

일과성 국소 대뇌 허혈 생쥐 모델에서 APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 처치에 의한 APE/Ref-1의 과발현 및 신경세포고사 감소

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌졸중 및 신경-혈관집중치료실
김현우 · 조경주 · 이병인 · 김현정 · 김경환

Overexpressed Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Effector Factor-1 Using Adenoviral Vector Inhibits Induction of Neuronal Cell Death after Transient Ischemic Stroke in Mice

Hyun-Woo Kim, BS, Kyoung-Joo Cho, MS, Byung-In Lee, MD,
Hyun-Jeong Kim, MS and Gyung Whan Kim, MD, PhD

Stroke and Neurocritical Care Section, Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Despite the correlation between changes in the levels of apurinic/aprimidinic endonuclease/redox effector factor-1 (APE/Ref-1), the DNA base excision repair protein, and ischemic neuronal damage, no studies have addressed the question of whether the overexpression or restoration of APE/Ref-1 may prevent ischemic neuronal cell death in vivo. Therefore, we investigated whether increasing APE/Ref-1 may inhibit the loss of APE/Ref-1 and DNA fragmentation, and prevent neuronal cell death after cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods:** Adult male C57BL/6J mice were subjected to intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery for 1 hour followed by reperfusion. Pre-ischemic treatment of the adenoviral vector harboring an entire APE/Ref-1 gene sequence was introduced intrastrially. Immunohistochemistry assays in AP sites, and TUNEL were performed. **Results:** APE/Ref-1 was overexpressed by using adenoviral-vector-mediated APE/Ref-1 in striatum. Pre-ischemic administration of the Adenoviral vector harboring an APE/Ref-1 gene, by 4 or 24 hours after reperfusion, significantly decreased AP site and 8-OHdG, and subsequently inhibited the induction of apoptotic DNA fragmentation at 24 hours after I/R. **Conclusion:** The overexpression of APE/Ref-1 can prevent induction of apoptotic cell death after I/R. Using adenoviral-vector-mediated APE/Ref-1 could represent a molecular target for prevention of ischemic neuronal cell death.

J Neurocrit Care 2008;1:150-156

KEY WORDS: Cerebral ischemia and/or reperfusion · DNA damage and repair · Stroke treatment · Adenoviral vectors.

서 론

Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox effector factor-1 (APE/Ref-1)는 산화적 스트레스에 의해 생성된 apurinic/aprimidinic (AP) site의 복구기작인 base excision repair (BER)에 작용하는 다기능 단백질 효소이다.³⁻⁶ 과생

성된 AP site는 세포사를 유발하는 다양한 신호들을 발생시킨다.^{7,8} AP site가 축적되기 시작하면 DNA 합성 및 gene transcription을 방해하는 등 세포에 치명적인 뿐만 아니라,⁹ 허혈성 신경세포고사의 중요한 원인이 되기도 한다.⁸ 일과성 대뇌 허혈 후 발생한 AP site는 APE/Ref-1이라는 효소에 의해 복구되어 세포고사의 진행을 막는다.⁹⁻¹¹ 그러나 효소의 DNA 복구기능을 넘어선 지속적이고 심각한 손상은 DNA에 8-hydroxyguanosine (8-OHdG)을 형성하고, 더 나아가 DNA 분절현상과 세포고사를 야기한다.^{1,12-14} 병인론적으로 허혈 주변부 (ischemic penumbra)는 세포사멸의 메커니즘이 진행되는 중요한 부위이며 허혈성 뇌졸중의 급성기에 치료의 표적이 된다.^{15,16} 여러 동물연구에서 대

Address for correspondence: Gyung Whan Kim, MD, PhD
Stroke and Neurocritical Care Section, Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2010, Fax: +82-2-393-0705
E-mail: gyungkim@yuhs.ac

본 연구는 한국과학재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임(KOSEF-200709-0008).

뇌 국소 허혈에 따른 세포손상 후, APE/Ref-1의 발현 감소와 DNA 분절현상이 보고되었다.^{9,13,17,18} 또한 세포에 준치사량에 가까운 산화적 스트레스로 APE/Ref-1의 증가를 유도하면 치사량의 산화적 스트레스와 DNA 손상에 대해 저항성을 갖게 된다고 보고되었다.^{8,19-21} 이는 APE/Ref-1와 세포고사가 밀접한 관련이 있음을 시사한다. APE/Ref-1의 증가가 대뇌 허혈 후 DNA 손상으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지며, 대뇌의 APE/Ref-1 발현량을 직접 조절해 봄으로써 대뇌 허혈에 미치는 직접적인 영향을 확인할 수 있을 것이라 가정하였다.

이러한 가설을 바탕으로 본 연구에서는 마우스 대뇌에 허혈/재관류 후 APE/Ref-1의 감소에 따른 DNA 분절현상과 세포고사를 막기 위해 APE/Ref-1의 전체 유전자를 융합한 아데노바이러스를 투여하여 APE/Ref-1을 과발현시켜 신경학적 치료에 있어서의 직접적인 효과에 대한 연구를 하였다.

연구대상 및 방법

일과성 대뇌 국소 허혈 모델

본 실험에서 모든 실험동물연구방법은 연세대학교 의과대학 실험동물위원회의 지침을 준수하였으며, Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)의 승인을 받았다. 수컷 성체 C57BL/6J 마우스(3개월령, 25~30 g) (Daehan Biolink Co., Chunbuk, South Korea)를 나일론 봉합사를 이용해 한시적으로 중대뇌동맥을 폐색(middle cerebral artery occlusion: MCAO)함으로써 일과성 국소 허혈 모델을 적용하였다.²²⁻²⁴ 정중경부를 절개하여 외경동맥을 노출시킨 후, 열처리로 끝을 무디게 만든 11.0 mm 길이의 5-0 수술용 나일론 봉합사(Ethicon, Edinburg, UK)를 외경동맥을 통해 내경동맥으로 삽입하여 중대뇌동맥 혈류를 차단하였으며, 60분 후에 나일론 봉합사를 제거하여 혈류를 회복시켰다. 허혈/재관류 여부는 Laser Doppler Flowmeter(Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

아데노바이러스 벡터(Adenoviral vector)

APE/Ref-1 유전자를 융합한 아데노바이러스(Adenovirus)의 합성을 Lab frontier(Lab frontier, Gyeonggi-do, South Korea)에 의뢰한 후 구입하여 사용하였다. 또한 마우스 대뇌에서 아데노바이러스의 작용 및 발현을 확인하기 위해 green fluorescence protein(GFP) 유전자를 융합하여 사용하였다.

아데노바이러스의 대뇌 주입 및 대뇌 허혈유도

마우스는 isoflurane으로 흡입 마취하고, stereotaxic machine에 고정한 후, 마우스의 선조체(앞쪽: 0.7 mm, 측부: 2 mm, 깊이: 3.3 mm)에 아데노바이러스를 Hamilton syringe(Hamilton Co., Nevada, USA)를 사용하여 하루에 2 μ L(4.0×10^9 pfu/mL)씩 이틀에 걸쳐 총 두 번 주입하였다. 실험군은 정상군(normal), APE/Ref-1이 융합된 아데노바이러스를 투여한 그룹(Adv-APE/Ref-1), control 아데노바이러스 그룹(Adv-Cont) 등 총 세 그룹으로 나누어 실험하였으며, 바이러스를 주입하고 3일 후 일과성 대뇌 국소 허혈을 유도하였다. 대뇌 허혈 유도 후 4시간과 24시간에 각각의 마우스들을 단두하여 선조체를 적출하였다. 실험시 동물의 체온 유지는 직장 자동체온조절장치를 사용하여 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

손상된 DNA의 AP site 정량

뇌조직의 DNA를 추출한 후(OD260 nm/OD280 nm의 비율이 1.8 이상 되도록) DNA 손상 정량 검출 키트(AP site counting, Dojindo molecular technologies, MD, USA)를 사용하여 AP site를 정량하였다. ARP(Aldehyde Reactive Probe)로 표지된 DNA를 microtiter plate에 넣고, HRP-Streptavidin 용액을 넣어 반응시키고, 기질 용액을 첨가한 후 다시 한번 반응시켜 650 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.⁹ 결과값은 ARP-DNA 표준곡선을 이용하여, 10^5 nucleotide당 AP site의 개수로 나타내었다.

면역조직화학 염색(Immunohistochemical staining)

면역조직화학검사를 위해 준비한 조직절편을 PBS로 세척을 하고 일차 항체와 함께 반응시켰다. 일차 항체로는 goat anti-APE/Ref-1 polyclonal antibody(1 : 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 rabbit anti-GFP polyclonal antibody(1 : 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 절편을 일차항체로 4°C 에서 8시간 정도 반응시킨 후, 형광표지가 달린 이차 항체 또는 biotin이 결합된 이차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 면역조직화학검사를 시행하였다.

핵 대조염색 실행할 시, 이 절편을 조심스럽게 세척한 후 실온에서 20분간 propidium iodide(PI; Sigma) 0.5 g/mL와 반응시켰으며, 염색한 조직절편들을 LSM 510 confocal laser scanning microscopy(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다. Biotin이 결합된 이차 항체를 사용할 시에는 Vectastatin Elite ABC Kit(Vector

laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 면역반응을 시행하였고, diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 발색시켰으며, methyl green으로 핵대조염색을 실시하였다. 통계적 계수를 위해 각각의 생쥐에서 손상 부위내 서로 다른 위치의 조직절편을 선택한 후 200배율에서 1 mm² 당 세포를 계수하는 반 정량적(semi-quantitative) 방법을 사용하였다.

DNA 분절(fragmentation) 현상 검출

DNA 분절현상을 확인하기 위하여 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) 염색을 시행하였다.^{24,25} 위에 기술한 방법으로 준비한 조직 절편을 37°C의 어두운 방에서 1시간 동안 TUNEL reaction mixture(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) 50 µL와 반응시켰다. 절편을 세척한 후 Vectashield mounting medium(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 봉입하였고, LSM 510 confocal laser scanning micro-

scopy(Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였다.

산화 DNA의 검출

동결 절편을 얻은 후 DNase-free RNase(Roche, Mannheim, Germany)로 반응시켰고, MOM kit(MOM; Dako, Carpinteria, CA, USA) 제작사의 방법에 따라 항체의 biotinylation과 blocking 과정 후 8-hydroxyguanosine(8-OHdG) 마우스 단클론 항체(1 : 300)(QED bioscience, CA, USA)를 반응시켰다. DAB로 발색시키고, 현미경으로 관찰하였다.

통계학적 분석

통계 자료들은 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 여러 집단간의 통계학적 비교는 ANOVA(with Fisher's post-hoc test)(StatView, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)로 시행하였으며, P<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

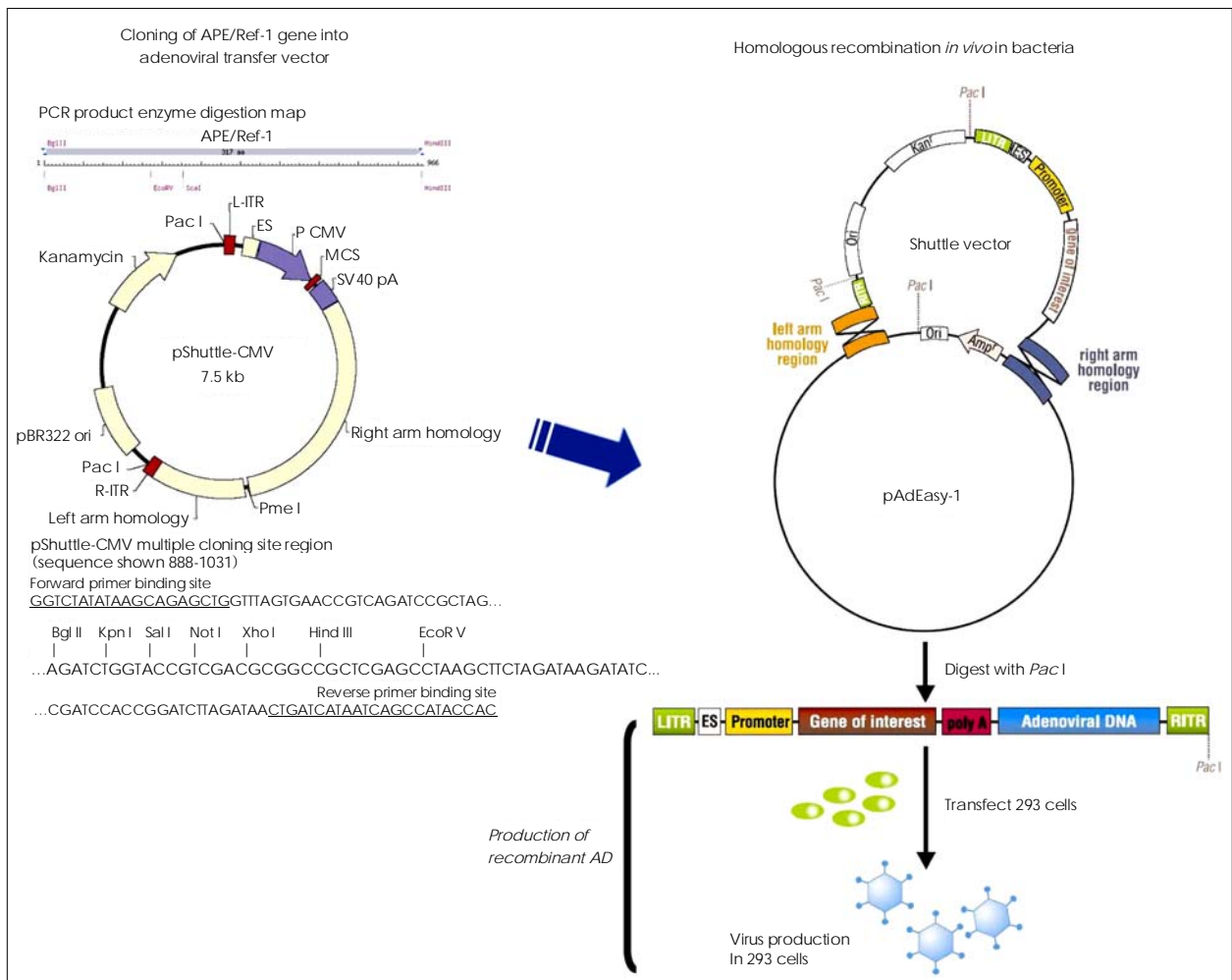


FIGURE 1. Production of recombinant APE/Ref-1 adenovirus.

결 과

APE/Ref-1 전체 유전자 융합 아데노바이러스(adenovirus) 제작

Cloning한 APE/Ref-1 전체 유전자를 pShuttle-CMV에 삽입한 후 pAd-EASY vector와 homologous recombination을 통하여 APE/Ref-1이 포함된 재조합형 아데노바이러스 벡터(recombinant adenoviral vector)를 제작하였다. 제작된 재조합형 아데노바이러스 벡터를 adenovirus packaging cell line인 293 세포에 transfection하여 재조합형 아데노바이러스를 합성하였다(Fig. 1).

아데노바이러스를 이용한 APE/Ref-1의 발현

면역조직화학염색을 이용하여 아데노바이러스를 투여 후 시간에 따른 발현을 조사하였으며(Fig. 2), propidium iodide (PI, red)으로 핵 대조염색을 실시하였다. GFP를 융합한 아데노바이러스를 투여 후 마우스의 선조체에서 1일째와 2일째는 GFP 면역반응이 거의 관찰되지 않은 반면 3, 4일째부터 GFP 양성반응이 강하게 나타났다.

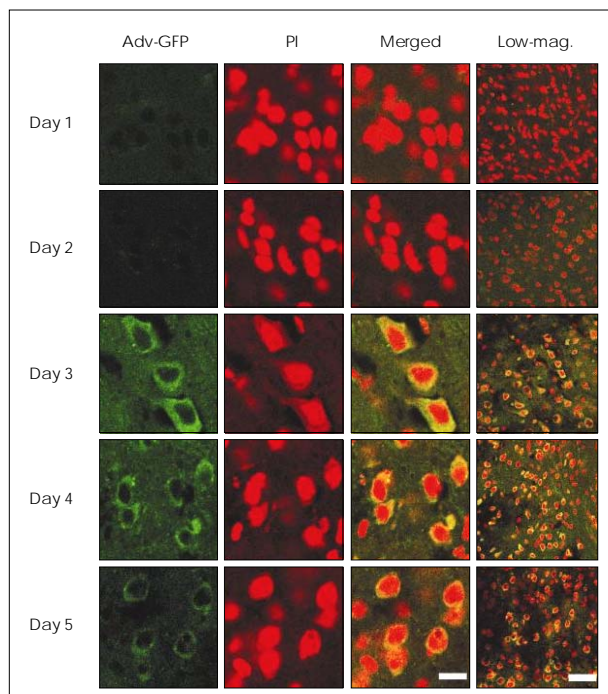


FIGURE 2. Temporal profiles of APE/Ref-1 level after transfection of adenovirus harboring APE/Ref-1 gene. In immunohistochemical analysis of Adv-GFP treated group, regional expression of Adv-GFP was detected by double immunostaining of GFP (green) and PI (red) in striatum which was revealed by confocal microscopy. Scale bar=50 μ m. GFP was significantly increased at day 3 and day 4 after transfection of Adv-APE/Ref-1 (Adv-GFP, transfection of GFP mediated by adenoviral vector).

허혈/재관류 후 APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 투여군에서 APE/Ref-1의 감소억제 및 AP site 감소

APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 투여 3일 후 마우스 대뇌에 허혈/재관류를 시행하여 APE/Ref-1의 증감을 조사하였다. 마우스 대뇌 선조체에 DAB을 이용한 조직염색을 시행하여 관찰하였다(Fig. 3A; normal, normal control; Adv-Cont., control adenoviral vector; Adv-APE/Ref-1, adenoviral-vector-mediated APE/Ref-1; 4 h, 4 hours; I/R, ischemia/reperfusion; scale bar=50 μ m). Fig. 3A의 정상대조군(Fig. 3A, normal)은 APE/Ref-1가 갈색으로 양성반응을 보였다. 일시적 허혈 유도 4시간 후, APE/Ref-1이 융합된 아데노바이러스(Fig. 3A, Adv-APE/Ref-1)를 투여한 마우스 그룹에서는 APE/Ref-1이 감소되지 않은 반면 control 아데노바이러스 투여군(Fig. 3A, Adv-Cont.)에서는 APE/Ref-1의 양성반응이 거의 발견되지 않았다. 이러한 결과들은 APE/Ref-1이 융합된 아데

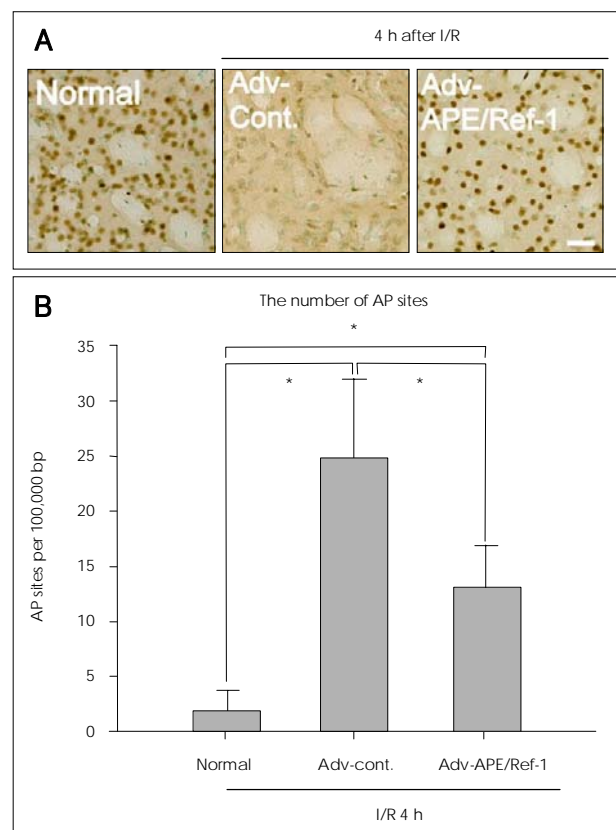


FIGURE 3. Temporal relationship between APE/Ref-1 and AP sites. Amount of APE/Ref-1 was analyzed after transfection in immunohistochemistry (A) at 4 hours after focal cerebral ischemia/reperfusion (normal, normal control; Adv-Cont., control adenoviral vector; Adv-APE/Ref-1, APE/Ref-1 mediated by adenoviral vector; I/R, ischemia/reperfusion). Scale bar=50 μ m. To investigate the effects of Adv-APE/Ref-1 on oxidative DNA damage after I/R, the striatum was subjected to quantitative measurement for nuclear contents of AP sites lesions (B) at 4 hours after I/R. * P <0.05.

노바이러스를 통해 허혈/재관류 후 APE/ Ref-1의 감소를 막았다는 것을 시사한다. 과발현된 APE/ Ref-1의 기능을 알아보기 위해 APE/Ref-1이 융합된 아데노바이러스를 투여한 그룹과 control 바이러스 그룹에서 허혈/재관류 후 산화적 스트레스에 따른 AP site 수를 측정하기 위해 ARP assay를 시행하였다(Fig. 3B; normal, 1.82 ± 1.72 ; Adv-Cont., 24.50 ± 7.10 ; Adv-APE/Ref-1, 12.84 ± 3.90 ; values are mean \pm S.D; * $P < 0.05$; n=3, each group). APE/Ref-1 융합 아데노바이러스(Fig. 3B, Adv-APE/Ref-1)를 투여한 그룹은 control 아데노바이러스(Fig. 3B, Adv-Cont.)를 투여한 그룹보다 AP site 수가 현저하게 감소된 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 아데노바이러스를 통한 APE/Ref-1의 과발현이 AP site를 감소시켰음을 보여준다.

APE/Ref-1 과발현을 통한 산화 DNA 감소 및 세포고사 방어

허혈/재관류 후 유도된 산화스트레스로 인한 DNA 손상에 대해 과발현된 APE/Ref-1의 효과를 보기 위한 DAB 조직면역염색을 시행하였다. 8-OHdG 염색 결과 정상대조군과 APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 투여군에는 허혈/재관류 24시간 후 선조체에 8-OHdG의 양성반응이 거의 나타나지 않은 반면 control 아데노바이러스 투여군은 양성반응을 보였다. 즉, APE/Ref-1 융합 아데노바이러스군에서 control 아데노바이러스 투여군에 비해 산화스트레스 지표인 8-OHdG의 통계적으로 유의적인 감소가 관찰되었다(Fig. 4, upper layer; 8-OHdG; normal, 0 ± 0 ; Adv-Cont., 981.3 ± 381.1 ; Adv-APE/Ref-1, 0 ± 0) (normal

cell; normal, 2156.3 ± 499.6 ; Adv-Cont., 340.6 ± 146.9 ; Adv-APE/Ref-1, 2267.2 ± 298.1 ; ** $P < 0.001$; n=5, each group; scale bar=50 μ m).

허혈/재관류 유도 24시간 후 APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 투여군과 control 아데노바이러스 투여군에서 형광면역조직염색과 TUNEL의 이중염색을 통해 APE/Ref-1의 단백질 발현과 세포고사를 함께 비교하였다. Control 아데노바이러스 투여군에서는 APE/Ref-1 양성반응이 전혀 관찰되지 않았으며 세포고사 지표인 TUNEL(green) 양성반응 세포가 확연히 관찰되었다. 하지만 APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 투여군에서는 허혈/재관류 유도 24시간 후에도 APE/Ref-1(red) 양성반응 세포가 관찰되었으며 TUNEL(green) 양성반응은 전혀 발견되지 않았다(Fig. 4, down layer; APE/Ref-1; normal: 2820 ± 544.9 ; Adv-Cont., 100 ± 141.4 ; Adv-APE/Ref-1, 2850 ± 108.1) (TUNEL; normal; 0 ± 0 ; Adv-Cont., 2620 ± 443.8 ; Adv-APE/Ref-1, 80 ± 115.1 ; ** $P < 0.001$; n=5, each group; scale bar=50 μ m).

고 찰

APE/Ref-1의 DNA 복구기능과 허혈성 신경손상 사이의 관계가 연구되고 있지만, 효과적인 DNA 복구기능에 대해서는 많은 부분 밝혀지지 않고 있다. 이 연구는 생쥐의 일과성 국소 대뇌 허혈의 모델에서 DNA 기능회복 효소 APE/Ref-1의 과발현이 산화적 스트레스에 따른 DNA 분절과 세

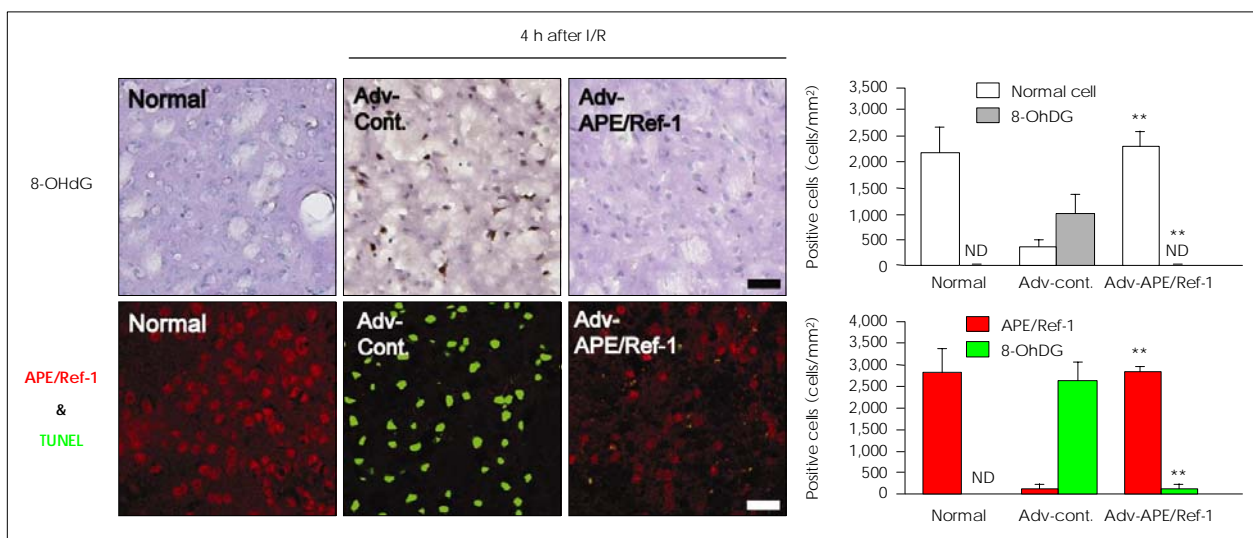


FIGURE 4. Effect of APE/Ref-1 overexpression on 8-OHdG and DNA fragmentation after ischemia/reperfusion. 8-OHdG positive cells are darkly labeled as brown in the nucleus. Scale bar=50 μ m. In Adv-APE/Ref-1 group 8-OHdG positive cells are significantly decreased compared with Adv-Cont group at 24 hours after ischemia/reperfusion (upper layer). Double labeling with APE/Ref-1 immunoreactivity (red) and TUNEL (green) staining were performed in striatum. In Adv-APE/Ref-1 group, there was no remarkable TUNEL-positive cells at 24 hours after I/R compared with Adv-Cont. ** $P < 0.001$. Scale bar=50 μ m. ND: not detected.

포고사를 줄인다는 사실을 입증하였다.

DNA 복구기능을 유도하기 위하여 DNA 복구 효소인 APE/Ref-1의 전체 유전자를 아데노바이러스에 융합하였다. APE/Ref-1이 융합된 아데노바이러스를 대뇌에 주입하여 APE/Ref-1을 과발현시켰으며, 이 후 대뇌의 일과성 허혈에 따른 산화적 DNA 손상 지표인 AP site와 8-OHdG가 상당량 감소되었다(Fig. 3, 4). 이러한 결과들은 대뇌 허혈 후 허혈성 DNA 손상을 회복함으로써 APE/Ref-1의 보호효과를 나타낸다. DNA 손상의 감소는 세포고사를 감소하는 효과를 수반했다(Fig. 4).

산화적 DNA 손상은 뇌신경세포 죽음의 원인으로 잘 알려져 있고,^{8,10,11,26,27} 주로 재관류 동안 과잉 생산된 ROS의 직접적인 공격에 의해 발생된다.^{4,28} 이전 연구에서는 DNA 복구기능이 약화되면 산화적 DNA 손상 후 AP site가 축적된다고 보고되었으며,^{12,13} APE/Ref-1 효소의 손실과 DNA 분절현상 후 발생한 세포고사들간의 연관성들이 많이 연구 되어 왔다.^{12,13,17,18,29,30} 또한 일과성 전뇌허혈 후 APE/Ref-1 감소억제가 허혈성 손상에 대해 보호효과를 보인다는 연구도 보고 되었다.³¹ *in vivo*와 *in vitro* 연구들에서, 준치사량에 가까운 산화스트레스는 일시적으로 APE/Ref-1 단백질을 상승시킨다고 보고되었다.^{9,20,32-34} 이는 APE/Ref-1 효소가 산화스트레스 또는 치명적인 허혈성 손상에 대한 보호효과를 가짐을 시사하며, APE/Ref-1의 증가가 신경세포의 죽음을 막는 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 암시한다.^{8,19,32}

본 연구에서 아데노바이러스를 이용한 APE/Ref-1의 직접적인 과발현은(Fig. 1, 2) 산화스트레스 지표인 AP site(Fig. 3)와 8-OHdG(Fig. 4, upper layer)의 감소를 줄였으며, 세포고사의 양성반응인 TUNEL 반응을 억제하였다(Fig. 4, down layer). 이는 APE/Ref-1의 양을 유지하는 것이 허혈/재관류 이후에 DNA 분절현상을 억제할 수 있음을 보여준다. 이 결과들은 APE/Ref-1 증가가 허혈성 세포고사로부터 신경세포를 지킬 수 있음을 명확히 보여준다. 또한 다양한 농도의 H₂O₂에 노출된 세포의 생존실험과 인위적인 DNA 손상을 가한 세포배양실험 등에서 아데노바이러스를 사용해 과발현 시킨 APE/Ref-1을 통해 생존기능을 높인 이전의 연구들은 본 연구결과와 일치한다.^{35,36} 최근 세포고사와 신경학적 기능장애를 유발하는 TNF- α 를³⁷ 억제하는 합성 APE/Ref-1 단백질 연구와³⁸ APE/Ref-1 융합 아데노바이러스 연구들³⁹과도 잘 부합한다.

DNA 손상은 허혈성 뇌손상과 밀접한 관련이 있다. 비록 손상된 DNA가 어떤 메커니즘으로 세포고사를 일으키는 지 명확하지 않지만, 세포의 재생능력을 넘어서 불완전

한 복구가 되는 순간의 누적된 DNA 손상이 세포고사가 활성화되는 시점으로 받아들여지고 있다.^{1,2}

본 연구는 아데노바이러스를 이용한 APE/Ref-1의 과발현이 DNA의 산화적 손상을 회복시켰으며, 이를 통해 DNA 손상의 세포고사 신호를 막아 DNA 분절현상이 억제되었다고 추정된다. 이를 명확히 하기 위해서는 본 동물모델에서 APE/Ref-1의 과발현과 비교하여 APE/Ref-1이 제거되었을 때의 좀 더 다양한 세포고사 신호를 비교하는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다. 본 연구의 결과물들은 DNA 복구효소개발 가능성을 제시 하였고, DNA 복구능력의 향상이 대뇌 허혈/재관류 이후의 허혈성 DNA 손상과 세포고사로부터 신경세포를 지키는 병태생리를 이해하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000;407:777-83.
2. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006;12:440-50.
3. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: Fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 2002;511:145-78.
4. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
5. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going ape over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83-108.
6. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat Res* 2007;614:24-36.
7. Hanna M, Chow BL, Morey NJ, Jinks-Robertson S, Doetsch PW, Xiao W. Involvement of two endonuclease iii homologs in the base excision repair pathway for the processing of DNA alkylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:51-9.
8. Li W, Luo Y, Zhang F, Signore AP, Gobbel GT, Simon RP, et al. Ischemic preconditioning in the rat brain enhances the repair of endogenous oxidative DNA damage by activating the base-excision repair pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:181-98.
9. Lan J, Li W, Zhang F, Sun FY, Nagayama T, O'Horo C, et al. Inducible repair of oxidative DNA lesions in the rat brain after transient focal ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1324-39.
10. Chen J, Jin K, Chen M, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg DA, et al. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 1997;69:232-45.
11. Liu PK, Hsu CY, Dizdaroglu M, Floyd RA, Kow YW, Karakaya A, et al. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci* 1996;16:6795-806.
12. Kawase M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Reduction of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis. *Stroke* 1999;30:441-8; discussion 449.
13. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Early decrease of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:495-501.
14. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-9.

15. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.
16. Mitsios N, Gaffney J, Krupinski J, Mathias R, Wang Q, Hayward S, et al. Expression of signaling molecules associated with apoptosis in human ischemic stroke tissue. *Cell Biochem Biophys* 2007;47:73-86.
17. Chang YY, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kim GW, Huang CY, Wu HS, et al. Neuroprotective effects of an antioxidant in cortical cerebral ischemia: prevention of early reduction of the apurinic/apyrimidinic endonuclease DNA repair enzyme. *Neurosci Lett* 1999;277:61-4.
18. Walton M, Lawlor P, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. Loss of Ref-1 protein expression precedes DNA fragmentation in apoptotic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;44:167-70.
19. 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 U S A* 1998;95:5061-6.
20. Grosch S, Fritz G, Kaina B. Apurinic endonuclease (Ref-1) is induced in mammalian cells by oxidative stress and involved in clastogenic adaptation. *Cancer Res* 1998;58:4410-6.
21. Sugawara T, Noshita N, Lewen A, Kim GW, Chan PH. Neuronal expression of the DNA repair protein ku 70 after ischemic preconditioning corresponds to tolerance to global cerebral ischemia. *Stroke* 2001;32:2388-93.
22. Tsuchiya D, Hong S, Kayama T, Panter SS, Weinstein PR. Effect of suture size and carotid clip application upon blood flow and infarct volume after permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res* 2003;970:131-9.
23. Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002;33:809-15.
24. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in dna repair proteins, ku70 and ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:1401-7.
25. Kim GW, Sugawara T, Chan PH. Involvement of oxidative stress and caspase-3 in cortical infarction after photothrombotic ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1690-701.
26. Lin LH, Cao S, Yu L, Cui J, Hamilton WJ, Liu PK. Up-regulation of base excision repair activity for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the mouse brain after forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurochem* 2000;74:1098-105.
27. Huang D, Shenoy A, Cui J, Huang W, Liu PK. In situ detection of apurinic and DNA strand breaks bearing 3'-phosphate termini in ischemic mouse brain. *FASEB J* 2000;14:407-17.
28. Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki KI, Yamanaka K, Tanaka S, Hayakawa T, et al. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol* 1996;270:C748-52.
29. 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.
30. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, Chan PH. Early decrease in apurinic/apyrimidinic endonuclease is followed by DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice. *Neuroscience* 1999;93:1465-73.
31. Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Tanonaka K, Funakoshi H, et al. The protective effect of hepatocyte growth factor against cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia is related to the improvement of apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 level and inhibition of nadph oxidase activity. *Neurosci Lett* 2006;407:136-40.
32. Grosch S, Kaina B. Transcriptional activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE, Ref-1) by oxidative stress requires creb. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:859-63.
33. Gillardon F, Bottiger B, Hossmann KA. Expression of nuclear redox factor ref-1 in the rat hippocampus following global ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;52:194-200.
34. Zhao B, Grandy DK, Hagerup JM, Magenis RE, Smith L, Chauhan BC, et al. The human gene for apurinic/apyrimidinic endonuclease (hap1): sequence and localization to chromosome 14 band q12. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4097-8.
35. Vasko MR, Guo C, Kelley MR. The multifunctional DNA repair/redox enzyme ape1/ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:367-79.
36. Fung H, Dimple B. A vital role for ape1/ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell* 2005;17:463-70.
37. Bermpohl D, You Z, Lo EH, Kim HH, Whalen MJ. Tnf alpha and fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1806-18.
38. Song YJ, Lee JY, Joo HK, Kim HS, Lee SK, Lee KH, et al. Tat-ape1/ref-1 protein inhibits tnf-alpha-induced endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:68-73.
39. Kim CS, Son SJ, Kim EK, Kim SN, Yoo DG, Kim HS, et al. Apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1 inhibits monocyte adhesion in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;69:520-6.