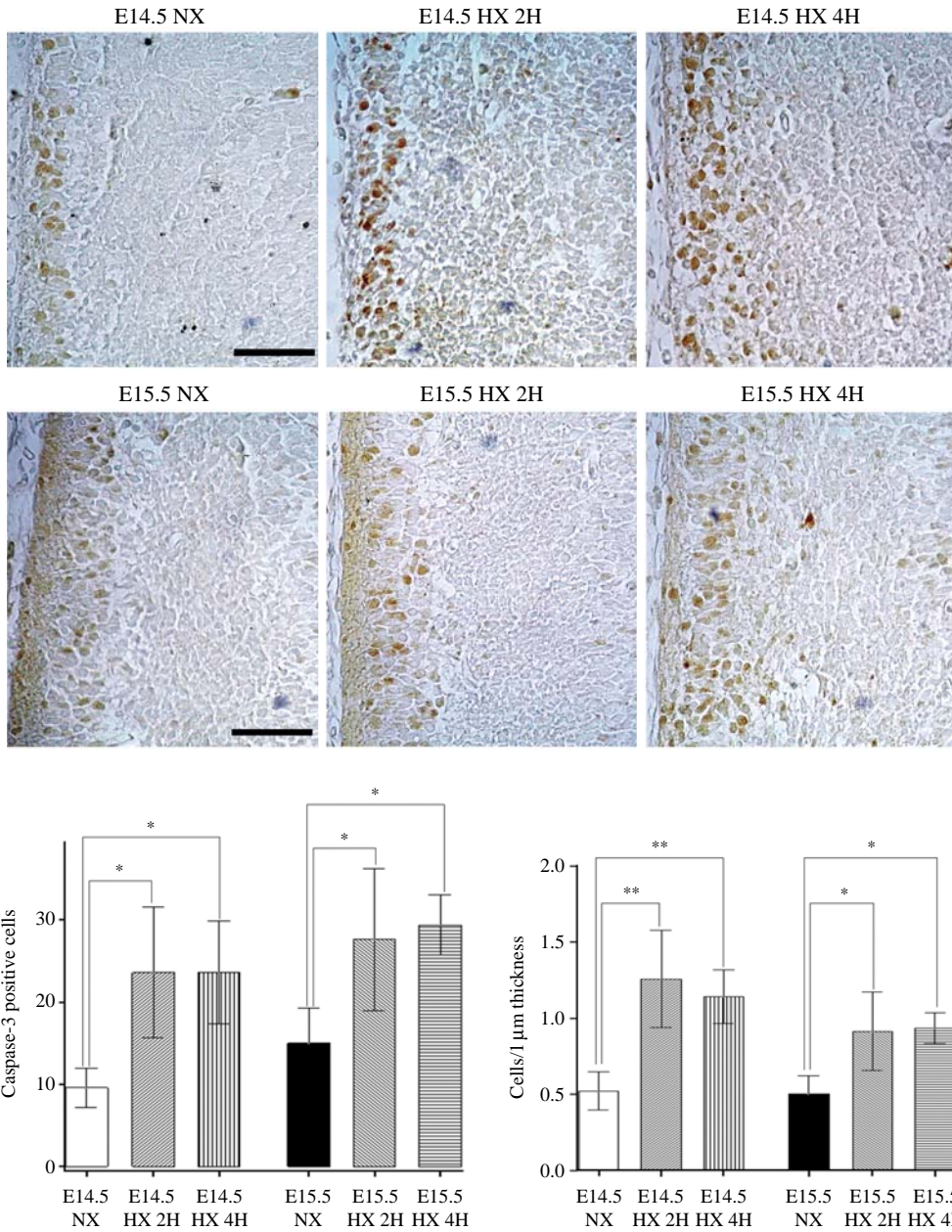


Fig. 3. Expression of caspase-3 was localized on the cerebral cortical neurons. Under high power field ($\times 1,000$) of light microscope, the caspase-3 positive cells of each group were counted ($n=5$). The number of the immunolabeled cells significantly increased after the hypoxic injury, but there was no dose-dependent relationship. Scale bar=50 μm . Data represent mean \pm SD with statistical differences (*, $p < 0.05$).

3. Caspase-3의 발현

각각의 실험군에서 유사한 뇌단면이 나타나는 조직절편을 선택하여 caspase-3에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 그 결과를 관찰하였다. 정상대조군의 대뇌조직에서 caspase-3의 전반적인 염색 강도는 임신 기간이 진행됨에 따라 감소되었으며, 임신 14.5일과 15.5일에 각각

저산소증 손상을 입은 태아의 대뇌조직에서 caspase-3의 발현은 증가되었다. 각각의 실험군에서 임의로 5개의 절편을 선택하여 형태가 유사한 대뇌부위에서 caspase-3를 발현하고 있는 세포들을 고배율($\times 1,000$) 시야에서 계수하여 비교하였다. 임신 14.5일 실험군에서 저산소증 손상을 2시간 동안 유발시킨 실험군(23.6 ± 7.9)과 4시간 동안 유발시킨 실험군(23.6 ± 6.2) 모두 정상대조군

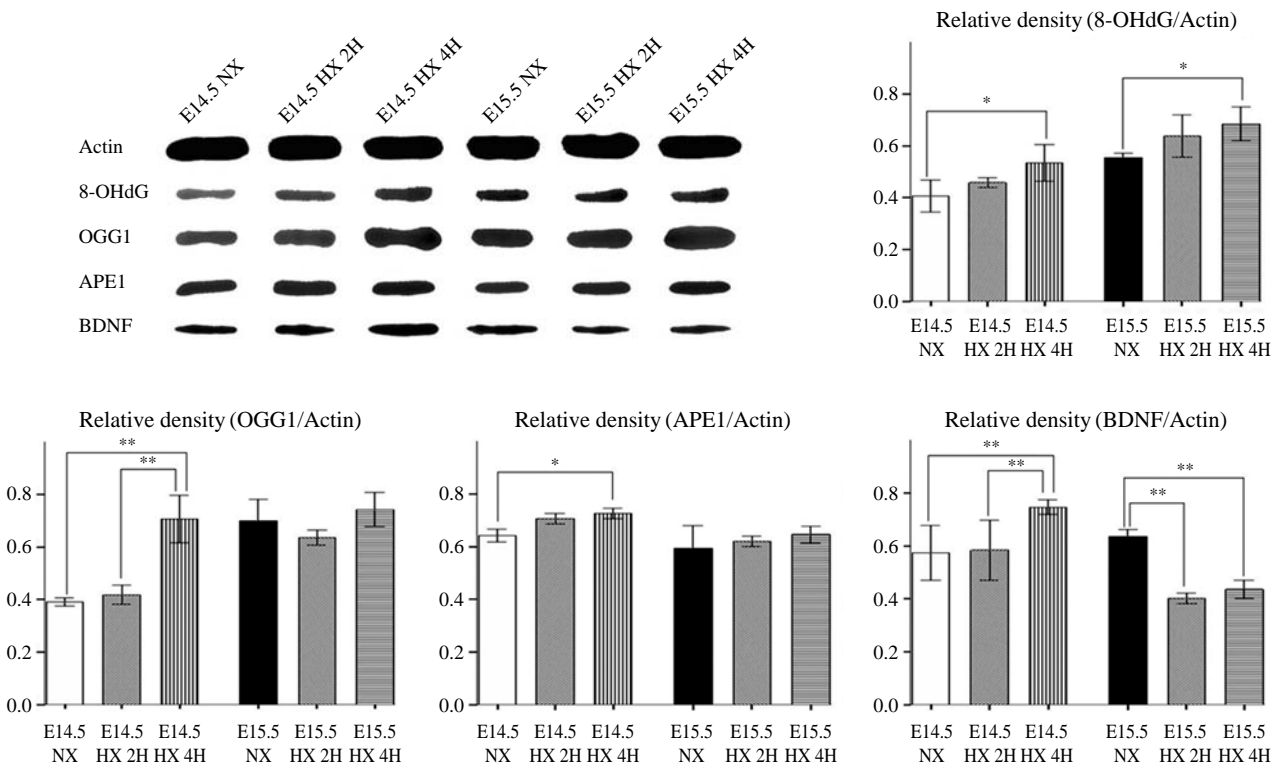


Fig. 4. Results of the western blot analysis of the 8-OHdG, OGG1, APE1 and BDNF. Expression of the 8-OHdG, OGG1 and APE1 were increased by hypoxic injury and these changes were more prominent in the group which were given hypoxic injury during four hours. Concentration of each primary antibody was same at ratio 1 : 1000. Beta actin was used as a loading control and scales represent relative band density to beta actin with statistical differences (*, $p < 0.05$ or **, $p < 0.01$).

(9.6 ± 2.4)보다 caspase-3 양성세포 수가 유의하게 증가되었으며, 임신 15.5일 실험군에서도 2시간 노출군(27.6 ± 8.6)과 4시간 노출군(29.4 ± 3.6)에서 정상대조군(15.0 ± 4.3)보다 세포 수가 유의하게 증가되었다(Fig. 3). 결과적으로 저산소증 손상은 흰쥐 태아의 대뇌조직에서 세포자멸사를 증가시키지만 그 정도는 손상 유발 시간 경과에 비례하지 않았다.

4. OGG1, APE1 및 BDNF의 발현 변화

저산소증 손상에서 활성산소에 의한 DNA 손상과의 연관성을 확인하기 위해 8-OHdG를 정량하고, DNA 복구 효소와 신경영양인자의 발현 변화를 살펴보기 위해 OGG1, APE1, BDNF에 대한 western blot을 시행하였다.

8-OHdG는 임신 14.5일 및 15.5일 실험군 모두에서 저산소증 손상을 유발한 실험군에서 노출 시간에 비례하여 양이 증가되었다. OGG1은 임신 14.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서 노출 시간에 비례하여 증가되는 경향을 나타냈으며, 특히 4시간 동안 손상을 유

발한 실험군에서 그 발현이 현저하게 증가되었다. 그러나 임신 15.5일 실험군들에서 OGG1의 발현은 유의한 차이가 없었다. APE1은 임신 14.5일 및 15.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서 각각 노출 시간에 비례하여 발현이 증가되었으나 그 차이는 크지 않았다. BDNF는 임신 14.5일 실험군들에서는 OGG1과 비슷한 발현 양상을 보였다. 그러나 임신 15.5일에 저산소증 손상을 유발한 실험군에서는 BDNF의 발현이 크게 감소되었으며 노출 시간에 따른 근소한 차이는 있으나 통계학적 의미는 없었다(Fig. 4).

고 찰

주산기 뇌손상은 주로 급격한 저산소-허혈 손상에 의해 발생한다. 그 중 급격하게 산소 공급이 감소되는 저산소증은 점차적으로 산화적 인산화를 정지 시켜서 뇌 대사를 위한 에너지 공급을 차단하게 된다. 조산아에서 저산소증은 비교적 흔히 볼 수 있는 문제이며 이는 신

생아의 인지능력이상(cognitive function disorder), 간질 발작, 신경계이상 등 심각한 결과를 초래할 수 있다.

저산소증으로 인한 신생 흰쥐의 뇌손상 실험모델에서 신경세포의 손상은 세포의 팽윤, 세포막의 빠른 파괴, DNA의 무작위적인 와해와 고분자 합성 억제제에 대한 탈감작 등으로 대표되는 괴사 과정과 세포수축, 세포막 수포화, 염색질 응축, DNA의 핵 내 파편화 등으로 특징지을 수 있는 세포자멸사 과정이 모두 관계하는 것으로 알려져 있다(Nakajima 등 2000). 생후 14 일된 흰쥐의 뇌조직에서 저산소증 손상 후 12시간 경과 시점부터 2주까지 염색질 응축, 세포 수축, 세포막 수포화, 아포토시스소체(apoptotic body), 지질 이중막 구조의 변화, 세포막의 미세점성도의 감소 등과 같은 세포자멸사의 소견이 관찰된다(Joashi 등 1999). 저산소성 뇌손상 모델에서는 활성화된 caspase-3의 발현과 세포자멸사의 형태학적 소견을 나타낸 세포들이 수일 동안 지속적으로 관찰된다고 보고되었다(Pulera 등 1998).

생체에서는 여러 기전에 의하여 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 생성되고 또한 여러 기전에 의하여 제거된다. 그러나 생성과 제거의 균형이 깨질 때 생체는 ROS에 의한 손상을 받게 되는데 이를 산화적 스트레스라고 한다. ROS에 의한 세포손상은 그 정도가 심하면 세포자멸사를 유발하고 결국 질병을 초래하게 된다.

ROS에 의한 DNA 염기변형 중 8-oxoguanine이 가장 흔한 형태이고(Bjelland와 Seeberg 2003), 그 양이 비교적 간편하여 산화적 스트레스의 지표로서 많이 연구되어 왔다(Kasai 1997, Wu 등 2004). 생체에서는 DNA에 존재하는 8-oxoguanine을 제거하는 glycosylase activity와 8-oxoguanine이 제거된 AP 부위의 3'과 5'의 인산디에스테르결합(phosphodiester bond)을 자르는 AP lyase activity를 나타내는 주요한 수복효소인 OGG1의 작용에 의하여 유전적인 안정성(genetic stability)을 유지하고 있다. 다시 말해 수복효소가 있다는 사실은 8-oxoguanine이 유해하며 비정상적인 변형염기임을 반증하는 것이다. 최근 OGG1 유전자의 촉진자(promoter) 분석결과 OGG1은 항존유전자(housekeeping gene)의 하나로 판단되고 있으며 hOGG1 promotor 부위에 Nrf2 결합부위가 있어서 산화적 스트레스에 의해 조절될 수 있는 특성을 지니고 있다(Dhenaut 등 2000). 산화적 스트레스에 의한 OGG1 활성 조절에 전사인자(transcription factor)의 산화환원반응(redox) 조절과 DNA 회복에 관련된 다기능 효소인 APE1이 간접적으로 관여할 수도 있다. DNA 복구효소인 APE1은 산화적 스트레스에

의해 DNA에 생성된 AP 부위를 복구하는 BER을 담당한다. 국소 또는 전뇌 허혈 모델, 뇌손상 모델, 대뇌 한랭손상(cold injury) 모델 등에서 DNA 분절 현상이 나타나기 전에 APE1이 감소되는 것은 세포 손상 후 APE1의 발현과 세포자멸사의 진행 사이의 밀접한 관계를 제시하고 있다. HeLa S3 세포주 및 WI38 섬유모세포에서 활성산소를 발생하는 전리이온방사선과 화학물질들에 의해서 APE1이 현저히 유도되는 반면(Ramana 등 1998), HeLa S3 세포를 차아염소산(hypochlorous acid, HOCl)으로 처리하면 OGG1 mRNA의 유도 없이 APE1 mRNA의 발현만 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다(Saitoh 등 2001). 여러 보고들에서 제시된 OGG1 및 APE1 발현의 상이한 결과들은 각각의 실험에 사용된 스트레스원과 세포의 종류 및 기원이 서로 다르기 때문일 것으로 생각된다.

최근 여러 연구결과들은 OGG1과 8-oxoguanine이 발암과정에서 관련인자로 작용할 가능성을 제시하였는데, 사람의 폐암 조직, 신장암 조직 및 암세포주 등에서 OGG1 유전자의 돌연변이가 발견되며(Chevillard 등 1998, Audebert 등 2000), 8-oxoguanine 복구 능력 결손이 있으면 자연적 돌연변이 발생률이 증가하여 발암과정을 촉진할 수 있음을 제시하였다. 그러나 OGG1 유전자를 제거한 생쥐에서 자연적 발암이 증가하지 않으며, 장기에 따라 8-oxoguanine 함량이 증가되지 않기도 하고, 속도는 느리지만 특정 유전자를 제거한 마우스의 섬유모세포에서도 8-oxoguanine 수복이 이루어짐이 보고되었고(Klungland 등 1999, Minowa 등 2000, Osterod 등 2001), 생체 내에 OGG1 외의 전사결합복구(transcription coupled repair) 등 다른 대체 복구기전들에 대한 연구가 이루어지고 있다(Le Page 등 2000).

본 실험에서는 임신 14.5일과 15.5일에 2시간 또는 4시간 동안 저산소증 손상을 유발한 흰쥐 태아의 대뇌 조직에서 caspase-3에 대한 면역조직화학염색을 시행하였고 저산소증 손상에 의해 caspase-3 양성인 세포들이 증가되는 것을 확인하였다. 이는 모체가 저산소 환경에 노출될 경우 태아에서도 저산소증 손상이 발생할 뿐만 아니라 신경세포의 손상과 세포자멸사가 유도된다는 것을 제시한다. 그리고 실험 결과에서 caspase-3 양성 세포 수를 대뇌겉질층의 두께로 나누어 단위 두께 당 세포 수를 분석하면 정상대조군의 경우 비슷한 수준을 유지하는 반면 저산소증 손상 유발군에서는 임신 15.5일 실험군에서 상대적으로 caspase-3 양성 세포의 수가 감소됨을 알 수 있다(Fig. 3). 이는 임신 기간의 경과에 따라서 저산소증 손상에 대한 신경세포의 감수성이 달

라진다는 것을 제시한다고 볼 수 있다.

저산소증 손상을 입은 흰쥐 태아의 대뇌조직에서 8-OHdG의 증가는 저산소증 손상과 이어진 재산소화(re-oxygenation) 과정에서 세포 내에서 다양한 ROS가 발생되고 이로 인한 DNA 손상과 세포자멸사가 연계됨을 나타낸다. 저산소증 손상을 입은 경우 OGG1과 APE1의 발현이 증가됨은 ROS에 의한 염기 손상에 대한 복구기전이 활성화됨을 제시한다. OGG1과 APE1의 발현이 저산소증에 노출된 시간이 더 긴 경우에서 오히려 더 크게 증가된 것과 저산소증에 4시간 노출된 태아의 대뇌겉질에서 caspase-3 양성 세포의 증가가 거의 없는 것은 저산소증에 일정 시간 이상 노출되면 신경세포 내에서 손상에 대한 보호 메커니즘이 활성화됨으로써 세포자멸사로의 진행이 완화된 수 있음을 추론케 한다. 이러한 추론은 준치사(sublethal) 수준의 산화적 스트레스는 오히려 DNA 손상에 대한 방어 기전을 활성화시킬 수 있다는 주장에도 부합한다(Coyle과 Puttfarcken 1993).

신경성장인자(nerve growth factor, NGF)와 BDNF 등과 같은 다양한 신경영양인자(neurotrophic factor)들은 신경조직의 발달과정에서 다양한 작용을 나타낸다. 그리고 미성숙 신경세포는 성숙 신경세포보다 성장인자 결핍에 훨씬 더 예민하게 반응하며, 성장인자 결핍은 주로 세포자멸사를 유발하게 된다(McDonald 등 1997). BDNF는 수용체형 티로신인산화효소(receptor tyrosine kinase)의 일종인 TrkB와 결합함으로써 신경세포의 생존을 지지해주고 신경세포와 시냅스의 분화 및 성장을 촉진시킨다(Lamballe 등 1991, Schabitz 등 2000). BDNF는 신경아교세포(glia cell)에서 주로 분비되는 것으로 알려져 있으나 최근의 연구에서는 신경세포와 혈관내피세포에서도 분비되는 것으로 보고되고 있다(Kim 등 2004). BDNF는 저산소증 상태에서 신경세포를 방어하는 역할을 하며 동물모델에서 BDNF의 뇌실강내 주입(intra-ventricular injection)은 신경손상을 감소시키고, 별아교세포(astrocyte)나 뇌혈관내피세포(brain endothelial cell)에서 BDNF의 생산과 분비를 현저히 증가시킨다는 보고도 있다(Schabitz 등 1997, Zhang과 Pardridge 2006).

본 연구에서는 저산소증 손상에 이은 BDNF의 발현 변화에서 특이한 점이 관찰되었다. 임신 14.5일에 저산소증 손상을 가한 흰쥐 태아의 대뇌조직에서는 손상 시간이 길수록 BDNF의 발현이 증가됨으로써 손상에 대한 보호 작용이 증강됨을 나타냈다. 그러나 임신 15.5일에 저산소증 손상을 가한 경우에는 정상대조군보다 발현이 감소되었고 손상 시간이 증가되어도 발현 증가

가 크게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 BDNF에 의한 신경세포 보호작용이 뇌의 발달 시기에 따라 다르게 나타날 수 있음을 제시하였다.

저산소증으로 인한 산화적 DNA 손상을 효과적으로 방어하기 위해서는 내인적 항산화제 생성과 DNA 수복 효소 생성을 효율적으로 조절하는 것이 필수적이다. 저산소증에 의한 신경세포의 OGG1, APE1 발현 증가는 저산소증 손상에 의한 변형 염기의 증가와 그로 인한 세포자멸이 유발되는 과정에서 손상된 DNA를 수복하려는 생체의 방어적 적응 반응이다. BDNF 역시 특정 발달 시기에서는 산화적 손상으로부터 신경세포를 일차적으로 보호하고 발달과 분화를 지속시키기 위한 방어적 수단 중 하나일 것이다. 이러한 추론은 다양한 발달 단계별로 실험이 확장되고 신호전달체계 및 다른 신경영양인자들의 변화를 함께 분석함으로써 더욱 구체화될 수 있을 것이다. 따라서 본 실험은 저산소증 손상에 의한 산화적 DNA 손상을 이해하고 연구 방향을 탐색함에 있어 의미 있는 기초 자료가 될 것이다.

참 고 문 헌

- Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, Vielh P, El Naggar AK, Oudard S, Boiteux S, Radicella JP : Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res* 60: 4740-4744, 2000.
- Berger R, Garnier Y : Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* 30: 107-134, 1999.
- Bjelland S, Seeberg E : Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531: 37-80, 2003.
- Boiteux S, Radicella JP : The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377: 1-8, 2000.
- Bunn HF, Poyton RO : Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76: 839-885, 1996.
- Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon MF, Oudard S, Dutrillaux B, Boiteux S : Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16: 3083-3086, 1998.
- Chung MH, Kim HS, Ohtsuka E, Kasai H, Yamamoto F, Nishimura S : An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 1472-1478, 1991.
- Coyle JT, Puttfarcken P : Oxidative stress, glutamate, and neu-

- rodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695, 1993.
- Dhenaut A, Boiteux S, Radicella JP : Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat Res* 461: 109-118, 2000.
- Joashi UC, Greenwood K, Taylor DL, Kozma M, Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H : Poly (ADP ribose) polymerase cleavage precedes neuronal death in the hippocampus and cerebellum following injury to the developing rat forebrain. *Eur J Neurosci* 11: 91-100, 1999.
- Kasai H : Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387: 147-163, 1997.
- Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H : Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7: 1849-1851, 1986.
- Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA : Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 33538-33546, 2004.
- Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seeberg E, Lindahl T, Barnes DE : Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13300-13305, 1999.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M : trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979, 1991.
- Le Page F, Klungland A, Barnes DE, Sarasin A, Boiteux S : Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8397-8402, 2000.
- Levine S : Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1-17, 1960.
- McDonald JW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW : Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res* 759: 228-232, 1997.
- Minowa O, Arai T, Hirano M, Monden Y, Nakai S, Fukuda M, Itoh M, Takano H, Hippou Y, Aburatani H, Masumura K, Nohmi T, Nishimura S, Noda T : Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4156-4161, 2000.
- Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV : Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 20: 7994-8004, 2000.
- Osterod M, Hollenbach S, Hengstler JG, Barnes DE, Lindahl T, Epe B : Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22: 1459-1463, 2001.
- Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG : Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 29: 2622-2630, 1998.
- Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S : Activation of apurinic/apyrimidinic 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* 95: 5061-5066, 1998.
- Saitoh T, Shinmura K, Yamaguchi S, Tani M, Seki S, Murakami H, Nojima Y, Yokota J : Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein. *Mutat Res* 486: 31-40, 2001.
- Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W : Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 500-506, 1997.
- Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S : Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke* 31: 2212-2217, 2000.
- Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S : Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 18: 431-436, 1995.
- Tsurudome Y, Hirano T, Yamato H, Tanaka I, Sagai M, Hirano H, Nagata N, Itoh H, Kasai H : Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis* 20: 1573-1576, 1999.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT : Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 339: 1-9, 2004.
- Yamamoto F, Kasai H, Bessho T, Chung MH, Inoue H, Ohtsuka E, Hori T, Nishimura S : Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA. *Jpn J Cancer Res* 83: 351-357, 1992.
- Zhang Y, Pardridge WM : Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1111: 227-229, 2006.

Expression of DNA Repairing Enzymes in the Cerebral Tissue of the Rat Fetus After Hypoxic Injury

Kyung-Jin Lee, Jung-Woo Kim, Byung-Woon Min¹, Nan-Young Bae², Ki-Young Kang

Department of Anatomy, College of Medicine, Seonam University

¹*Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health, Hanlyo University*

²*Department of Biomedical Laboratory Science, Gwang Yang Health College*

Abstract : Hypoxia is one of the major causes of neonatal mortality. Hypoxia-induced tissue injuries are resulted from complex mechanisms such as DNA damage and apoptosis. In this study, we aimed to elucidate the changes in the expression of DNA repairing enzymes such as 8-hydroxyguanine glycosylase 1 (OGG1) and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the fetal cerebral tissue after intrauterine hypoxic injury.

For this study, pregnant Sprague-Dawley rats were exposed to hypoxic gas (10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂) for 2 or 4 hours at postconception day 14.5 and 15.5. After 24 hours, the animals were anesthetized with ethyl ether and fetuses were obtained by laparotomy. Hematoxylin-eosin stain, immunohistochemical stain, and western blot were employed for analysis.

The caspase-3 immunolabeled cells were significantly increased within the cerebral cortex after hypoxic injury. The expressions of OGG1, APE1, and BDNF were also increased in the cerebral tissue after hypoxic injury at postconception day 14.5, in a dose-dependent manner. However, the expression of BDNF was significantly decreased in the cortical tissue exposed to hypoxic injury at postconception day 15.5.

These results demonstrate that fetal hypoxic injury induces apoptosis of the nerve cells and promotes the expressions of the DNA repairing enzymes and neurotrophic factors. In addition, these results suggest that protection mechanisms against hypoxic injury alter along the progression of the fetal development.

Keywords : Hypoxia, Apoptosis, OGG1, APE1, BDNF