







2009년 8월 박사학위 논문

# 간질을 유도한 흰쥐의 해마에서 염기수복단백의 변화

#### 조선대학교 대학원

의 학 과

조 경 원



# 간질을 유도한 흰쥐의 해마에서 염기수복단백의 변화

#### Change of base excision repair proteins in the epileptic hippocampus

2009년 8월 25일

조선대학교 대학원

의학과

조 경 원



## 간질을 유도한 흰쥐의 해마에서 염기수복단백의 변화

#### 지도교수 김진호

이 논문을 의학 박사학위 신청 논문으로 제출함.

2009년 4 월

조선대학교 대학원 의 학 과

조 경 원

#### 조경원의 박사학위논문을 인준함

- 위원장 조선대학교 교수 (인)
- 위 원 조선대학교 교수 (인)
- 위 원 조선대학교 교수 (인)
- 위 원 서남대학교 교수 (인)
- 위 원 조선대학교 교수 (인)

#### 2009년 6 월

#### 조선대학교 대학원

목 차

표목차	1
도목차	2
영문초록	3
서론	6
재료 및 방법	12
결과	15
고찰	28
국문 초록	34
참고문헌	36



#### 표 목 차

Table	2.	Base	excision	repair	variations	in	brain
aginga	nd j	patholo	gy	•••••	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••	. 11

도 목 차

Fig. 1. Images of the hippocampus stained Toluidine blue	by 16
Fig. 2. Immunoreacitivity stained by anti-APE antib	ody 18
Fig. 3. High power images of CA1 in the hippocam stained by APE	pus 19
Fig. 4. High power images of CA3 in the hippocam stained by APE	pus 20
Fig. 5. High power images of DG in the hippocam stained by APE	pus 21
Fig. 6. Immunoreacitivity stained by anti-O antibody	gg1 23
Fig. 7. High power images of CA1 in the hippocam stained by Ogg1	pus 24
Fig. 8. High power images of CA3 in the hippocam stained by Ogg1	pus 25
Fig. 9. High power images of DG in the hippocam stained by Ogg1	pus 26



#### ABSTRACT

#### Change of base excision repair proteins in the epileptic hippocampus

Kyung Won Cho Advisor: Prof. Jin Ho Kim M.D.,Ph.D. Department of Medicine, Graduate School of Chosun University

Backgrounds: Endogenous oxidative stress can cause various neurodegenerations by abnormal DNA repair, and base excision repair to DNA damage plays a key role in the maintenance of genomic integrity. In this context, base excision repair should correlate with the oxidative stress-induced DNA damage, since the neural tissue is a post-mitotic tissue. To investigate this hypothesis, more area-specific animal model is needed and the epilepsy model induced by domoic acid is the most interesting. Domoic acid is known as a kainate receptor agonist that produces excitotoxic injury in the brain. It also is well known that the hippocampus had well-developed glutamate receptors.

Methods: Domoic acid (0.75mg/kg) was administered intravenously via tail vein and abnormal convulsions were induced in the male Sprague-Dawley rats. On scheduled time the hippocampus was removed and examined by Nissl stain, immunohistochemistry and Western blot The of excision analysis. expression base repair proteins. apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE) and 8-oxoguanine glycosylase (Ogg1), was determined in the hippocampus at 4, 24, 120 hours after

domoic acid treatment groups (n=5/each group) and compared to that of the control group.

**Results:** Nissl staining did not show definite degenerating pyramidal neurons until 120 hours after domoic acid treatments. APE protein was mainly distributed in the principal cell layers of the control hippocampus. A rat sacrificed 4 hours after domoic acid treatment showed widespread increase of APE immunoreactivity in the hippocampus including the principal cell layers. From 24 hours after domoic acid-induced epilepsy, the immunoreactivity was reduced and restricted in the pyramidal cell layers of hippocampus and in the granule cell layers of dentate gyrus. Ogg1 protein revealed low level of staining in control hippocampus and observed only in the soma of pyramidal cells in CA1. At 4 hours after domoic acid treatment, Ogg1 immunolocalization was observed in the nuclei of principal cell layers of hippocampus. Thereafter the immunoreactivity was only seen in the pyramidal cells of CA1, but rarely observed in other cells of the hippocampus and the dentate gyrus. In addition, APE or Ogg1 protein level was transiently increased at 4 hours after domoic acid-treated rat hippocampus comparing with control rat.

**Conclusions:** These results demonstrated that domoic acid-induced epilepsy results in increased expression of the APE or Ogg1 in hippocampus, although there was no degenerating changes under Nissl staining. Neurons with oxidative DNA damage exhibited increased expression of the APE or Ogg1 with area-specific appearance that the Ogg1 were easily disappeared in the pyramidal cells of CA3 after domoic acid administration. This raises the possibility that base excision repair response may be associated with the oxidative stress-induced DNA damage and transitorily contribute to prevent serious neuronal damage at least in the CA1 area. Although this study demonstrated that base excision repair systems were induced with excitotoxic stimuli, the relationship between activation of the DNA repair response and neuronal death in the CNS remains to be determined.



**Key words**: DNA repair, Domoic Acid, Epilepsy, Hippocampus, Oxidative stress

#### 서론 (Introduction)

사람을 포함한 포유류의 세포는 하루에 10,000개 이상의 DNA 손상 을 받는다 (Lindahl, 1993; Rao, 1993). DNA 손상은 다음과 같은 형태 로 분류하고 있다 (Martin, 2008). 첫째, DNA 염기의 화학적 변화로, cytosine의 탈아미노화로 생성된 guanine이나 uracil의 산화산물인 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), 5-hydroxyuracil이 여기에 속한다. 둘째, mismatch가 있는 데, 주로 DNA 복제 중에 염기가 잘못된 쌍을 이루면서 발생한다. 셋 째, DNA backbone 절단의 경우, single strand breaks (SSBs)와 double strand breaks (DSBs)가 있는데 방사선, 화학물질, 활성산소 등 이 주 원인이다. 넷째, 염기사이의 crosslink가 있는데 주로 자외선 조 사나 항암제 치료 시 발생한다.

DNA에 포함된 유전정보는 세포의 생존과 연관되고 다음 세대로 전탈되어야 하기 때문에 DNA 손상은 적절히 수복되어야 한다. DNA 수복 기전은 다음과 같이 분류하고 있다 (Fishel 등, 2007; Martin, 2008). 첫째, 손상된 부위를 절제하고 새로 합성하는 excision repair로, DNA 염기 손상을 수복하는 base excision repair (BER)와 염기사이의 crosslink와 같은 bulky DNA 손상물을 수복하는 nucleotide excision repair (NER)가 있다. 둘째, DNA 염기의 잘못된 쌍을 수복하는 mismatch repair (MMR)가 있다. 셋째, DNA backbone이 끊어진 경우 이를 수복하는 재조합수복 (recombination repair)에 있는데, 이는 상동 성재조합수복 (homologous recombination repair)과 비상동성재조합수 복 (non-homologous recombination repair)과 비상동성재조합수 복 여기의 DNA backbone을 부수지 않고 직접 효소가 수복하는 경 우와, 손상된 염기를 무시하고 그대로 손상된 염기에 대응하는 염기를 사용해 DNA strand 합성을 계속하는 translesion synthesis도 존재한 다.

이상의 DNA 수복 기전들은 상호간에 기능적 중복이 있고, 각각의 DNA 수복 단백질도 중복된 수복기전에 관여할 수 있다. 그러나 DNA 수복에 문제가 발생하면 세포자멸사 (apoptosis 또는 programmed cell death)를 촉진하고, 돌연변이를 유발하여 유전질환 또는 암과 같은 질 병을 초래하며, 세포의 노화도 촉진된다. 그러나 신경계통에서 DNA 수복에 관여하는 단백질의 반응은 질환이나 부위에 따라 서로 다른 결 과를 보인다 (Fishel 등, 2007). 따라서 비교적 단순한 신경계통의 병리 모델에서 DNA 수복 단백질의 활성도 변화를 확인할 필요가 있다고 판단되었다.

임상적으로 간질 중 유병율이 가장 높은 예는 관자엽간질 (temporal lobe epilepsy)로, 해마 (hippocampus) 내의 신경변성 (neurodegeneration)이 특징적으로 관찰된다 (Lado 등, 2000; Coulter 등, 2002). 관자엽간질의 병태생리를 이해하기 위한 방법으로 동물 모 델을 사용하는데, 카이닌산 (kainic acid)이나 pilocarpine과 같은 화학 물질에 의한 간질모델과 전기자극에 의한 간질모델로 구분할 수 있고 (Coulter 등, 2002), 발작의 정도는 Racine (1972)과 Hesp 등 (2007)에 의해 점수화 되었다 (표 1). 카이닌산은 글루탐산 (L-glutamate)과 같 흥분성 신경전달물질의 유리를 초래하여 소위 은 '흥분손상 (excitotoxicity)'을 유발할 수 있다. 카이닌산이 작용하는 글루탐산 수 용체 (glutamate receptor)가 해마 내에 고농도로 존재하기 때문에 해 마는 흥분성 손상에 취약한 곳으로 분류된다. 이 때 글루탐산에 의한 독성은 크게 두 가지 기전으로 나타난다: 1) 칼슘의 유입 (calcium influx)으로 칼슘 의존성 세포 내 신호의 활성화와 2) 산화성 스트레스 (oxidative stress)와 자유기 (free radical)에 의한 단백질, 지질, DNA 의 손상 (Naegele, 2007).

도모이산 (domoic acid)은 갑각류에 의한 식중독 사례로부터 알려 진 글루탐산 수용체에 작용하는 카이닌산 유사체로 (Wright 등, 1989), 카이닌산보다 2~3 배 정도 강한 작용을 나타내고, 해마 내에서도 CA3

- 7 -

영역에 일차 작용을 나타낸다 (Debonnel 등, 1989). 도모이산에 의해 나타나는 간질은 카이닌산에 의해 유도된 간질과 매우 유사하다 (Colman 등, 2005; Scallet 등, 2005). 다만 도모이산에 의한 간질의 경 우, 전신 발작에 비해 주시 (staring)와 지속적인 할큄 (persistent scratching) 반응이 나타나는 것이 특징이었다. 한편, bcl-2와 bax 등 세포자멸사와 관련된 인자는 도모이산으로 발작을 유발한 지 16시간이 지났을 때 일시적으로 증가하였고, terminal deoxynucleotidyl -transferase-mediated dUTP nck end labeling (TUNEL) 염색 결과 괴사 (necrosis)된 세포는 발작을 유발하고 5일이 지나면 CA 영역과 무관하게 해마의 피라밋 세포에서 관찰되었다 (Ananth 등, 2001).

대표적인 post-mitotic cell인 신경세포에서 DNA 수복은 노화, 흥 분 손상에 대한 반응, 신경세포의 생존에 매우 중요할 것으로 생각된 다. 신경세포에 발생하는 DNA 손상의 형태 중 가장 흔한 것은 산화성 손상 (oxidative DNA damage)으로, 그 산물은 기본적으로 염기수복기 전 (BER)에 의해 수복된다 (Fishel 등, 2007). 염기수복기전에는 다음 과 같은 다양한 효소가 포함된다. 첫째, 염기 제거에 관여하는 8-oxoG DNA glycosylase (Ogg1), endonuclease III (human homologue Nth1), N-methyl-purine DNA glycosylase (MPG), uracil DNA glycosylase (UDG), 둘째, AP (apurinic/apyrimidinic) site incision에 관여하는 AP endonuclease (APE/ Ref-1), 셋째, repair synthesis에 관여하는 DNA β-polymerase, 넷째, ligation 및 수복의 완료에 관여하는 DNA ligase 이다.

Level 0	Resting	Sleeping
	Snuffling/Floor licking	Air sniffing
	Wall climbing	Walking
	Face washing	Genital licking
	Grooming	
Level 1	Blinking	Squinting
	Frozen posture/Staring	Bracing
	Resting in an unnatural state	Body scrunching
	Mastication	Vocalization
	Panting	Piloerection
	Hiccups	Heaving
Level 2	Tooth grinding	Mouth twitches
	Head tics	Head tremors
	Head bobbing	Head weaving
	Head shakes	
Level 3	Wet dog shakes	Hind foot biting
	Forelimb twitches	Hindlimb twitches
	Forelimb tremors	Hindlimb tremors
	Forelimb clonus	Hindlimb clonus
	Forelimb tonic-clonic	Hindlimb extension
	Scratching	Running or circling
Level 4	Whole body twitches	Whole body tremors
	Loss of balance	Rearing/Praying
	Salivation	Foaming at the mouth
	Straub tail	Tail whipping
	Myoclonic jerks	Bilateral clonic jerks
	Rigidity	
Level 5	Tonic-Clonic convulsions	

Table 1. Scores allocated to observed rat behaviors  $\!\!\!\!^{\#}$ 

<sup>#</sup>This table was quoted from the previous report of Hesp et al. (2007).

해마에 가해진 흥분성 손상은 신경세포 내에 산화성 DNA 손상을 유발하 고, 그 결과 다양한 DNA 수복 기전이 활성화된다 (Naegele, 2007). DNA 손 상은 신경세포의 사멸에 선행하는 사건으로, DNA 수복 기전의 활성화와 신 경세포의 사멸 사이의 연관성에 대한 연구는 미진한 상태이다. 비교적 최근 에 이루어진 실험에 의하면, 카이닌산에 의해 유도된 간질모델의 해마에서 DNA 수복 단백질인 Ref-1과 X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1)이 증가하였으나, 동시에 p53과 TUNEL 반응도 증가하면서 DNA 수복 단백질의 증가가 신경세포의 사멸을 막을 수는 없었다 (Quach 등, 2005). 또 DNA ligation에 관여하는 DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs)가 극명한 DSBs에 의해 유도되었고, 특히 해마의 CA1-3 영역 의 피라밋세포에서 퇴행성 변화가 관찰되었다 (Neema 등, 2005). 그러나 동 일한 DNA 수복 단백질도 중추신경계의 병변에 따라 다른 반응을 보이기도 하고, 또 질환에 따라 반응하는 DNA 수복 단백질이 달라질 수 있다는 점도 잘 알려진 사실이다 (표 2. Fishel 등, 2007).

DNA 수복 기전이 노화 및 다양한 신경계통의 질환에서 활성화될 수 있 고, 또 어떤 DNA 수복 기전은 예후에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서는 DNA 수복 기전 중 비교적 활발히 연구된 염기수복 단백질이 신경계통에 야기된 흥분성 손상에 대해 어떤 반응을 보이는지 확인 하고자 하였다. 이를 위해 기존의 화학물질에 비해 해마에 선택성을 보이는 도모이산을 이용해 관자엽간질 모델을 만들고, 염기수복 단백인 APE와 Ogg1 양성반응세포가 분포하는 구역의 변화 및 간질 발작 시간에 따른 각 단백질 총 양의 변화를 측정하였다. 이상의 결과는 흥분손상에 의해 유발된 신경퇴행성 자극에 대한 염기수복 단백질의 반응을 증명하는 것으로, 신경계 통에서 염기수복 단백의 기능을 유추할 수 있는 자료를 제공할 수 있을 것으 로 기대된다.

BER	Variation	Pathology	Tissue		
	Ť	Seizure (kainic acid)	Hippocampus, Pyriform cortex		
		Hyperoxia	Forebrain, Hippocampus		
		ALS	Brain, Spinal cord		
APE	$\downarrow$	Hypoxia-ischemia	Hippocampus		
		Cerebral ischemia	Hippocampus		
		Compression injury	Cortex		
		Ischemia	Spinal cord		
	$\uparrow$	Ischemia-reperfusion	CNS		
Ogg1		Parkinson's disease	Subtantia nigra		
	$\downarrow$	Aging	Cerebellum, Brainstem		

Table 2. Base excision repair variations in brain aging and  $pathology^{\#}$ 

<sup>#</sup>This table was quoted from the previous report of Fishel et al. (2007) and partly modified for the purpose of this study.

#### 재료 및 방법 (Materials and Methods)

#### 1. 실험동물 및 처치 (Animals and Treatment)

출생 후 8주 이상 된 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 각 실 험동물은 증류수를 투여한 대조군 (n = 5) 또는 도모이산 (0.75mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 꼬리정맥 내로 투여한 실험군 (n = 20)으로 나누었다. 도모이산 투여 후 각 실험동물은 투명한 장 (chamber)에 넣고 행 동 변화를 관찰하였다. 행동 변화는 기존의 보고를 근거로 비교, 관찰하였다 (표 1 참고). 전신 간대성 발작 (tonic-clonic convulsions)이 1시간 이상 지속 되어 중첩 발작 (status epilepticus)에 이른 동물은 도모이산 투여 후 2시간 이내에 사망하였다 (n =2). 간질을 유발한 후 사망에 이르지 않은 동물을 무 작위로 나누어 도모이산 주사 후 4시간 (n = 6), 24시간 (n = 6), 120시간 (n = 6)이 지난 후 희생시켰다.

#### 2. 조직화학적 염색 및 면역조직화학적 염색

#### (Cytochemistry and immunohistochemistry)

세포구축학적 변화 및 면역조직화학적 염색을 위해 에테르로 마취를 유도 하였다. 이후 좌심실을 통해 heparin (250 unit/ml, 중외제약)을 함유한 생리 식염수로 관류 세척한 다음, 4 % paraformaldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)를 사용하여 관류 고정하였다. 해마를 적출하고 동일한 고정액에 4 ℃ 에서 24시간 정도 후고정하였다. 고정된 조직은 통상의 수세, 탈수, 투명 과 정을 거쳐 파라핀 조직 처리 (Tissue-Tek, Sakura, Japan)를 시행한 후, 5 µ m 두께로 연속 절편을 제작하였다 (Leica RM 2155 rotary microtome, Nussloch, German). 절편은 매 10 매 마다 선택하여 통상적인 Hematoxylin/Eosin (H/E) 염색과 Nissl 염색을 시행하여 조직학적 특성을 확 인하였다.

면역조직화학적 염색을 위해 절편을 0.05M 인산염완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS)에 옮겨 세척한 후 과산화수소 (hydrogen peroxide,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.03 % in methanol)를 첨가하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제시 킨 다음, 0.5 % bovine serum albumin (BSA)과 1.5 % normal horse serum (NHS; Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)이 포함된 PBS 용액 에 1시간 처리한 후 제 1 항체를 반응시켰다. 제 1 항체로 1) mouse anti-APE (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)와 2) rabbit anti-Ogg1 (Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, USA) 항체를 사용 하였다. 제 1 항체를 BSA와 NHS가 포함된 PBS 용액에 각각 1:500으로 희 석하여 4 ℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 제 2 항체는 각각의 제 1 차 항체 에 맞게 상용화된 kit (ImmPRESS<sup>TM</sup> reagent, Vector laboratories)를 이용하 여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 발색은 0.05 % 3'3-diaminobenzidine (Sigma)을 사용하였으며, 에탄올에 탈수한 후 xylene에 투명, polymount (Shandon, Cheshire, UK)에 봉입하였다. 제 1 항체 또는 제 2 항체를 생략하 고 동일한 과정을 시행함으로써 위양성 반응 (false positive reaction)을 확인 하였다.

APE 항체 및 Ogg1 항체에 대한 면역양성 반응을 보인 결과는 광학현미 경 (Olympus BX-50, Olympus Corp., Tokyo, Japan)으로 관찰한 후, 현미경 에 직접 연결된 디지털 카메라 (Olympus C-4040Z, Olympus)를 이용해 상을 얻었다. 이렇게 얻어진 상을 저장하고, Adobe Photoshop (Adobe system, San Jose, CA, USA)을 이용해 상의 밝기 (brightness)와 대조 (contrast)를 분명히 하기 위한 작업을 시행하였다.

#### 3. Western blot 분석 (Western blot analysis)

Western blot을 위해서 예정된 시간에 실험동물을 목 분리 (decapitation) 방법으로 희생시킨 후, 신선한 해마를 드라이아이스와 isopentane이 혼합된 용액에서 급속히 냉각시킨 냉동 상태로 보관시켜 다음 실험에 사용하였다. 조직 0.5 mg을 300 µl 용해 완충액 (lysis buffer; 20 mM Hepes, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM-glycerol phosphate, 1 % triton X-100, 10 % glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 5 mM NaF)으 로 30분 동안 0 ℃에서 용해시킨 후 균질화 (homogenization) 시켰다.

Ultrasonicator를 이용해서 세포를 파괴시켜 원심분리하고 (18,000 rpm, 4 ℃, 15 분), 상층액을 재차 원심분리하였다 (18,000 rpm, 4 ℃, 10 분). 5 분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하였는데, 20 µg의 단백질 을 10 % SDS polyacrylamide gels로 전기영동 시킨 후 단백질들을 Hybon ECL membranes (Amersham-Phamacia, Biotech., Seoul, Korea)로 옮겨서 염색을 하였다. 제 1 항체로는 anti-APE (1:15000, 4 ℃, 24 h), anti-Ogg1 (1:10000, 4 ℃, 24 h)를, anti-β-actin (1:10000, 4 ℃, 24 h) 항체를 대조군으 로 이용하였다. 염색된 단백질을 enhanced chemiluminescence detect system (iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용하여 특정 단백질의 발현 여부를 확 인하였다.

#### 결과 (Results)

#### 1. 간질 모델의 유도(Induction of epilepsy)

증류수를 투여한 대조군과 비교했을 때, 모든 도모이산 투여군에서 발작 이 유도되었다. 도모이산 투여군 중 10%는 중첩 발작으로 도모이산 투여 2시 간 이내에 사망하였다. 나머지 실험동물은 주시 (staring)와 씹기 반응 (mastication)의 1단계 발작부터, 지속적인 할큄 (persistent scratching) 반응, 앞다리 발작 (forelimb clonus), wet-dog shakes 반응의 3단계 발작을 주로 보였고, 전신 간대성 발작과 같은 5단계 반응은 관찰되지 않았다.

정상 대조군과 실험군의 해마를 H/E 또는 Nissl 염색 하에 관찰한 결과 세포구축학적 차이점은 발견할 수 없었다 (Fig. 1).





Fig. 1. Images of the hippocampus stained by Toluidine blue.

CA1 and CA3 regions contained normal pyramidal neurons in control rats (control; B, D) and epileptic rats 120 hours after domoic acid administration (DA120; C, E). Degenerating pyramidal neurons rarely seen by Nissl staining. Scale bar (in A) = 400  $\mu$ m in A; = 100  $\mu$ m in B-D.

# 2. 해마에서 APE 양성반응의 변화 (Change of APE immunolocalization in the hippocampus)

정상 대조군의 해마에서 APE 양성반응세포는 CA 모든 영역의 피라밋세 포층 (stratum pyramidale)에 존재하는 피라밋세포 (pyramidal cell)와 치아이 랑의 과립세포층 (granular layer)의 과립세포 (granule cell)에서 비교적 강하 게 염색되었다. 뿐만 아니라 주 세포층을 제외한 다른 부위의 세포 내 핵에 서도 양성반응을 보였는데, 세포의 크기로 볼 때 신경세포와 신경아교세포 모두에서 양성반응을 보이는 것으로 보였다 (Fig. 2A, 3A, 4A, 5A).

APE 양성반응은 발작이 유도된 후 4 시간이 지나면서 증가하였다 (Fig. 2B, 3B, 4B, 5B). 양성반응세포는 해마의 영역 (CA1 ~ CA3)에 따른 차이를 보이지 않았고, 모든 영역의 뭇모양층 (stratum oriens), 피라밋세포층 (stratum pyramidale), 분자층 (stratum raidatum, stratum lacunosum-moleculare)에서 관찰되었다. 치아이랑의 경우, 과립세포층을 포함 한 모든 층에서 양성반응세포를 관찰할 수 있었다.

발작이 유도된 후 24 시간이 경과하면서 APE 양성반응은 상당히 감소하 였다 (그림 없슴). 양성반응세포의 분포는 피라밋세포층 (stratum pyramidale) 중심으로 다시 전환되었고, CA1에 비하면 CA3의 양성반응이 약 하게 나타났다. 즉, CA1의 경우 피라밋세포층의 양성반응이 유지되는 반면 다른 층의 양성반응세포의 분포가 감소하는 양상을 보이지만, CA3에서는 피 라밋세포층의 양성반응도 매우 미약하게 관찰되었다. 치아이랑의 경우 과립 세포층은 양성반응이 유지되지만, 다른 층의 양성반응세포는 감소하였다.

발작 후 120시간이 경과하였을 때 (Fig. 2C, 3C, 4C, 5C), APE 양성반응 세포의 분포는 해마의 피라밋세포층과 치아이랑의 과립세포층으로 국한되는 양상을 보였고, 주 세포층을 제외한 층의 양성반응은 거의 관찰되지 않았다.



Fig. 2. Immunoreacitivity stained by anti-APE antibody.

Transiently increased expression of APE in the epileptic hippocampus after DA administration was seen by Western blot analysis and immunohistochemistry. Low power images of the hippocampus in animals killed at 4 h (B) after domoic acid-induced epilepsy revealed significant changes, compared with the control (A) and 120 hours after domoic acid administration (C). Scale bar (in C) = 400  $\mu$ m in A-C.



Fig. 3. High power images of CA1 in the hippocampus stained by APE. APE immunoreacitivity was clearly detected in the nuclei of stratum pyramidale of CA1 in the control rats (A). The immunolocalization was seen almost all of the nuclei in the epileptic hippocampus 4 hours after domoic acid administration (B), and then mainly restricted to the stratum pyramidale (C). so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in H = 100  $\mu$ m



Fig. 4. High power images of CA3 in the hippocampus stained by APE. APE immunoreacitivity was clearly detected in the nuclei of stratum pyramidale of CA3 in the control rats (A). The immunolocalization was seen almost all of the nuclei in the epileptic hippocampus 4 hours after domoic acid administration (B), and then mainly restricted to the stratum pyramidale (C). so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in H = 100  $\mu$ m



Fig. 5. High power images of DG in the hippocampus stained by APE. APE immunoreacitivity was clearly detected in the nuclei of granule cell layer of dentate gyrus in the control rats (A). The immunolocalization was seen almost all of the nuclei in the epileptic hippocampus 4 hours after domoic acid administration (B), and then mainly restricted to the granule cells (C). gcl, granule cell layer; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in C = 100  $\mu$ m

# 3. 해마에서 Ogg1 양성반응의 변화 (Change of Ogg1 immunolocalization in the hippocampus)

정상 해마의 대부분 영역에서 Ogg1 양성반응세포는 관찰되지 않았다. 다 만 능선이랑 (구상회, subiculum)과 CA1의 피라밋세포의 세포질에서 약한 양 성반응을 보였다 (Fig. 6A, 7A, 8A, 9A).

발작이 유도된 후 4 시간이 지나면서 Ogg1 양성반응은 증가하였다 (Fig. 6B, 7B, 8B, 9B). 특히 해마의 피라밋세포층과 치아이랑의 과립세포층을 구성 하는 세포의 핵에서 양성반응이 강하게 나타났다. 그러나 주 세포층의 모든 세포가 양성반응을 보이지는 않았고, 해마에 비하면 치아이랑과 CA4 영역의 세포에서 상대적으로 강한 양성반응을 나타냈다.

발작 후 24 시간이 지나면서 Ogg1 양성반응은 대조군과 유사하게 감소하 였다 (그림 없슴). 치아이랑을 비롯한 CA3 영역의 양성반응세포는 찾기 힘들 정도로 감소한 반면, CA1의 피라밋세포층에서는 핵에서 약한 양성반응을 보 이는 피라밋세포를 관찰할 수 있었다.

발작 후 120시간이 경과하여도 더 이상의 변화는 확인할 수 없었다 (Fig. 6C, 7C, 8C, 9C).



Fig. 6. Immunoreacitivity stained by anti-Ogg1 antibody.

Increased expression of Ogg1 in the epileptic hippocampus after domoic acid administration was seen by Western blot analysis and immunohistochemistry. Low power images of the hippocampus in animals killed at 4 h (B) after domoic acid-induced epilepsy revealed significant changes, compared with the control (A) and 120 hours after domoic acid administration (C). Scale bar (in C) = 400  $\mu$ m in A-C.



Fig. 7. High power images of CA1 in the hippocampus stained by Ogg1. While Ogg1 immunoreactivity was only seen in the soma of pyramidal cells of CA1 in control rats (A, counterstained with methyl green), the immunolocalization was shifted to the nuclei and induced in all pyramidal cells of the CA1 4 hours after domoic acid-induced epilepsy (B). The immunoreactivity was decreased thereafter, but still increased compared with the control hippocampus (C). so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in C = 100  $\mu$ m



Fig. 8. High power images of CA3 in the hippocampus stained by Ogg1. While Ogg1 immunoreactivity was rarely seen in CA3 of control rats (A, counterstained with methyl green), the immunolocalization was clearly observed in the nuclei of pyramidal cells of the CA3 4 hours after domoic acid-induced epilepsy (B). The immunoreactivity was disappeared thereafter (C). so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in C = 100  $\mu$ m



Fig. 9. High power images of DG in the hippocampus stained by Ogg1. While Ogg1 immunoreactivity was rarely seen in dentate gyrus of control rats (A, counterstained with methyl green), the immunolocalization was clearly observed in the nuclei of granule cells of the dentate gyrus 4 hours after domoic acid-induced epilepsy (B). The immunoreactivity was disappeared thereafter (C). gcl, granule cell layer; slm, stratum lacunosum-moleculare. Scale bar in C = 100  $\mu$ m

#### 4. 간질이 유도된 해마에서 APE와 Ogg1 총 량의 변화 (Change of APE and Ogg1 in the hippocampus of domoic acid-induced epilepsy)

대조군의 해마와 간질 발작이 유도된 해마에서 APE (Fig. 2)와 Ogg1 (Fig. 6) 단백질의 함량을 비교하기 위해 Western blot 분석을 시행하였다.

정상 흰쥐의 해마에서 APE와 Ogg1이 존재함을 확인할 수 있었다. APE 와 Ogg1 함량은 간질 발작이 유도된 후 4 시간이 경과하였을 때 일시적으로 증가하였다. 간질 발작이 유도된 후 24 시간이후에는 다시 APE와 Ogg1 총 양이 감소하였는데, 120 시간이 지나도 정상 대조군보다 적은 양으로 감소하 지는 않았다.

#### 고찰 (Discussion)

1. 간질 모델의 유도 (Induction of temporal lobe epilepsy)

간질 모델에서 그 목표 부위는 해마를 중심으로 한 관자엽 구역이 된다. 다른 대뇌 구역과 비교할 때 해마는 그 구조가 비교적 단순하여 간질 발작 후 기능적, 형태학적 연구에 유용한 부위로 이용되었고, 카이닌산, 도모이산, pilocarpine, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 등과 같은 다양한 간질 유발 물 질이 동물 실험에 이용되고 있다 (Persinger와 Dupont, 2004). 도모이산은 약 물학적으로 카이닌산 계열에 속하는 단백질로, 카이닌산이 비 NMDA 이온성 글루탐산 수용체인 GluR3/4에 작용하는 반면 도모이산은 GluR5/6/7을 통해 신경세포의 흥분성 신경전달물질을 분비시킨다 (Tryphonas 등, 1990). 또 도 모이산은 새겉질 (신피질, neocortex)과 해마의 신경세포에서 억제성 신경전 달물질인 GABA의 분비를 억제시킨다 (Cunha 등, 2000). 따라서 도모이산 투 여에 의한 중추신경계의 흥분손상은 글루탐산의 분비 증가와 GABA의 분비 감소에 의해 야기되는 것으로 생각되며, 0.5 mg/kg 이상의 용량을 투여하면 주로 해마, 시상 등의 신경세포가 손상되고 (Schmued 등, 1995; Scallet 등, 2005), 성숙한 흰쥐의 LD50은 3 mg/kg 내외로 보고되었다 (Iverson 등, 1989).

본 실험에서는 도모이산을 이용하여 간질 모델을 유발하였다. 도모이산 투여 후 2 마리가 중첩 발작을 보이며 사망하였고 (급성치사율 10%), 나머지 동물의 발작 형태는 Hesp 등 (2007)의 분류 상 3단계에 해당하는 지속적인 할큄 (persistent scratching) 반응, 앞다리 발작 (forelimb clonus), wet-dog shakes 반응을 보였다. 특히 wet-dog shakes가 특징적으로 관찰되는 것은 기존의 보고와도 일치하는 것이었다 (Hesp 등, 2007). 그러나 사망하지 않은 동물의 경우, 다른 화학물질에 의해 유도된 간질모델에서 잘 관찰된다고 알 려진 전신 간대성 발작은 나타나지 않았다. 이상의 반응은 기존의 보고와 유 사한 것으로 간질 모델이 적절히 유발되었음을 보여준다.

반면 조직학적/세포구축학적 염색 결과 특이한 변화를 발견할 수 없었다.

세포자멸사 (apoptosis; programmed cell death)와 같은 세포의 조직학적 변 화는 주로 발작이 유발된 후 5일이 경과하면 최대에 이르고, 이후 세포의 재 생 (regeneration)이 뒤따른다는 보고가 있다 (Ananth 등, 2001). 그러나 본 실험에서는 발작 후 120 시간이 경과한 상태에서도 Nissl 염색과 같은 일반 염색에서는 퇴행성 변화를 보이는 세포를 확인할 수 없었다. 이는 다른 발작 과 달리 보다 낮은 강도의 발작이 주로 일어난 결과로 생각된다.

#### 2. 간질이 유도된 해마에서 APE와 Ogg1 양성반응

# (Immunoreactivity of APE and Ogg1 in the hippocampus of domoic acid-induced epilepsy)

수복되지 못한 DNA 손상이 축적되면 신경세포는 퇴행성 변화를 보이는 성향을 갖는다 (Rass 등, 2007). 염기수복기전은 노화가 진행될수록 약화되는 것으로 밝혀졌고, 이 자체가 노화의 원인이 될 수 있을 뿐만 아니라 신경학 적 질환과도 연관성도 제시되었다 (Rao, 2009). 과거에는 노화가 진행되면 신 경세포의 소실이 동반될 것으로 생각하였으나, 최근 연구 결과에 의하면 신 경세포의 수는 전반적으로 보존되는 반면 특정 부위 또는 특정 신경세포에서 의 변화가 나타나는 것으로 확인되었다 (Brasnievic 등, 2008), 그러나 DNA 손상의 축적과 그에 대한 수복기전의 저하가 노화된 뇌의 일반적인 현상인지 또는 신경세포 특이적 현상으로 나타나는지는 명확히 밝혀지지 않았다. 더욱 이 관자엽간질 모델을 이용한 실험 결과는 해마 내 신경세포의 사멸을 예방 한다고 해서 간질의 재발 (recurrent seizure)을 막을 수는 없었음을 보여준다 2007). 따라서 임상적으로도 초기에 어떤 중재적 (Naegele, 치료 (intervention)가 간질을 억제할 수 있을 지는 확실치 않다. 그렇다고 할지라 도 신경세포의 손상을 줄이고, 신경보호 효과를 증대시킬 수 있는 방법에 대 한 연구는 지속되어야 할 것으로 생각된다.

활성산소 (reactive oxygen species)는 신경세포를 제외한 세포에서 하루 에 2,000 ~ 10,000 염기의 손상을 초래할 수 있고, 더 이상 분열하지 않는 신 경세포의 경우 평생 동안 10<sup>8</sup> 염기의 소실이 발생한다 (Martin, 2008). 신경세 포는 특히 활성산소에 매우 민감하게 반응하여 AP sites, SSBs, DSBs와 같

은 다양한 DNA 손상을 받는다. 따라서 신경세포는 다양한 DNA 수복기전을 갖추고 있을 것으로 예상할 수 있고, 이 중 염기수복은 탈아미노화 된 염기 및 활성산소에 의한 산화성 손상을 입은 알킬화된 염기 수복의 주요 기전으 로 제시되고 있다 (Hazra 등, 2007). 손상 받은 purine 또는 pyrimidine이 인 지되면 DNA N-glycosylase의 활성화에 의해 제거된다. 이후의 반응은 순서 에 따라 분류할 수 있는데, 본 실험에 사용된 것은 염기수복의 시작 단계에 작동하는 것으로 첫째, 손상된 purine에 작용하는 Ogg1은 8-oxoG와 8-OHdG를 제거하고, 둘째, Ogg1 등의 효소가 작용한 이후 분절화 된 당체 의 5' 부위가 APE에 의해 제거된다. APE는 염기수복에 관여할 뿐만 아니라 세포자멸사와 관련된 인자인 p53도 활성화 시키는 것으로 알려져 있다 (Jayaraman 등, 1997).

동물 모델을 이용한 기존의 많은 연구들에서 다양한 DNA 수복 기전이 간질에 의한 손상에 대해 뇌를 보호할 수 있다고 기술하고 있지만 (Naegele, 2007), 임상적으로는 특별한 의의를 갖지 못하였다. 따라서 간질에 동반된 흥 분 손상으로 유발되는 DNA 손상의 형태를 명확히 하고, 더 효과적인 DNA 수복 기전을 확인할 수 있다면 간질 뿐만 아니라 다른 신경학적 질환에도 보 다 효과적인 치료 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. 한편, Quach 등 (2005)은 흥분손상에 의해 해마의 신경세포에서 DNA 수복 기전이 활성화 되기는 하지만 이 반응이 광범위한 DNA 손상을 수복하거나 p53의 활성화를 억제하기에 충분하지 못했고. 그 결과 DNA 수복 기전만으로는 흥분손상에 의한 신경세포의 사멸을 예방할 수 없다고 보고하였다. 이 결과는 DNA 수복 기전에 대한 연구가 의미가 없다고 비춰질 수도 있는 것이지만, 글루탐산에 의한 손상은 신경세포 내로 칼슘의 유입에 의하거나 산화성 스트레스 또는 자유기에 의한 손상에 기인한다고 한 기존의 보고 (Naegele, 2007)를 근거로 하면, 신경세포의 손상에 대한 반응은 DNA 수복기전 외에도 다양한 신경보 호 효과와 관련된 기전이 필요할 것이다. 따라서 DNA 수복 기전 외에도 신 경세포를 보호할 수 있는 인자들과 DNA 수복 기전 사이의 연관성에 대한 연구도 지속되어야 할 것으로 생각된다.

DNA 수복 기전은 신경계의 부위와 병적 상황에 따라 다양한 반응을 보 인다. 해마로 그 목표부위를 제한한다고 하더라도 간질 모델 (Quach 등,

2005)과 젊은 쥐의 고산소혈증 (Edwards 등, 1998)의 경우는 APE가 증가하 였지만, 허혈손상 (Gillardon 등, 1997; Edwards 등, 1998; Fujimura 등, 1999) 이나 냉손상 (cold injury-induced brain trauma; Morita-Fujimura 등, 1999) 이 야기된 경우는 APE가 감소하였다. Ogg1의 경우는 APE와 또 다른 결과 를 보인다. 중추신경계통의 허혈-재관류 손상 (Lin 등, 2000)이나 파킨슨질환 (Fukae 등, 2005)의 경우는 손상이 유발된 곳에서 Ogg1의 발현이 증가하였으 나, 노화 (Imam 등, 2005)된 소뇌와 뇌줄기(뇌간, brainstem)에서는 Ogg1의 발현이 감소하였다. 따라서 비교적 단순한 신경계통의 병리 모델에서 DNA 수복 기전의 변화를 확인할 필요가 있어 본 실험에서는 목표 부위를 해마로 국한하고자 하였다. 그 결과 APE와 Ogg1 모두가 간질에 의해 활성화됨을 보여주고 있다. 뿐만 아니라 형태학적 연구 결과 CA1과 CA3의 세포에서 APE와 Ogg1의 발현이 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

해마의 각 영역을 CA구역으로 세분하는 것은 각 영역별로 손상에 대한 취약성 (vulnerability)이 다르다고 보고되었기 때문이다. 손상의 종류에 따라 손상에 취약한 구역이 서로 다르게 보고되기도 하지만, 본 실험과 같은 간질 의 경우 CA1의 세포가 주로 생존하는 반면 CA3의 세포는 사망하기 쉬운 것 으로 보고되고 있다 (Zhang 등, 2009). 따라서 기존의 보고는 주로 CA1의 세 포들이 왜 생존할 수 있는가 (Marti 등, 2002; Dinocourt 등, 2003; Cavazos 등, 2004;; Sanon 등, 2005; Wittner 등, 2005; Liu 등, 2007) 또는 CA3의 세 포들이 왜 사멸하고 사멸한 이후 재구축(reorganization)은 어떻게 이루어지는 가 (Belloni 등, 1999; Neema 등, 2005; Kajitani 등 2006; Ma 등, 2006; Chuang 등, 2009)라고 하는 두 주제에 집중되어 있다. 본 실험 결과는 APE 와 Ogg1에 따라 다른 결과를 보인다. 즉, APE는 CA 영역에 따른 변화는 잘 관찰되지 않는 반면 간질이라고 하는 흥분손상에 대한 반응이 시간에 따라 분명하게 나타났지만, Ogg1은 손상에 대한 반응이 CA1에서 CA3보다 지속적 으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 간질이 유도되면 DNA 수 복기전의 활성이 야기되는데, 이 중 CA3 영역이 상대적으로 더 약한 양성반 응을 보이는 구역으로 생각된다. 이러한 반응은 간질 모델에서 CA1의 세포 들이 생존하고 CA3의 세포들은 사멸하는지 그 이유를 설명할 수 있는 결과 라고 생각된다. 다만 정상 대조군의 해마에 APE는 풍부하게 존재하지만, Ogg1은 CA1에만 미약하게 존재하고 있다가 손상에 의해 활성화되는 것으로

확인되었다. 따라서 어떤 손상에 의해 활성화되는 특이적 DNA 수복 기전이 분명히 존재할 것이고, 본 실험에 이용한 DNA 수복 기전 외에도 간질에 보 다 특이적으로 작용할 수 있는 DNA 수복 단백질이 있을 것으로 생각된다. 이러한 질환 특이적 DNA 수복 기전을 밝히기 위한 노력이 계속되면, 임상적 으로 신경세포의 사멸을 예방하거나 보호할 수 있는 새로운 치료법을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험과 가장 유사한 보고는 Quach 등 (2005)이 카이닌산을 투여하여 유도한 간질모델에서 APE(Ref-1)와 XRCC1이 발현이 유도된다는 것이었다. 그러나 결과적으로 이렇게 증가한 DNA 수복기전이 간질에 의해 손상받은 신경세포를 보호할 수는 없었다. 본 실험에서도 간질에 의해 APE와 Ogg1이 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 일반적으로 간질이 유발된 지 5일 이상 이 지나서 신경세포의 소멸이 나타나는 것으로 알려져 있기 때문에 (Ananth 등, 2001) 일시적인 DNA 수복 기전의 증가가 신경세포의 소멸과 같은 극단 적인 변화를 막을 수 있는지에 대한 해석은 다양하게 나타날 수 있을 것으로 생각된다. 정상 대조군의 경우 Ogg1에 비해 APE가 상대적으로 많은 양이 포함될 수 있다고 보이고, 간질에 의한 흥분성 손상이 야기될 경우 DNA 수 복 기전이 활성화되는 것은 분명하지만 APE와 Ogg1의 양성반응세포가 분포 하는 양상이 다르게 나타난다는 점은 이후 세포의 소멸과 같은 최종 변화에 는 신경세포 또는 해마의 CA 영역에 따라 특이한 DNA 수복 기전이 활성화 될 것임을 시사한다.

DNA 손상이 다양한 형태로 나타나는 것과 마찬가지로 DNA 수복 기전도 그 기능에 따라 다양하게 분류할 수 있다. 간질모델을 유도한 본 실험에서는 염기수복 중에서도 BER계에 속하는 APE와 Ogg1을 이용하여 그 의의를 확 인하고자 하였으나, 이전에도 신경계통의 다양한 질환 모델에서 hMTH1 (Furuta 등, 2001), 재조합수복계의 DNA-PKcs (Neema 등, 2005), MMR계의 MSH2 (Belloni 등, 1999) 등과 같은 다양한 물질들의 역할에 대한 시도가 있 었다. 본 실험의 결과를 포함한 이상의 보고는 공통적으로 흥분손상을 유발 하면 DNA 수복 기전이 활성화되고, 신경계통의 퇴행성 질환은 DNA 수복 기전의 결여와 연관되어 있다는 사실을 보여준다. 뿐만 아니라 이러한 특징 은 다른 영역에 비해 CA3 영역에서 보다 분명하게 나타난다.

이러한 보고의 연장선에서 볼 때, 간질은 세포의 사멸을 초래할 뿐만 아

니라 신경세포와 아교세포에서 신경보호와 관련된 반응을 야기할 것으로 생 각된다 (Naegele, 2007). 화학물질을 사용한 간질모델의 경우, 신경손상은 글 루탐산 수용체를 통해 나타나고, 신경세포 내 칼슘 유리에 의한 것이었기 때 문에 이에 대한 보호 효과를 확인하기 위해 NMDA 수용체 길항체 (Brandt 등, 2003) 또는 칼슘결합단백 (Bouilleret 등, 2000; Sanon 등, 2005; Wittner 등, 2005; Liu 등, 2007; Zhang 등, 2009)의 변화를 측정한 것이 주를 이루었 다. 뿐만 아니라 이러한 기전과의 연관성이 증명되지 않는다고 하더라도 일 반적인 병리 또는 노화 등에서 신경보호에 긍정적인 효과를 갖을 것으로 생 각되는 neurosteroid (Chang 등, 2009; 2007) 또는 melatonin (Ananth 등, 2003)과 같은 물질의 효과가 연구되었다. 그러나 본 실험과 같이 DNA 손상 에 의한 신경세포의 사멸을 막을 수 있는 DNA 수복 기전에 대한 연구는 시 작단계에 불과하다. 따라서 보다 세밀한 연구를 기획하고 질병 특이적 DNA 수복 기전과 DNA 수복 단백질을 규명하는 일이 필요할 것으로 생각된다. 이 러한 과정을 거친다면 임상적으로도 간질의 치료 또는 예방에 DNA 수복 단 백 또는 관련 유전자를 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 국문 초록

#### 간질을 유도한 흰쥐의 해마에서 염기수복단백의 변화

#### 조 경 원

#### (지도교수: 김 진 호)

#### 조선대학교 대학원 의학과

간질의 주 병리기전 중 하나로 활성산소나 산화성 스트레스에 의한 DNA 손상이 제시되고 있다. 따라서 DNA 손상을 정상화시킬 수 있는 다양한 DNA 수복기전 중 염기수복기전의 기능을 추정하기 위해 도모이산 (0.75mg/kg, 정맥 내 주사)을 이용하여 간질 모델을 유도하였다. 간질 발작이 유발 된 후 4시간, 24시간, 120시간까지 해마에서 APE와 Ogg1의 변화를 관 찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 도모이산 투여로 모든 실험동물에서 발작이 유도되었다. 이 때 기 존의 화학물질인 카이닌산이나 pilocarpine에 의한 발작에 비해 응시 (staring)와 지속적인 할큄 반응 (persistent scratching)과 같은 낮은 정도의 발작 반응이 주로 관찰되었다.

2. 정상 대조군의 해마에서 APE는 주 세포층을 중심으로 다양한 층 에서 양성반응을 보였다. 간질이 유도된 후 4시간이 경과하였을 때 APE 양 성반응은 해마 내 거의 모든 세포에서 관찰할 수 있을 정도로 증가하였지만, 24시간이 경과한 후부터는 정상 대조군과 유사하게 감소하였다. 간질이 유도 된 후 120시간이 지난 후에는 정상 대조군과 총 양의 변화는 없어 보였지만, 양성반응세포는 정상 대조군에 비해서도 주 세포층으로 국한되는 것을 확인 할 수 있었다.

3. 정상 대조군의 해마에서 Ogg1은 거의 관찰되지 않았다. 다만 CA1 영역에서 약한 양성반응을 보였다. 간질이 유도된 후 4시간이 경과하였 을 때는 해마의 주 세포층에서 모두 양성반응을 보였고, 총 양도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 간질이 유도된 후 24시간이 경과하면 CA1의 피라밋세포를 제외한 거의 대부분의 양성반응은 소실되었다.

APE를 이용한 결과는 카이닌산을 이용한 간질모델의 결과와 거의 유사한 것이었으나, 동시에 Ogg1의 활성화가 야기되었다는 결과는 아직까지 보고된 바 없다. 특히 해마의 CA1 영역에서 염기수복을 담당하는 APE와 Ogg1이 모두 양성반응을 보이는 반면, CA3 영역은 상대적으로 Ogg1의 양성반응이 매우 미약하게 관찰되었다는 점은 영역 특이적인 반응을 유발할 수 있음을 시사한다. 이상의 결과는 흥분성 손상에 의해 유발된 DNA 손상은 염기수복 기전을 활성화시킬 수 있으며, 이렇게 활성화된 DNA 수복 기전에 의해 심각 한 신경세포의 손상을 예방할 수 있음을 보여준다. 다만 다양한 DNA 수복 기전이 존재하기 때문에 질병 또는 중추신경계의 각 영역에 특이적으로 작용 하는 DNA 수복기전을 찾기 위한 노력은 계속되어야 할 것으로 생각된다.

#### 참고문헌 (References)

Ananth C, Thameem Dheen S, Gopalakrishnakone P, Kaur C. Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. J Neurosci Res 2001; 66: 177-90.

Ananth C, Gopalakrishnakone P, Kaur C. Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats. Hippocampus 2003; 13: 375–87.

Brandt C, Potschka H, Loscher W, Ebert U. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 2003; 118: 727–40.

Brasnjevic I, Hof PR, Steinbusch HW, Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. DNA repair. 2008; 7: 1087–97.

Belloni M, Uberti D, Rizzini C, Ferrari-Toninelli G, Rizzonelli P, Jiricny J, Spano P, Memo M. Distribution and kainate-mediated induction of the DNA mismatch repair protein MSH2 in rat brain. Neuroscience 1999; 94: 1323–31.

Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic

models of partial-onset epilepsy. Neuroscience 2004; 126: 677-88.

Chang IY, Kim JH, Hwang G, Song PI, Song RJ, Kim JW, Yoon SP. Immunohistochemical detection of StarD6 in the rat nervous system. Neuroreport 2007; 18: 1615–9.

Chang IY, Kim JK, Lee SM, Kim JN, Soh J, Kim JW, Yoon SP. The changed immunoreactivity of StarD6 after pilocarpine-induced epilepsy. Neuroreport 2009. [Epub ahead of print]

Chuang YC, Chen SD, Liou CW, LIn TK, Chang WN, Chan SH, Chang AY. Contribution of nitric oxide, superoxide anion, and peroxynitrite to activation of mitochondrial apoptotic signaling in hippocampal CA3 subfield following experimental temporal lobe status epilepticus. Epilepsia 2009; 50: 731–46.

Colman JR, Nowocin KJ, Switzer RC, Trusk TC, Ramsdell JS. Mapping and reconstruction of domoic acid-induced neurodegeneration in the mouse brain. Neurotoxicol Teratol 2005; 27: 753–67.

Coulter DA, McIntyre DC, Lőscher W. Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? Brain Pathol 2002; 12: 240–56.

Cunha RA, Malva JO, Ribeiro RA. Pertussis toxin prevents presynaptic inhibition by kainate receptors of rat hippocampal [(3)H]GABA release. FEBS Lett 2000; 469: 159–62.

Debonnel G, Weiss M, de Montigny C. Reduced neuroexcitatory effect of

domoic acid following mossy fiber denervation of the rat dorsal hippocampus: further evidence that toxicitiy of domoic acid involves kainate receptor activation. Can J Physiol Pharm 1989; 67: 904–8.

Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Exclapez M. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. J Comp Neurol 2003; 459: 407–25.

Edwards M, Rassin DK, Izumi T, Mitra S, Perez-Polo JR. APE/Ref-1 responses to oxidative stress in aged rats. J Neurosci Res 1998; 54: 635-8.

Edwards M, Kent TA, Rea HC, Wei J, Quast M, Izumi T, Mitra S, Perez-Polo JR. APE/Ref-1 responses to ischemia in rat brain. Neuroreport 1998; 9: 4015-8.

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.

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.

Fukae J, Takanashi M, Kubo S, Nishioka K, Nakabeppu Y, Mori H, Mizuno Y, Hattori N. Expression of 8-oxoguanine DNA glyxosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. Acta Neuropathol 2005; 109: 256–62.

Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y, Iwaki T. Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. Neuroreport 2001; 12: 2895–9.

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.

Guachh N, Chan T, Lu TA, Schreiber SS, Tan Z. Induction of DNA repair proteins, Ref-1 and XRCC1, in adult rat brain following kainic acid-induced seizures. Brain Res 2005; 1042: 236–40.

Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. DNA Repair 2007; 6: 470–80.

Hesp BP, Clarkson AN, Sawant PM, Kerr DS. Domoic acid preconditioning and seizure induction in young and aged rats. Epilepsy Res 2007; 76: 103–12.

Imam SZ, Karahalil B, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner. Neurobiol Aging 2006; 27: 1129–36.

Iverson F, Truelove J, Nera E, Tryphonas L, Campbell J, Lok E. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract.

Food Chem Toxicol 1989; 27: 451-6.

Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, Curran T, Xanthoudakis S, Prives C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p5. Genes Dev 1997; 11: 558-70.

Kajitani K, Yamaguchi H, Dan Y, Furuichi M, Kang D, Nakabeppu Y. MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, suppresses the accumulation of oxidative damage of nucleic acids in the hippocampal microglia during kainate-induced excitotoxicity. J Neurosci 2006; 26: 1688–98.

Lado FA, Sankar R, Lowenstein D, Moshe SL. Age-dependent consequences of seizures: relationship to seizure frequency, brain damage, and circuitry reorganization. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2000; 6: 242–52.

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.

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 1993; 362: 709–15.

Liu JX, Cao X, Tang YC, Liu Y, Tang FR. CCR7, CCR8, CCR9 and CCR10 in the mouse hippocampal CA1 area and the dentate gyrus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. J Neurochem 2007; 100:

1072-88.

Ma DL, Tang YC, Chen PM, Chia SC, Jiang FL, Burgunder JM, Lee WL, Tang FR. Reorganization of CA3 area of the mouse hippocampus after pilocarpine induced temporal lobe epilepsy with special reference to the CA3–septum pathway. J Neurosci Res 2006; 83: 318–31.

Marti E, Blasi J, Ferrer I. Early induction of secretoneurin expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat and gerbil hippocampus. Hippocampus 2002; 12: 174–85.

Martin LJ. DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. J Neuropathol Exp Neurol 2008; 67: 377–87.

Naegele JR. Neuroprotective strategies to avert seizure-induced neurodegeneration in epilepsy. Epilepsia 2007; 48(suppl 2): 107–117.

Neema M, Navarro-Quiroga I, Chechlacz M, Gilliams-Francis K, Liu J, Lamonica K, Lin SL, Naegele JR. DNA damage and non-homogenous end joining in excitotoxicity: neuroprotective role of DNA-PKcs in kainic acid-induced seizures. Hippocampus 2005; 15: 1057-71.

Persinger MA, Dupont MJ. Emergence of spontaneous seizures during the year following lithium/pilocarpine-induced epilepsy and neuronal loss within the right temporal cortices. Epilepsy Behav 2004; 5:440–445.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32: 281–94.

- 41 -

Rao KS. Genomic damage and its repair in young and aging brain. Mol Neurobiol 1993; 7: 23–48.

Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. Indian J Biochem Biophys 2009;46:9–15.

Rass U, Ahel I, West SC. Defective DNA repair and neurodegenerative diesease. Cell 2007; 130: 991–1004.

Sanon N, Carmant L, Emond M, Congar P, Lacaille JC. Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differently vulnerable to excitotoxicity. Epilepsia 2005; 46: 837–48.

Scallet AC, Schmued LC, Johannessen JN. Neurohistochemical biomarkers of the marine neurotoxicant, domoic acid. Neurotoxicol Teratol 2005; 27: 745–52.

Schmued LC, Scallet AC, Slikker JW. Domoic acid-induced neuronal degeneration in the primate forebrain revealed by degeneration specific histochemistry. Brain Res 1995; 695: 64–70.

Tryphonas L, Truelove J, Nera E, Iverson F. Acute neurotoxicity of domoic acid in the rat. Toxicol Pathol 1990; 18: 1–9.

Wittner L, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z.Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. Brain 2005; 128: 138–52.

Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak V, Quilliam MA, Ragan MA, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Gilgan SM, Richard DJA, Dewar D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can J Chem 1989; 67: 481–90.

Zhang S, Khanna S, Tang FR. Patterns of hippocampal neuronal loss and axon reorganization of the dentate gyrus in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J Neurosci Res 2009; 87: 1135–49.

저작물 이용 허락서					
학 과	의학과	학 번	20047416	과 정	박 사
성 명	한글 : 조 경	원 한	· - 문 : 曺 炅 垣	영문 :	Cho Kyung Won
주 소	경남 창원시	상남동 다	I동APT 118-904		
연락처	E-mail : srn	euro@nave	er.com		
누ㅁ피오	한글 : 간질을	을 유도한	흰쥐의 해마에서	염기수	복단백의 변화
는군제즉	영문 : Chang epileptic hi	e of bas ppocampu	e excision repai s	r prote	ins in the
본인이 저작물을 (	저작한 위의 저 ))용할 수 있도록	작물에 대 하락하고	하여 다음과 같은 걸 2 동의합니다.	조건 아래	조선대학교가
		- 다	00 -		
<ol> <li>저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.</li> <li>위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.</li> <li>배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.</li> <li>저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의 사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.</li> <li>해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에 는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.</li> <li>조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타 인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.</li> <li>소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.</li> </ol>					
동의여부 : 동의( 0 ) 반대( )					
2009 년 8 월					
저작자 : 조 경 원 (인)					
조선대학교 총장 귀하					