

3-nitropropionic Acid 투여 후 마우스 선조체에서 Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease의 발현과 신경세포고사

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌연구소

조경주 이두재 이병인 김경환

Expression of Apurinic/aprimidinic Endonuclease and Neuronal Apoptosis in the Striatum after Treatment of 3-Nitropropionic Acid in Mice

Kyuong Joo Cho, M.S., Doo Jae Lee, Ph.D., Byung In Lee, M.D.,
Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Institute of Brain Research, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: 3-Nitropropionic acid (3-NP) is an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase in mitochondria and can induce apoptosis-like cell death in the striatum. It has been reported that oxidative stress plays a role in the 3-NP induced neuronal damage. 3-NP induced striatal damage is implicated in the pathogenesis of several neurological diseases, such as chronic neurodegenerative diseases and stroke. The DNA repair enzyme, apurinic/aprimidinic endonuclease (APE), is a multifunctional protein in the DNA base excision repair (BER) pathway. To clarify the relationship between APE and neuronal cell death associated with the apoptosis in the striatum was induced by 3-NP *in vivo*.

Methods: After intra-striatal injection of 3-NP, expression of the APE protein and mRNA were evaluated by Western blot, immunohistochemistry, RT-PCR and DNA fragmentation patterns. Oxidative DNA damage was investigated by detection of oxidized DNA, AP site and superoxide.

Results: Expression levels of APE was rapidly reduced as early as 1hr after injection of 3-NP. DNA fragmentation was observed 24 hours after 3-NP treatment but not 4 hours. APE gene expression was increased to 1hr after 3-NP treatment. The number of AP sites were reduced and the reduction of APE proteins were blocked by a superoxide scavenger, MnTBAP-treatment.

Conclusions: These results suggest that the reduction of APE is the preceding event of DNA fragmentation that causes apoptosis and a decrease of APE may be induced by ROS after 3-NP treatment.

J Korean Neurol Assoc 23(4):510-518, 2005

Key Words: 3-Nitropropionic acid, Apurinic / apyrimidinic endonuclease, Reactive oxygen species, Manganese tetrakis (40benzoic acid porphyrin), Reverse transcription polymerase chain reaction

서론

세포 내 미토콘드리아의 기능장애는 신경계 퇴행성 질병 유발과 신경세포사멸에 매우 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아의 기능 이상은 에너지 생성장애, 세포 내 칼슘대사 이상을 유발하고, protease와 phospholipase, nitric oxide synthase를 활성화시키고 활성 산소종(Reactive oxygen species; ROS)을 생

Received October 28, 2004 Accepted January 18, 2005

* Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D.

Department of Neurology College of Medicine Yonsei University,
134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2010 Fax: +82-2-393-0705

E-mail: gyungkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부에서 주관하는 생명 노화연구센터 사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(02-PJ10-PG6-AG01-0010).

성하여 세포 괴사(necrosis)를 유발할 뿐만 아니라 세포자멸사(apoptosis) 유발 기전을 활성화시킨다.¹⁻³ 3-NP는 미토콘드리아의 전자 전달계 효소 중 Complex II (succinate dehydrogenase)를 비가역적으로 억제하여 이차성 흥분독성 기전에 의한 세포사멸(cell death)을 일으키는 고평양독 물질이다.⁴ 3-NP에 의해 유발되는 병변은 사람이 오염원을 잘못 섭취했을 경우나 실험 동물의 경우 전신 주입 시 선조체에 국한되는 특징을 나타내며 지연성 운동장애를 보인다.^{4,5} 이러한 특징으로 인해 3-NP는 신경퇴행성 질병 중 하나인 헌팅턴무도병을 유발하는 실험 모델에 사용되고, 미토콘드리아 에너지 발생장애가 흔히 동반되는 급성 허혈성 뇌질환의 보조 모델로 사용되고 있다.⁴⁻⁶ 흥분독성 과정에 발생하는 과도한 활성산소종은 caspase와 관련된 세포자멸사 유발 기전을 활성화한다.⁷ 과도하게 생성된 활성산소종에 의한 DNA의 손상이 복구되지 않을 경우, 세포 손상을 유발하는 다양한 신호전달 과정을 유발하여 세포사멸을 유도한다.⁸ 만성 퇴행성 병변 및 뇌허혈에서 뇌조직의 산화적 DNA 손상은 허혈성 세포 사멸의 중요한 특징이며, 최종적으로 DNA 분절(ladder)현상을 동반하는 세포자멸사가 일어난다.^{8,9} 과생성된 활성산소종에 의해 DNA에 2'-deoxyguanosine (8-oxodG)이 형성되고, 이로 인해 손상을 입은 유전자는 부분적으로 혹은 전체적으로 기능적인 특징을 잃게 되며,¹⁰ 준치사(sublethal) 정도의 손상을 일으키는 활성산소종의 증가는 오히려 DNA 손상에 대한 방어 기전으로 DNA 복구효소를 증가시킨다.¹¹

DNA 복구효소인 APE는 산화성 스트레스에 의해 DNA상에 생성된 AP (apurinic/aprimidinic) site를 복구하는 base excision repair (BER)를 담당하는 다기능 단백질 효소이다.¹² 최근의 보고에 따르면 세포 손상 후 APE 발현 감소와 세포자멸사가 밀접한 관련이 있다. 즉, 국소 대뇌, 전뇌허혈 모델, 뇌손상 모델, 대뇌 한랭 손상 모델(cold injury) 등에서 DNA 분절 현상이 나타나기 전에 APE 단백질이 감소된다.¹³⁻¹⁷ 세포질 혹은 미토콘드리아에 존재하는 superoxide dismutase (Mn-SOD or Cu/Zn-SOD)는 과생성된 $O_2^{\cdot-}$ 를 제거함으로써 산화적 스트레스를 감소시키고, 이로 인해 DNA 복구효소의 급속한 감소를 방지하여 결과적으로 DNA 분절형성 및 세포자멸사를 방지한다고 보고되었다.^{14,15,17}

본 연구에서는 신경퇴행성 손상을 일으키는 3-NP 처치 후, 선조체에서 DNA 복구효소인 APE의 변화를 알아보고, superoxide 제거제인 MnTBAP를 전처치함으로써 과생성된 활성산소종(Reactive oxygen species)이 APE 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 이를 통해 미토콘드리아 에너지 대사장애를 공통적으로 동반하는 만성 신경계 퇴행성 질환과 급성인 뇌졸중 등에서 산화성 DNA 손상을 효과적으로 치료할 수 있는 방법의 개발과 궁극적으로 세포사멸을 방지할 수 있는 기

술 개발에 기초 자료로 삼고자 한다.

대상과 방법

1. 동물모델 제작

12주 된 ICR 마우스(대한 실험동물), 수컷(35-40 g)을 사용하였다. 실험 기간 중 사육실 환경은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하고 사료와 음수는 자유로이 공급한다. 모든 실험은 연세대 임상의학연구소 실험동물실험지침에 의하여 수행하였다.

3-NP (Sigma, ST, Louis, U.S.A.)는 400 nmol 되도록 PBS에 녹인 후, pH 7.4로 적정하였다. 마우스는 isoflurane으로 흡입 마취하고, stereotaxic machine에 고정 후, 마우스의 선조체(앞쪽; 0.7 mm, 측부; 2 mm, 깊이; 3.3 mm)에 3-NP 200 nmol (pH 7.4)을 Hamilton syringe를 사용하여 직접 주입하였다.¹⁸ 주입 후 30분, 1시간, 4시간, 그리고 24 시간 후 각각의 마우스를 단두 하고, 선조체를 적출하여 실험에 사용하였다(n=5). 실험 시 동물의 체온 유지는 직장 자동체온조절장치를 사용하여 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

활성산소종 제거제로는 MnTBAP (Biomol, PA, U.S.A.)를 사용하였고, ubiquitin-proteasome system의 억제하는 억제제로는 MG132 (A.G.Scientific, CA, U.S.A)를 사용하였다. 각각의 억제제는 3-NP 주입 30분 전에 뇌실(intra-cerebral ventricle) (뒤쪽; 0.2 mm, 측부; 1 mm, 깊이; 3.1 mm)로 Hamilton syringe를 사용하여 MnTBAP (100 ug, n=4) (Biomol)와 MG132 (50 ug, n=3) (A.G. Scientific)를 주입하였다.

2. APE 면역조직화학염색

3-NP 처치 후 각각의 시간대에 뇌를 적출하고, 동결 처리 후 10 μm 두께의 동결 절편을 cresyl violet 염색하였다. 처리된 조직을 선조체 전체와 병변을 컴퓨터영상분석시스템을 사용하여 측정하였다.

면역조직화학염색을 위하여 각 시간대별로 3.7% paraformaldehyde로 심장 관류 고정하고 적출한 마우스의 뇌를 vibratome을 사용하여 50 μm 두께로 절편하였다. 준비된 조직 절편은 Anti-human APE rabbit polyclonal antibody (1:300) (Novus Biological, U.S.A.)와 반응시킨 후, biotinylated anti-rabbit secondary antibody와 이차 반응시켰다. Avidin-biotin-peroxidase 용액(Vectastatin, CA, U.S.A)을 처리 후, DAB로 발색시키고 현미경으로 관찰하였다.

3. Western blot 분석

3-NP 주입 후 각 조직을 lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)로 균질화하고 4°C, 8,000 g에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 분리하였다(n=5).¹⁷

분리한 단백질을 Bradford 법으로 정량하고 전기영동한 후, PVDF membrane에 transfer하였다. 1차 항체로 APE (1:1000, NOVUS Biologicals)를 사용하여 반응 후, horseradish peroxidase 연결 이차항체로 반응시켜 ECL Plus (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 필름에 감광시켜 검출하였다.

4. Superoxide 검출

과거 발표한 Hydroethidine (HET) *in situ* detection 방법을 이용하였다.¹⁶ Hydroethidine (HET, Molecular Probes, OR, U.S.A.)을 500 mg/ml 농도의 용액으로 만들고 이 용액 200 μ l를 3-NP 처치 3시간 뒤에 정맥으로 주사하여, 1시간 뒤 동물을 희생시켰다.^{19,20} 고정된 뇌를 vibratome을 이용하여 50 μ m의 두께로 잘라내어 형광현미경으로 관찰하였다. 핵염색은 Hoechst 33258 (2.5 \times 10⁻³ mg/ml in PBS)를 이용하여 관찰하였다.

5. 산화 DNA의 검출 및 DNA 손상의 정량

동결 절편을 얻은 후, DNase-free RNase (Roche, Mannheim, Germany)로 반응시키고, 4 N HCl에서 변성시킨 후, 50 mmole/L의 Tris-base로 중화시켰다. 항체의 biotinylation과 blocking과정 후, 8-hydroxyguanosine 마우스 단클론 항체 (1:300) (QED bioscience, CA, U.S.A.)를 반응시켰다. DAB로 발색시키고, 현미경으로 관찰하였다.¹⁸

3-NP를 처리한 뇌조직과 처리하지 않은 뇌조직의 DNA를 추출한 후(OD260 nm/OD280 nm의 비율이 1.8 이상 되도록) 준비한 뇌조직의 DNA를 DNA 손상 정량 검출 키트(AP site counting, Dojindo molecular technologies, MD, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다. ARP (Aldehyde Reactive Probe)로 표지된 DNA를 microtiter plate에 넣고, HRP-Streptavidin 용액을 넣어 반응시키고, 기질 용액을 첨가한 후 다시 한번 반응하여 650 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.¹¹ 결과값은 ARP-DNA 표준곡선을 이용하여, 10⁵ nucleotide 당 AP site 수로 나타내었다.

6. DNA 분절(fragmentation) 검출 및 DNA laddering

3-NP 처치 후 동결 절편을 얻어 3.7 % terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT) buffer 처리 후 TdT와 biotinylated 16-dUTP (Roche, Mannheim, Germany)로 표지하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 염색을 하였다.¹³

3-NP 주입 후 4, 24시간 뒤, 선조체를 proteinase K를 포함하는 lysis buffer (1X SSC, 1M tris-Cl, 0.5 M EDTA, 10% SDS)로 처리한 후, phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), chloroform을 처리하여 genomic DNA를 추출하였다. 얻어진 DNA 용액은 1.8% agarose gel에서 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 각 시간대별 DNA 분절형을 확인하였다.⁵

7. Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

뇌조직에서 전체 RNA를 guanidine isothiocyanate, phenol, and chloroform을 이용하여 추출한 후, cDNA를 합성하고 이를 주형으로 PCR을 수행하였다(n=7). APE에 대한 primer는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 nucleotide database에서 제공되는 cDNA sequence를 응용하여 설정하였다. Semi-quantitative PCR은 30 cycle (94°C for 30s, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min)을 수행하여 1% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 APE는 949 bp, GAPDH는 285bp에서 band를 관찰하였다.²¹ 영상분석프로그램(TINA)을 이용하여 밀도를 분석한 후, GAPDH와 비교하여 APE의 상대적인 발현량을 계산하였다.

8. 통계 방법

결과 분석은 Statview (SAS institute, NC, U.S.A.) 프로그램을 이용하였다. Fischer's post-hoc test에 의한 analysis of variance (ANOVA)를 사용하여, p값이 0.05 미만일 때 의미 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 3-NP 처치에 의한 APE의 급격한 감소와 선조체 병변의 증가

선조체의 병변은 3-NP 주입 1시간에는 거의 관찰되지 않고,

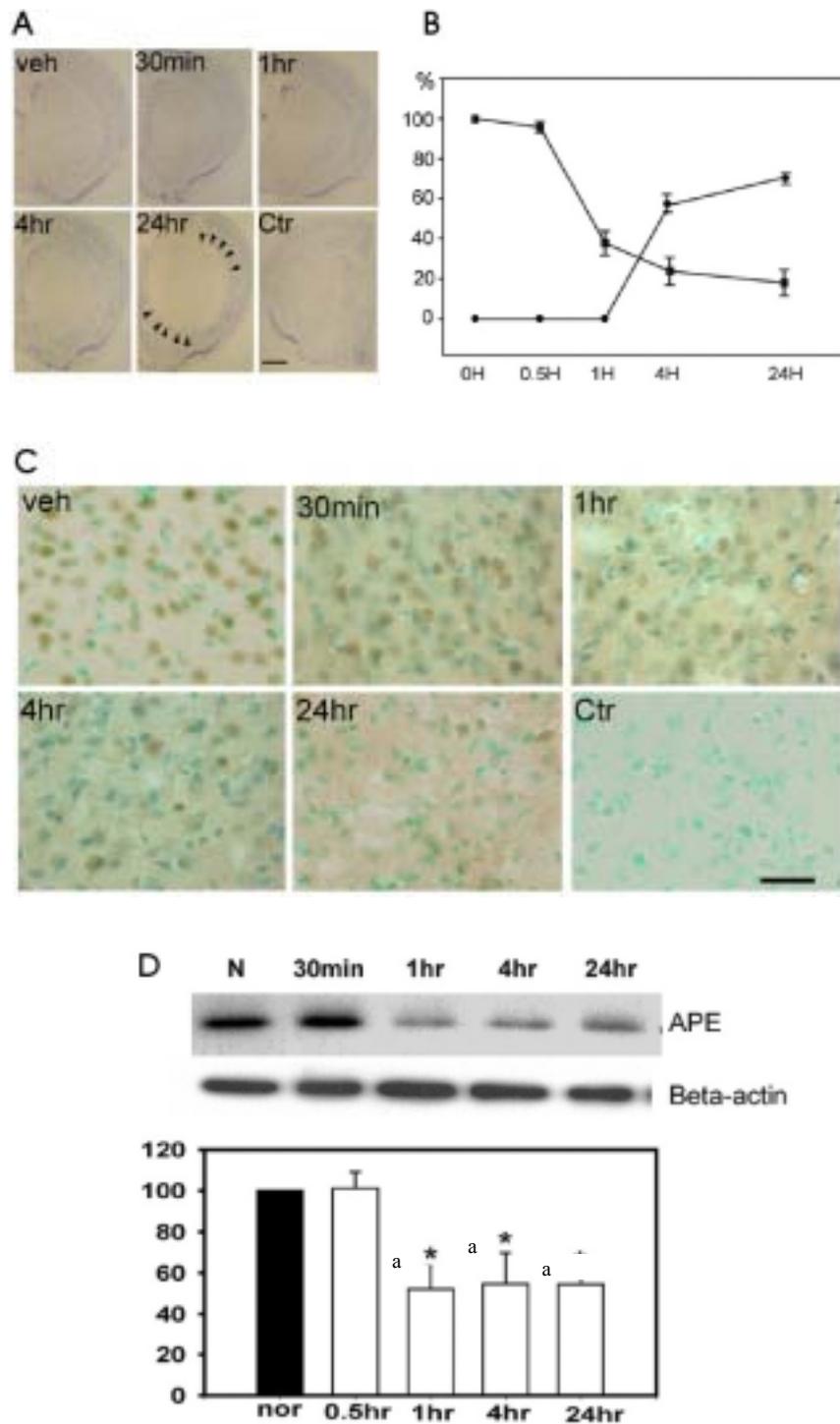


Figure 1. Striatal lesion using cresyl violet staining after 3-NP treatment (A), quantitative analysis (B) and temporal profile of APE protein reduction using immunohistochemistry (C). APE expression is significantly decreased as 1 hr as early after 3-NP treatment but striatal lesion profoundly occurred 4 hrs (B). %; APE-positive cells to total striatal cells (●) and percentage of lesion volume to striatal volume (■). scale bar, 50 μ m in A, 30 μ m in C. Western blot analysis (D). APE protein is identified as a band at 37 kDa in the whole cell fraction. Beta-actin used as an internal control.

4시간에는 선조체의 약 53%에 해당하는 병변이 관찰되며, 24 시간에는 70% 크기의 병변이 관찰되었다(0±0, 0±0, 0±0, 53.75±3.09, 70±2.94, mean±SD) (Fig. 1-A). APE에 관한 면역염색 결과는 3-NP를 처리한 뇌의 선조체에서 1시간 이후에는 면역염색에 의한 양성을 보이는 세포의 수가 급격히 감소하여, 4시간에는 정상의 23%, 그리고 24시간에는 정상의 18% 정도만이 염색되었다(30 min; 95.75±2.75, 1 hr; 37.75±5.98, 4 hrs; 23.75±6.86, 24 hrs; 18±6.48, mean±SD) (Fig. 1-B, C).

3-NP 처치 후 마우스 선조체에서 Western blot 분석을 하였다. 그 결과 시간의 경과에 따라 단백질의 절대량이 감소하였다(30 min; 100±9.25, 1 hr; 52±11.8, 4 hrs; 53.37±13.46, 24 hrs; 51.6±4.82, mean±SD) (Fig. 1-D). 반면 internal control인 β-actin은 시간에 관계없이 일정하게 발현되는 것으로 보아 일정한 양의 단백질이 사용되었음을 확인하였다.

2. 활성산소종에 의한 DNA 손상과 MnTBAP에 의한 방어

3-NP 처리 4시간 후의 병변부 선조체에서는 과생성된 superoxide anion radical (O₂^{•-})에 의해 산화된 HET가 핵주변(파란색)에 붉은 입자들로 매우 많이 분포되어 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 2-B). MnTBAP를 처리하여 O₂^{•-}를 제거한 군에서는 핵주위의 세포질에서 붉은색의 산화된 HET는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2-D).

활성산소종에 의해 생성되는 AP site수를 측정하기 위해 ARP assay를 한 결과, 대조군의 DNA에서는 10⁵ nucleotide 당 AP site의 수가 5 이하로 나온 반면, 3-NP를 처리 한 뇌조직의 DNA에서는 30분(5)과 1시간(8.5)까지 작은 폭으로 AP site의 수가 증가하는 추세를 보였다(control; 1.64±0.31, 30 min; 4.97±0.53, 1 hr; 9.28±2.12, 4 hrs; 32.46±1.4, 24 hrs; 36.34±1.16, mean±SD) (Fig. 2-B). 그러나 MnTBAP를 처리한 군에서는 AP site의 수가 20 미만으로 나타났다(vehicle; 36.34±1.16, MnTBAP; 19.01±0.76, mean±SD) (Fig. 2-C).

3-NP 주입 4시간 후, 8-OHdG의 면역염색 결과, 병변부 선조체의 약 40%의 세포가 8-OHdG 양성으로 나타났다. 반면, MnTBAP를 처리한 군에서는 산화적 DNA 손상을 입은 세포가 10% 미만으로 관찰되었다(vehicle; 39.65±12.16, MnTBAP; 6.3±2.76, mean±SD) (Fig. 2-D₃, D₄) (Fig. 2-E).

MnTBAP를 전 처리하고, APE 단백질 양의 감소 여부를 Western blot으로 확인한 결과, vehicle만을 처리한 군에서는 3-NP 처리 후 4시간에서 APE의 단백질 양이 50% 이상 큰 감소를 보였다(Fig. 2-F). 그러나 MnTBAP를 주입한 군에서는

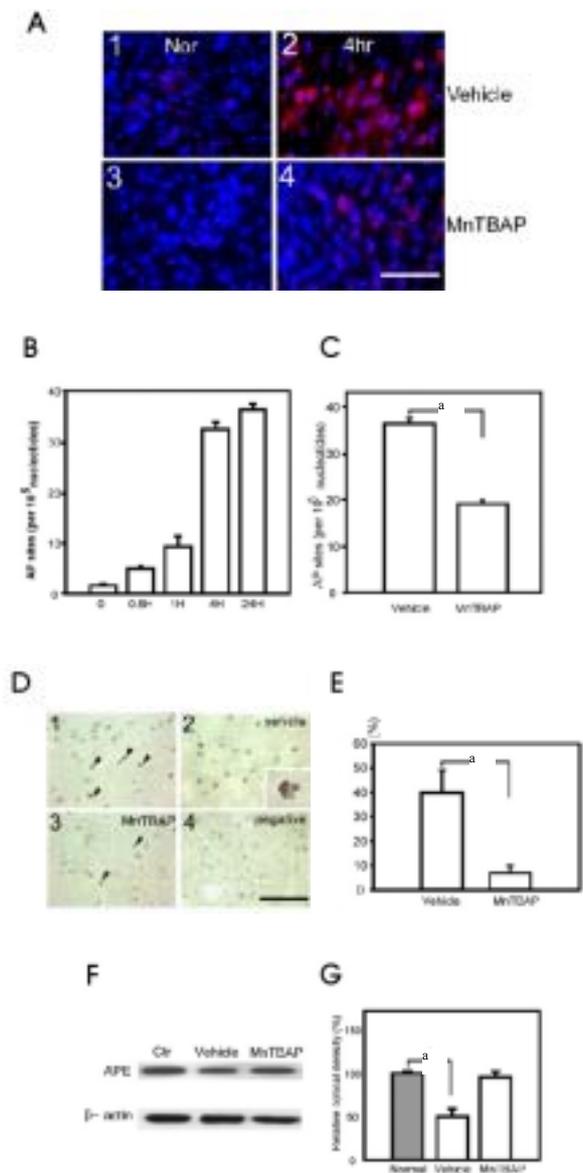


Figure 2. Comparison superoxide production (A), AP site (B), oxidative DNA (E) and APE expression (G) between MnTBAP- and vehicle-treated mice. (A) ROS production is detected by oxidized hydroethidine signals (red). Oxidized HET signals in MnTBAP-treated mice are significantly decreased compared with vehicle-treated mice. (B) Induction of AP sites in nuclear DNA after 3NP treatment is increased. (C) MnTBAP-treated mice shows the lesser number of AP sites than that in vehicle-treated group. (D) 8-OHdG -positive cells are darkly labeled as granular particles in the nucleus. scale bar, 50 μm. (E) 8-OHdG-positive cells are significantly decreased compared with vehicle-treated mice. ^ap<0.001. (F-G) Treatment of MnTBAP blocks the decrease of APE protein level. ^ap<0.001

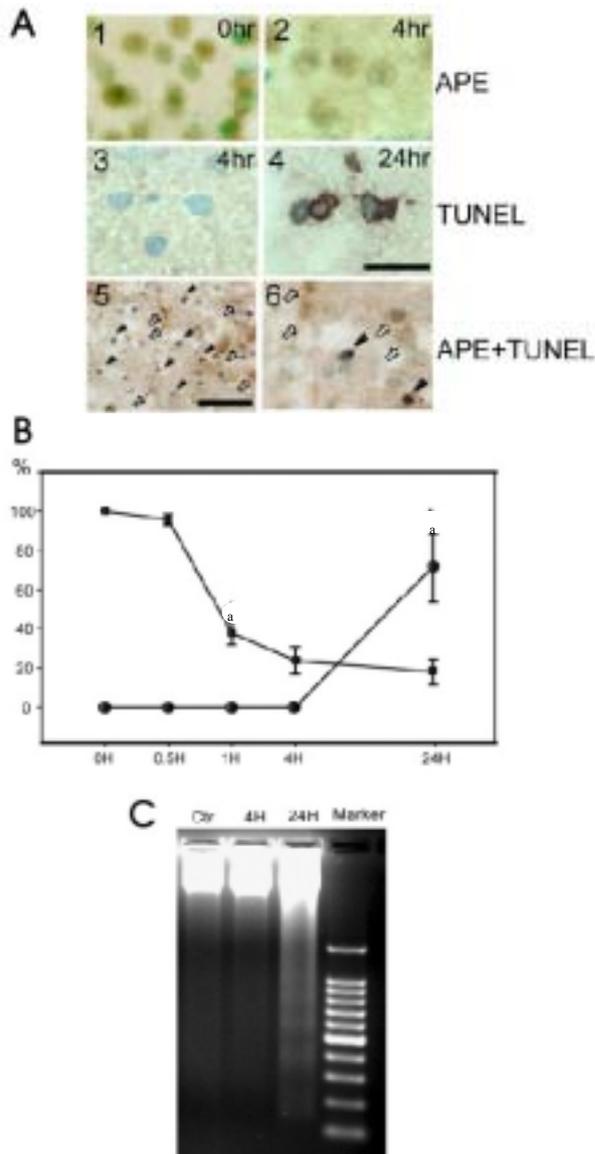


Figure 3. Spatial and temporal relationship between APE immunoreactivity and TUNEL after 3-NP treatment. (A1) Cells in the contralateral striatum show prominent nuclear APE expression. (A2) Cells in lesioned striatum 4 hrs after 3-NP treatment have faint APE expression. (A3) TUNEL-positive cells are not detected 4 hrs after 3-NP treatment. (A4) TUNEL-positive cells are widely distributed in lesioned striatum 24 hrs. (A5) Double labeling of APE (arrow) and TUNEL (arrow-head). TUNEL stained cells are not shown for APE immunoreactivity, scale bar, 50 μ m, A. Temporal profiles of the percentage of positive cells and TUNEL-positive cells in the lesioned striatum. TUNEL-positive (●) and APE-positive cells (■). ^a $p < 0.001$ (B), Genomic DNA analysis by DNA gel electrophoresis shows a ladder pattern in the striatum at 24hr after 3-NP injection.

APE 양의 감소가 방지되어 정상 마우스와 거의 비슷한 수준으로 나타났다(control; 100 ± 17.7 , vehicle; 50.0 ± 8.9 , MnTBAP; 151.1 ± 8.8 , mean \pm SD) (Fig. 2-F, G).

3. APE의 감소에 따른 세포사멸

3-NP 주입 후, 4시간에는 TUNEL-양성 세포들이 거의 발견되지 않은 반면 24시간 후에는 TUNEL 염색에 의해 고사된 세포의 수가 급격히 증가하였다(69.25 ± 15.69 , mean \pm SD) (Fig. 3-A3, A4). 또한 3-NP 처치 24시간 후 TUNEL과 APE에 관한 이중 염색 결과, TUNEL 양성 세포가 확연하게 관찰된 세포에서는 APE에 의한 면역염색은 전혀 관찰되지 않았으며 (Fig. 3-A5, A6), 반면 APE에 대한 세포의 면역반응이 나타난 세포에서는 TUNEL에 의한 염색은 전혀 이루어지지 않았다 (Fig. 3-B).

또한 DNA의 분절 유형을 관찰한 결과, 3-NP 주입 후 4시간에서는 DNA 분절 유형이 관찰되지 않은 반면 24시간에서는 DNA 분절 유형이 관찰되었다(Fig. 3-C).

4. 3-NP 처치에 의한 APE 단백질 양의 변화와 mRNA 양의 변화

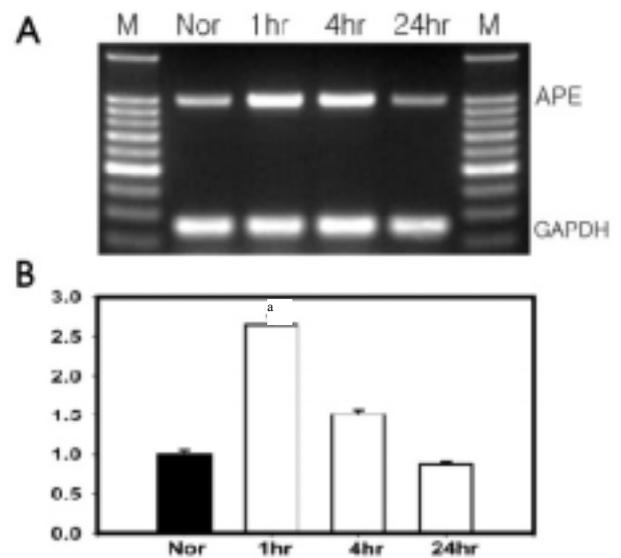


Figure 4. Expression of APE mRNA level in striatum after 3NP treatment. (A) Semi-quantitative RT-PCR of APE mRNA is performed in the striatum after 1 hr, 4 hrs, and 24 hrs after 3NP treatment. (B) Its gene expression is presented by quantitative graph, B. ^a $p < 0.001$

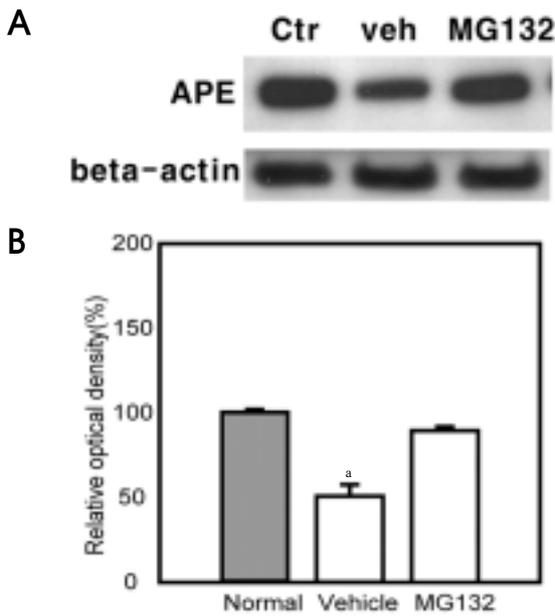


Figure 5. (A) APE Western blot analysis. MG132 pretreatment prevents reduction of APE: Ctr; contralateral striatum, veh; vehicle-pretreated striatum, MG132; MG132 pretreated-striatum. (B) Quantitative analysis of APE. ^a*p*<0.001

APE의 전사 수준에서 발현 여부를 관찰한 결과 APE는 949 bp 위치에서 확인되었고, GAPDH는 285 bp 위치에서 확인되었다(Fig. 4-A). APE의 유전자 발현은 3-NP 처치 후 1시간에 정상 대조군에 비해 증가함을 보였고, 4시간에는 감소하여 24시간에는 정상 상태의 mRNA 발현량과 비슷한 수준으로 그 발현량이 감소되었다(normal; 1.0 ± 0.091 , 1r; 2.73 ± 0.21 , 4 hrs; 1.51 ± 0.11 , 24 hrs; 0.87 ± 0.033) (Fig. 4-B).

Proteasome inhibitor인 MG132를 처리함으로 APE의 분해가 방지되는지를 Western blot 분석으로 확인한 결과, MG132를 전처리 한 마우스에서 APE의 감소가 80% 이상 방지되는 것이 확인되었다(control; 100 ± 17.7 , vehicle; 50.0 ± 8.9 , MG132; 151.1 ± 8.8) (Fig. 5-A, B).

고 찰

본 실험에서는 미토콘드리아 신경독소인, 3-NP에 의해 유발된 신경퇴행성 병변에서 DNA 복구효소인 APE의 급격한 소실과 이에 따르는 복구 기전의 실패가 이어지는 세포자멸사의 중요 기전으로 작용함을 밝혔다. 이것은 본 실험의 다음 결과들에 의해 근거한다; 첫째, 마우스의 선조체에 3-NP를 주입함으로써 활성산소종이 발생하고, 발생한 활성산소종에 의해 산화

적 세포 손상이 발생한다. 둘째, 3-NP 주입 후 DNA 손상을 복구하여 방어하는 APE의 양이 선조체 병변 발생 전에 즉, 3-NP 투여 1시간 만에 급격히 감소하기 시작한다. 셋째, 3-NP 염색이 없는 세포에서만 TUNEL 염색이 된다.

3-NP에 의한 선조체의 신경세포사멸은 흥분 독성과 활성산소종에 의한 산화성 스트레스와 연관지어 생각해 볼 수 있다.^{5,22,23} 3-NP는 배양된 신경세포에서 신경 퇴행성 세포사멸을 유도하며²⁴ 이러한 3-NP에 의한 신경퇴행성 세포사멸은 최근 신경세포의 괴사와 더불어 세포자멸사에 의한 결과로 알려져 있다.^{5,25,26} 그러므로, 3-NP는 이러한 세포자멸사(apoptosis)와 관련된 유전자들인 Bax나 Bcl-2의 발현과도 연관이 있으며, 또한 이러한 유전자들의 발현에 의해 유도되는 DNA 분절 현상 및, DNA 손상에 의한 DNA 수복 단백질들의 발현 및 단백질을 coding하는 유전자의 발현과도 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다.^{25,27} 본 실험에서 APE에 관한 면역염색 결과, 신경세포 선조체 병변이 관찰되는 시간인 4시간보다 이전 시간인 1시간에 이미 APE가 50% 정도까지 소실된다는 사실을 확인하였다(Fig. 1-A, B, C). 이것은 시간적으로 선조체에서 APE의 소실이 단순히 세포 손상이나 사멸에 의한 이차적인 현상이 아니라, 세포사멸에 선행되는 원인 인자로 작용할 가능성이 있다. Western blot 분석상, 3-NP 처치 후 시간이 지남에 따라 APE의 단백질 양은 1시간부터 급격히 감소하여, vehicle을 주입한 마우스의 선조체에 비해 그 양이 반이었고(Fig. 1-D) 이 사실은 면역화학검사 결과와 일치한다.

3-NP치리로 인한 미토콘드리아의 기능 이상은 많은 양의 활성산소종을 발생시킨다고 하는데, 본 실험에서도 HET *in situ* 검출법으로 검사한 결과, 3-NP 주입 4시간 후에 다량의 $O_2^{\cdot-}$ 이 발생된 것을 확인하였다(Fig. 2-A1, A2). 동일 시간에서 활성산소종에 의해 손상되어 DNA의 염기가 제거된 AP site 역시 매우 크게 발생하는 것을 확인하였고(Fig. 2-B), 8-OHdG 면역염색 결과 매우 많은 양의 손상된 DNA가 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 2-D). 본 실험에서 이 결과들은 3-NP 처치 후 선조체에서 신경세포의 DNA가 산화적 손상이 발생된다는 것을 나타낸다. 더욱이 본 실험에서 $O_2^{\cdot-}$ 제거제인 MnTBAP를 전처리한 군에서 $O_2^{\cdot-}$ 에 의해 산화된 HET는 거의 찾아 볼 수 없었고(Fig. 2-A3, A4), AP site 역시 vehicle 처리군에 비해 반으로 감소하였으며(Fig. 2-C), 8OHdG에 의해 염색되는 양성 세포 및 APE 단백질 양의 감소도 억제되었다(Fig. 2-F, G). 이러한 결과로 추정해 보면 과도히 형성된 활성산소종에 의한 DNA 손상을 APE가 복구하다가, 시간이 지남에 따라 DNA 손상은 더욱 많아지고, 그에 따라 APE의 복구 기능에 한계가 오는 시점에 세포자멸사가 유발되는 것으로 추정된다. 본 실험 결

과, 3-NP 처치 1시간 후의 AP site 수는 10 미만인데 반해, 4시간 후에는 32 이상으로 급격한 증가를 나타내었으며, 이에 반해 MnTBAP를 처치한 결과 AP site의 수는 약 20 정도로 감소(40% 정도 감소)한 것으로 나와 이 가설을 뒷받침한다.

TUNEL 양성 세포들을 확인한 결과 3-NP 처치 24시간에 TUNEL 양성 세포의 수가 전체 세포의 70% 이상으로 나타났고(Fig. 3-A, B), genomic DNA 분석 결과 세포자멸사의 분자생물학적 판별점인 DNA의 분절 현상으로 보아(Fig. 3-C) 3-NP에 의한 선조체 병변 형성에 세포자멸사 과정이 중요한 부분을 차지할 것으로 생각된다.

3-NP 처치 후 급격한 APE 감소 원인을 검사하기 위해 첫번째로 APE의 전사(transcription level) 수준에서 mRNA의 양을 조사하였다(Fig. 4-A, B). 본 실험에서 3-NP 처치 후 APE의 급격한 소실이 일어나는 1시간에 오히려 2.7배 정도의 mRNA의 증가를 보여 APE의 감소가 3-NP 처치 후 흥분독성 과정 중의 단백질 합성 과정에서의 단순한 감소나 변화에 의한 것이 아니고, 오히려 APE 생성 이후의 여러 과정, 특히 DNA 복구 과정을 마친 후 사용된 복구효소의 제거 과정이 관련될 것으로 생각한다. 일반적으로 DNA 복구 과정에 사용되는 복구효소들은 ubiquitin-proteasome 시스템에 의해 복구 과정이 완료되는 즉시 제거된다.²⁸ 본 실험에서, 3-NP 처치 후 선조체 병변에서 APE가 급격히 감소하는 이유도 흥분독성 과정 중 생성되는 활성산소종에 의해 산화성 DNA 손상이 일어나고 APE가 이들의 복구 과정에 참여하게 되며, 사용된 APE는 세포 내 사용된 단백질 처리 시스템으로 알려진 ubiquitin-proteasome 시스템에 의해 제거될 것으로 추정된다. 또한, ubiquitinylation에 의한 단백질 분해 과정은 최근 들어 세포자멸사를 조절한다는 면에서 주목받고 있다.³¹ 본 실험에서, proteasome 억제제인 MG132를 전처치한 경우, APE 단백질 양의 감소가 80% 이상 방지 되는 것으로 보아(Fig. 5), ubiquitin에 의해 유도되는 단백질 분해 작용인 ubiquitin-proteasome 시스템이 3-NP 처치 후 손상된 DNA 복구에 사용된 APE의 제거에 작동되는 것으로 생각된다. 이를 명확히 하기 위하여, 본 동물모델에서 APE의 ubiquitinylation 여부와 정도를 확인하는 실험이 수행되어야 하겠다.

본 실험에서는 DNA의 산화적 손상에 따른 APE 단백질의 급격한 소실과 이로 인한 신경세포자멸사의 발생이 연계되어 있다는 사실을 제시하였다. 하지만 본 실험에서 APE 소실에 따른 세포자멸사의 기전은 자세히 밝히지 못하여 향후 추가 실험이 요구된다. 이 실험 결과들을 통해 공통적으로 미토콘드리아의 에너지 발생장애를 일으키는 만성 신경퇴행성 질환과 급성 퇴행성 병변을 일으키는 뇌졸중 등에서 산화적 DNA 손상을 방어

하는 DNA 복구효소의 개발 가능성을 제시하였고 또한, 본 실험 결과가 이 질환들의 병태 생리를 이해하는 데 도움이 될 것으로 기대한다.

REFERENCES

- Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 2000;301:173-187.
- Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992;31:119-130.
- Beal MF. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:661-666.
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 1991;18:492-498.
- Kim GW, Pak HC. 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;20:119-129.
- Gould DH, Gustine DL. Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982;8:377-393.
- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7:153-163.
- Gobbel GT, Bellinzona M, Vogt AR, Gupta N, Fike JR, Chan PH. Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1998;18:147-155.
- Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000;14:955-967.
- Mazzarello P, Poloni M, Spadari S, Fochoer F. DNA repair mechanisms in neurological diseases: facts and hypotheses. *J Neurol Sci* 1992;112:4-14.
- Lan J, Li W, Zhang F, Sun FY, Nagayama T, O'Horo C. Inducible repair of oxidative DNA lesions in the rat brain after transient focal ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1324-1339.
- Evans AR, Limp-Foster, M & Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83-108.
- 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.
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Narasimhan P, Copin JC, Kawase M, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/apyrimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 1999;30:2408-2415.
- 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;93:1465-1473.

16. 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;30:441-448;discussion 449.
17. 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;8:380-390.
18. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan H. 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;23:8733-8742.
19. 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;33:809-815.
20. 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;32:1401-1407.
21. Gottwald E, Muller O, Polten A. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Electrophoresis* 2001;22:4016-4022.
22. Beal MF, Brouille E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993;13:4181-4192.
23. Kim GW, Chan PH. Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:798-809.
24. Pang Z, Geddes JW. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* 1997;17:3064-3073.
25. Vis JC, de Boer-van Huizen RT, Verbeek MM, de Waal RM, ten Donkelaar HJ, Kremer, B. et al. 3-Nitropropionic acid induces cell death and mitochondrial dysfunction in rat corticostriatal slice cultures. *Neurosci Lett* 2002;329:86-90.
26. Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, Escartin C. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 2003;278:43245-43253.
27. 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;95:5061-5066.
28. Sweder K, Madura K. Regulation of repair by the 26S proteasome. *J Biomed Biotechnol* 2002;2:94-105.
29. Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3033-3036.
30. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998;17:7151-7160.
31. Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira ME. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1998;21:516-520.