

# 대동맥협착 고혈압 백서에서 산화환원조절단백 APE1/Ref-1의 발현변화

송선현<sup>1,\*</sup>, 조은정<sup>1,\*</sup>, 박명수<sup>1,\*</sup>, 이유란<sup>1</sup>, 주희경<sup>1</sup>, 강건<sup>1</sup>, 강신광<sup>2</sup>, 최성아<sup>1</sup>, 전병화<sup>1</sup>

충남대학교 의학전문대학원 <sup>1</sup>생리학교실, <sup>2</sup>흉부외과학교실

## Redox Regulating Protein APE1/Ref-1 Expression is Increased in Abdominal Aortic Coarctation-induced Hypertension Rats

Sun Heon Song, MD<sup>1,\*</sup>, Eun Jung Cho<sup>1,\*</sup>, Myoung Soo Park<sup>1,\*</sup>, Yu Ran Lee<sup>1</sup>, Hee Kyoung Joo<sup>1</sup>, Gun Kang<sup>1</sup>, Shin Kwang Kang, MD<sup>2</sup>, Sunga Choi, PhD<sup>1</sup>, Byeong Hwa Jeon, MD<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Physiology, <sup>2</sup>Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Aim of study is designed to investigate whether apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) expression is changed in abdominal aortic coarctation models. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were randomly assigned with abdominal aortic coarctation, repaired group, sham, and control groups. Endothelial function was assessed with endothelium-dependent relaxations. Detection of superoxide anion and lipid peroxidation was performed by lucigenin chemiluminescence and thiobarbituric acid-reactive substances assay. APE1/Ref-1 expression was measured with Western blot and immunohistochemistry. **Results:** In anesthetized condition, the abdominal aortic coarctation rats showed hypertension as systolic/diastolic arterial pressure of 171/114 mm Hg, compared with 114/94 mm Hg of control. Endothelium-dependent relaxations were significantly impaired in the aortic coarctation which was recovered in 1 week after coarctation repair. Superoxide production and lipid peroxidation were elevated in aortic coarctation rats. In immunohistochemistry, APE1/Ref-1 expressions were increased at aorta and kidney in aortic coarctation rats. Increased APE1/Ref-1 expression in aorta was recovered by repair of coarctation. **Conclusions:** Taken together, it suggests that APE1/Ref-1 expression was increased in aortic coarctation-induced hypertensive rats, suggesting a biomarker for hypertension. Impaired endothelium dependent relaxation in the aortic coarctation can be modulated by repair of coarctation or the modulation of blood pressure.

(J Korean Soc Hypertens 2012;18(3):126-135)

**Key Words:** Hypertension; Aortic coarctation; Kidney; Endothelium; Oxidative stress

### 서론

논문접수일: 2012.8.27, 수정완료일: 2012.9.14, 게재승인일: 2012.9.17

교신저자: 전병화

주소: 대전시 중구 문화로 282 충남대학교 의학전문대학원 생리학교실

Tel: 042) 580-8214, Fax: 042) 585-8440

E-mail: bhjeon@cnu.ac.kr

\*These authors are equally contributed in this study.

산화환원조절단백-1(apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1, APE1/Ref-1)은 1991년 유전인자가 동정되었다.<sup>1,2)</sup> APE1/Ref-1은 산화환원조절 부위와 DNA 수리 부위를 포함한 318개의 아미노산으로 구성된 다기

능 단백질로 세포에서 DNA 손상 시 DNA 복구에 중심적인 역할을 함으로써 세포 내 유전인자의 안정성(genome stability) 유지에 필수적인 단백질로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup>

혈관세포의 활성산소종 생성증가는 일산화질소의 생물학적 이용성(bioavailability)을 감소시킴으로써 혈관내피세포의 이완반응을 억제시킨다. 따라서 활성산소종의 생성증가는 혈관내피세포의 기능이상에 주요한 결정요인으로 인정되고 있다.<sup>5-7)</sup> 복부대동맥의 협착, 특히 신동맥 상부에서의 대동맥협착은 신장의 관류감소 및 레닌활성증가에 기인하여 고혈압을 유발시키는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>8,9)</sup>

심혈관계 기능과 관련하여 APE1/Ref-1의 발현감소는 혈압상승과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>10)</sup> 최근 APE1/Ref-1은 레닌합성을 억제하는 것으로 보고되어 APE1/Ref-1이 혈압조절과 밀접한 관련성이 있는 것으로 생각하고 있다.<sup>11)</sup> 또한 고혈압 환자에서 APE1/Ref-1 유전인자의 변형이 보고되어 본태성 고혈압의 유전자 마커로 생각되고 있다.<sup>12)</sup> 그러나 고혈압에서 APE1/Ref-1의 발현변화에 대한 보고는 국내외적으로 없는 실정이다. 본 연구에서 고혈압 동물모델로는 고혈압의 유전적인 요소를 배제하기 위하여 대동맥협착증 동물모델을 이용하였다. 본 연구에서는 혈압상승 시 APE1/Ref-1의 발현변화, 혈관내피세포의 기능변화, 활성산소종 및 지질과산화의 생성변화에 대하여 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 고혈압 동물의 유도

실험동물은 Sprague-Dawley 백서를 사용하였으며, 체중 200-250 g의 동종 수컷을 사용하였다. 실험군은 대동맥협착군, 협착 후 제거군, Sham군 및 정상 대조군으로 나누어 진행하였으며, 충남대학교 실험동물윤리위원회에 승인을 받아 연구를 진행하였다. 동물의 마취는 ketamine (80 mg/kg)과 xylazine (12 mg/kg)을 혼합하여 복강 주사하였다. 대동맥협착군은 개복 후 스테인리스와이어(외경, 0.40 mm)를 좌우측 신동맥 사이의 복부대동맥에 위치시켜 유도하였으며,<sup>13)</sup> 협착 후 치료군은 대동맥협착을 1주

간 지속 후 협착 부위의 실크매듭을 제거한 후 1주간 회복시킨 군을 이용하였다.<sup>14)</sup> Sham 대조군은 실제적으로 대동맥의 협착을 유도하지 않고 동일한 과정으로 개복수술만 시행하였다. 동물은 온도조절 및 12시간의 명암조건의 광도조절 공간에서 사육하였다. 혈압 및 심박수의 측정은 좌측 경동맥에 PE-50관을 삽입하여 압력변환기를 이용하여 측정하였으며 수축기혈압, 이완기혈압, 평균 동맥압 및 맥압의 분석은 Chartpro 소프트웨어(Adinstruments, Colorado Springs, CO, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 2. Western blot

APE1/Ref-1 단백질의 정량적 분석은 Western blot 기법을 이용하였다.<sup>10,15)</sup> 각 기관에서 추출된 약 200 mg 조직은 조직분쇄기를 사용하여 균질액을 얻었다. 20 µg의 단백질 균질액을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하였다. 전기영동한 겔을 polyvinylidene difluoride 막에 이동시킨 후 5% non-fat dry milk로 비특이적 반응을 차단하였다. 1차 항체인 anti-APE1/Ref-1 (Abcam, Cambridge, MA, USA)을 Tris-buffered saline-Tween (0.1% Tween 20)에 1/1,000로 희석하여 넣고 4°C에서 16시간 동안 배양하였다. Horseradish peroxidase 2차 항체를 1/2,000로 희석하여 넣고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 electrochemiluminescence detection system (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 도포한 후 암실에서 필름에 감광시켜 현상하였다. 단백질 양의 보정은 β-actin 단백질의 양을 확인함으로써 동량임을 제시하였다.

### 3. Superoxide 생성량 측정

시료의 superoxide의 측정은 lucigenin (*N,N'*-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate)을 이용하여 수행하였다.<sup>10,16)</sup> Lucigenin은 superoxide와 반응하여 발광하는 시약으로 사용 전 Krebs-HEPES 완충액(NaCl 100 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.9 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.03 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Na-HEPES 20 mM, pH 7.4)에 넣어 신선하게 만들어 사용하였다. 각 실험 개체에서 분리한 대

동맥 절편을 5  $\mu$ M lucigenin이 포함된 Krebs-HEPES 완충액에 넣고, 100  $\mu$ M nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)를 넣어 2분간 발광변화를 측정하였다. 각 실험은 독립적으로 3회 수행되었으며 기저 값을 보정한 뒤 각 시료의 발광 값으로 제시하였다.

#### 4. 지방과산화 측정

혈장 내 지질의 과산화 정도는 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)를 이용한 키트(ZeptoMetrix, Buffalo, NY, USA)로 측정하였다.<sup>17)</sup> 시험관에 100  $\mu$ L 혈장과 SDS용액을 섞은 다음 2.5 mL TBARS를 포함한 완충액을 넣고 중탕하여 60분간 반응시켰다. 얼음 위에서 반응을 정지시키고 10분간 방치한 다음 1,200  $\times$ g로 15분간 원심분리하여 핑크색의 반응액만을 얻었다. 각 시료들을 동일한 부피만큼 취하여 다공 플레이트로 옮긴 후 형광광도계(530 ex/550 em)로 형광의 세기를 읽었다. 정량적인 분석을 위하여 0-4 nmoL의 표준곡선을 얻고자 키트에서 제공한 malondialdehyde (MDA)를 연속 희석하여 시료와 동시에 반응시켜 농도에 따른 형광 값을 얻었다. 각 시료의 MDA 농도는 표준곡선에서 얻은 값에 대입하여 산출하였으며 시료 간의 차이를 최소화하기 위하여 단백질 양으로 그 차이를 보정하였으며 각 시료가 나타내는 지질의 산화 정도는 nmoL/mL/mg로 표현하였다.

#### 5. 혈관내피 의존성 이완반응 측정

혈관내피 의존성 이완반응은 실험동물의 흉부대동맥을 이용하여 측정하였다.<sup>14)</sup> 흉부대동맥을 적출 후 주위지방 및 조직을 제거하였으며 혈관 직경 2-3 mm의 환형절편을 만들어 이용하였다. 혈관절편은 Kreb's 완충용액(NaCl 100 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.9 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.03 mM, NaHCO<sub>2</sub> 25 mM, pH 7.4)이 들어 있는 실험용기에 넣은 후 혈관장력기에 연결하였다. 혈관절편은 실험용기에서 1시간 동안 안정시켰으며 내피 의존성 이완반응은 phenylephrine (300 nM)으로 수축시킨 후 acetylcholine을 농도별 처리하여 phenylephrine으로 얻은 수축 값의 이완율로 나타내었다.

#### 6. 면역조직염색

각 조직은 파라핀 블록에서 3  $\mu$ m 두께의 박절표본을 만들어 사용하였다. 조직절편은 1% 소혈청알부민이 포함된 완충용액으로 2시간 반응시킨 후 APE1/Ref-1 항체(희석배율 1:600, Novus)와 반응시켰다.<sup>15)</sup> 0.3% 과산화수소수 용액으로 15분간 처리하여 endogenous peroxidase를 제거하였으며 2차 항체로 상온에서 1시간 반응하였다. 3,3-diaminobenzidine로 발색한 다음 hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

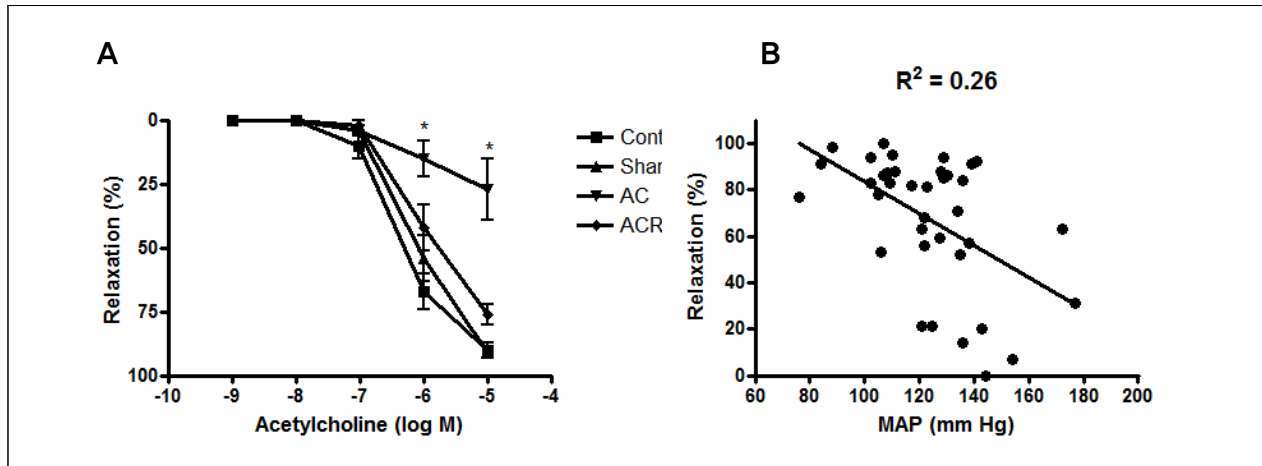
Table 1. Hemodynamic parameters in the aortic coarctation rats

	Control (n = 6)	Sham (n = 8)	AC (n = 9)	ACR (n = 10)
SBP (mm Hg)	114 $\pm$ 10	131 $\pm$ 7	171 $\pm$ 11*	141 $\pm$ 6 <sup>†</sup>
DBP (mm Hg)	94 $\pm$ 7	101 $\pm$ 5	114 $\pm$ 6*	103 $\pm$ 3 <sup>†</sup>
MAP (mm Hg)	104 $\pm$ 8	116 $\pm$ 6	139 $\pm$ 8*	120 $\pm$ 4 <sup>†</sup>
PP (mm Hg)	20 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	58 $\pm$ 6*	39 $\pm$ 4 <sup>†</sup>
HR (bpm)	256 $\pm$ 11	274 $\pm$ 19	260 $\pm$ 13	238 $\pm$ 9
BW (g)	288 $\pm$ 18	281 $\pm$ 10.8	254 $\pm$ 14*	255 $\pm$ 17
HW (g)	0.83 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.05*	0.84 $\pm$ 0.04 <sup>†</sup>
HW/BW	0.29 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.01*	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>†</sup>

Sham, sham-operated group; AC, aortic coarctation; ACR, repair group of aortic coarctation; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; PP, pulse pressure; HR, heart rate; BW, body weight; HW, heart weight.

\*p < 0.05 Sham vs. AC.

<sup>†</sup>p < 0.05 AC vs. ACR.



**Fig. 1. Endothelium-dependent relaxations in the abdominal aortic coarctation rats.** (A) Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine in the abdominal aortic coarctation rats. Endothelium-dependent relaxation in the aortic rings was evoked by the treatment of acetylcholine at the range of 1 nM to 10 mM. Relaxations are expressed as a relaxation percentage of the precontracted tension obtained by phenylephrine. Each value is mean  $\pm$  SEM (No. 6–9). Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was impaired in the aortic segments of aortic coarctation (AC) compared with sham controls. Repair group of aortic coarctation (ACR),  $p < 0.05$  vs. AC. Each data showed mean  $\pm$  SEM (No. 5–6). (B) Correlation between mean arterial blood pressure (MAP) and endothelium-dependent relaxations in rats. Correlation coefficient was calculated with Prism ver. 4.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

## 결 과

### 1. 대동맥협착 및 협착 제거군에서 혈류 역학변화 및 심장체중의 변화

복부대동맥의 협착 유도 및 협착을 제거한 동물에서 혈압변화를 규명한 결과, 대동맥협착 동물에서 수축기혈압과 이완기혈압은 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며 협착을 제거한 경우 혈압이 다시 정상화되는 결과를 얻었다(Table 1). 특히 대동맥협착 동물에서 혈압의 증가는 수축기혈압 및 맥압의 현저한 증가를 확인할 수 있어 대동맥협착 동물모델에서 고혈압은 고립성 수축기고혈압으로 판단되었다. 대동맥협착 동물모델에서 체중당 심장의 무게는 정상동물보다 유의한 증가를 보여 심장비대증이 확인되었으며 협착을 제거한 군에서는 회복되는 경향을 확인할 수 있었다.

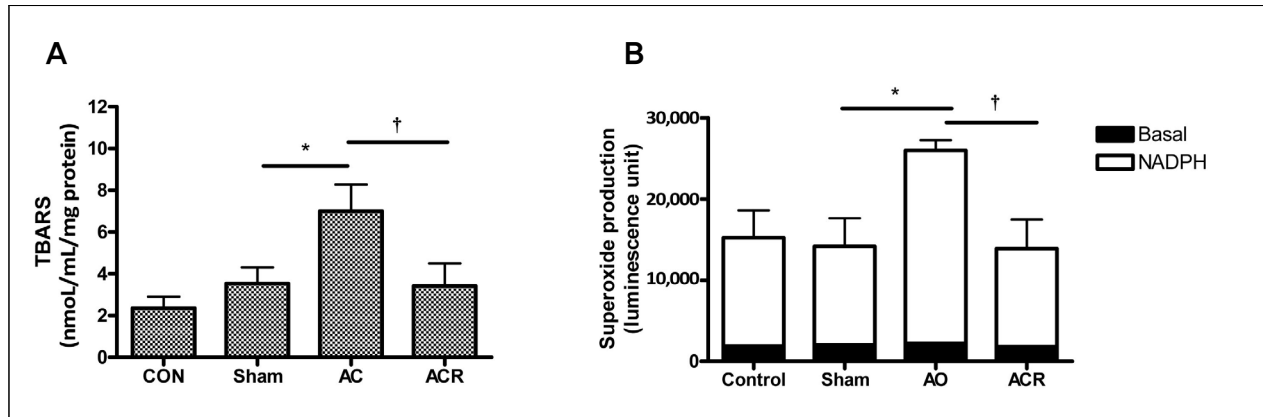
### 2. 대동맥협착 동물에서 내피 의존성 이완반응

복부대동맥의 협착 유도 및 협착을 제거한 동물에서 내피 의존성 이완반응의 변화를 규명하고자 하였다. Fig.

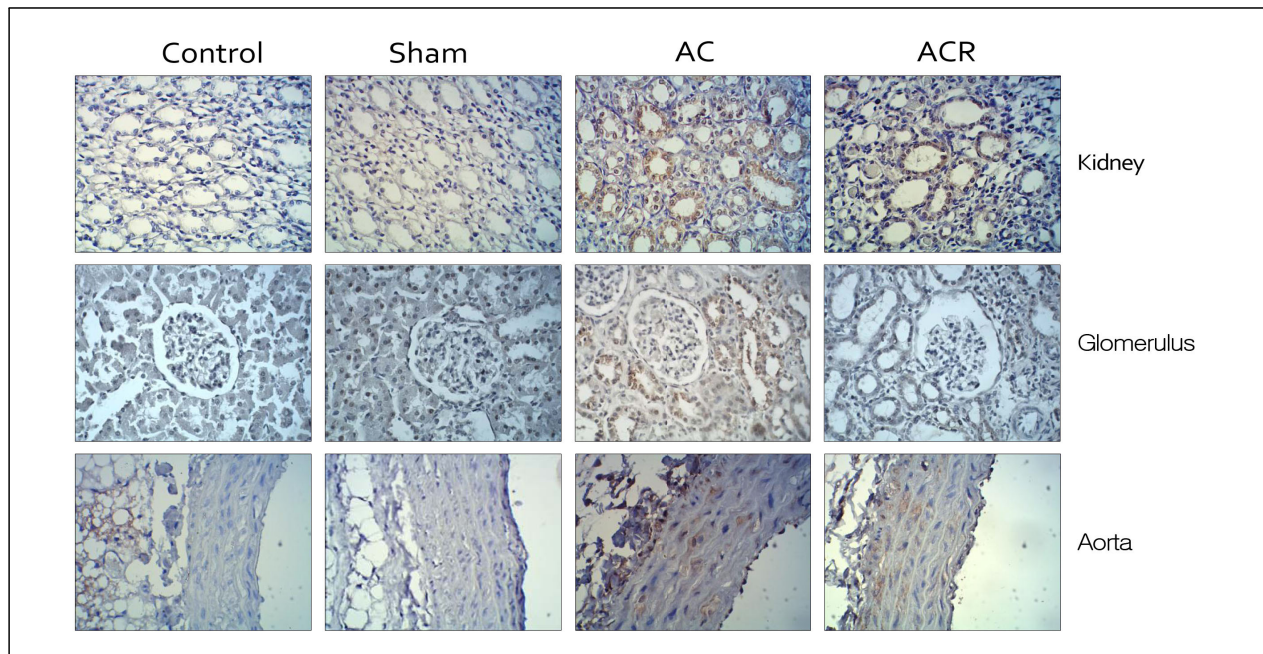
1A에 도시된 바와 같이 대동맥협착동물에서 acetylcholine에 의한 내피 의존성 이완반응은 Sham 대조군에 비하여 현저한 감소를 보였으며, 대동맥협착을 제거한 군에서 내피 의존성 이완반응이 회복하여 정상군 및 Sham 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 사실을 종합해 보면 대동맥협착에 의한 혈압상승은 혈관내피세포에 영향을 주어 내피 의존성 이완반응을 감소시키며 협착을 제거하는 경우 다시 혈압이 정상으로 회복되면서 내피 의존성 이완반응이 회복되는 것으로 판단된다. 대동맥협착 시 혈관내피 의존성 이완반응을 억제시킨다는 사실이 확인됨으로써(Fig. 1), 평균 동맥압과 내피 의존성 이완반응과의 상호관계를 규명하고자 하였다. 그 결과 평균 동맥압과 내피 의존성 이완반응과 상관계수는  $R^2 = 0.26$ 으로써 평균 동맥압의 상승은 내피 의존성 이완반응을 손상시키는 중요한 인자로 판단되었다(Fig. 1B).

### 3. 대동맥협착 동물에서 지방과산화 및 활성산소종 생성변화

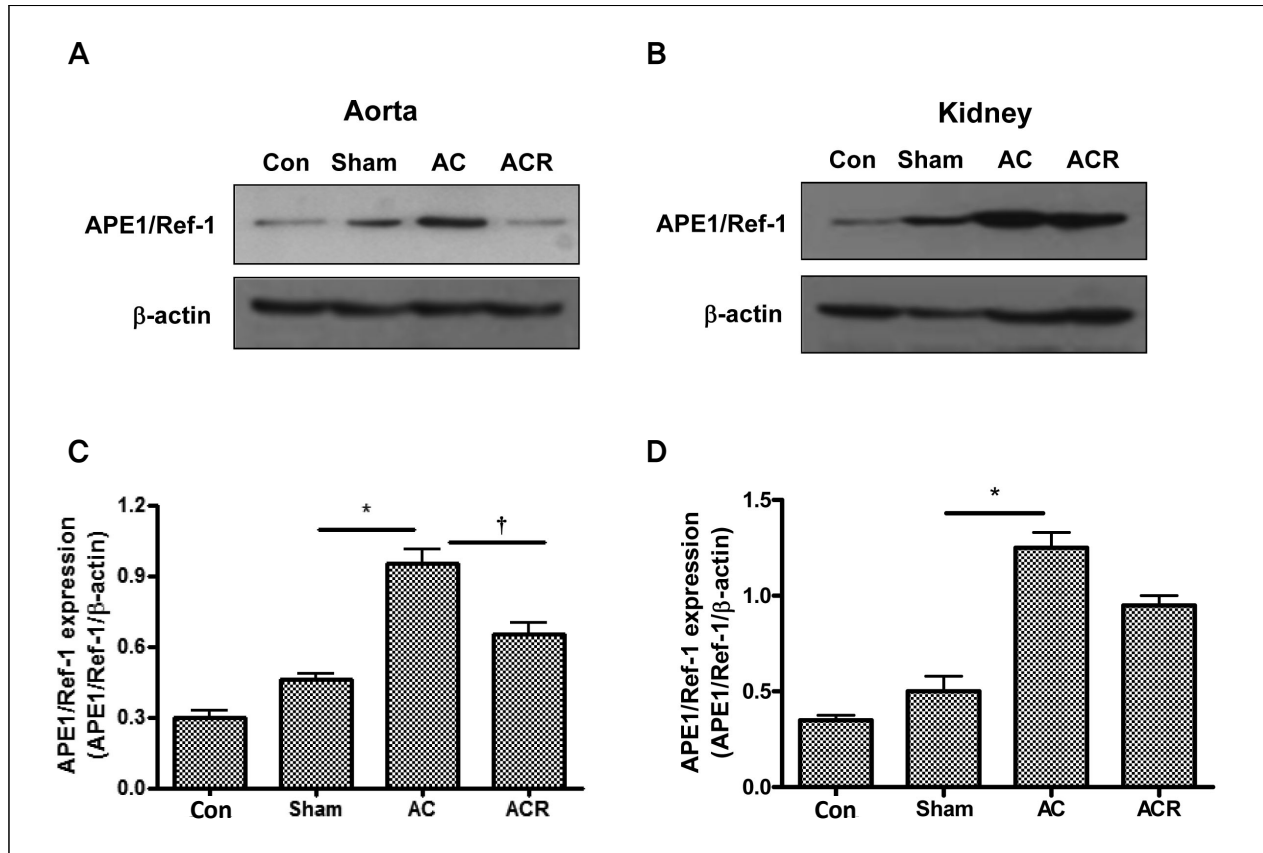
대동맥협착에 의한 고혈압에서 혈관내피 의존성 이완반응이 억제된다는 사실이 확인됨으로써, 내피 의존성 이



**Fig. 2.** Lipid peroxidation and superoxide production in the plasma of the abdominal aortic coarctation rats. (A) Lipid peroxidation in the plasma of the abdominal aortic coarctation rats. Lipid peroxidation of plasma that was obtained in each groups were determined by thiobarbituric acid–reactive substances (TBARS) assay as described in Methods. Each data showed mean  $\pm$  SEM (No. 5–6). (B) Superoxide production in aorta of the abdominal aortic coarctation rats. Superoxide production was determined by lucigenin chemiluminescence assay as described in Methods. Each data showed mean  $\pm$  SEM (No. 5–6). Basal and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)–driven superoxide were measured in aorta of rats. NADPH (0.1 mM) was added to measure NADPH oxidase activity. CON, control; Sham, sham–operated group; AC, aortic coarctation; ACR, repair group of aortic coarctation. \* $p < 0.05$  vs. Sham.  $^{\dagger}p < 0.05$  vs. AC.



**Fig. 3.** Immunohistochemistry of apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) in kidney and aorta of coarctation rats. APE1/Ref-1 expression was increased in aortic coarctation groups ( $\times 400$ ). Sham, sham–operated group; AC, aortic coarctation; ACR, repair group of aortic coarctation.



**Fig. 4.** Western blot analysis for apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) in the aorta (A, C) and kidney (B, D) of coarctation rats. Con, control; Sham, sham-operated group; AC, aortic coarctation; ACR, repair group of aortic coarctation. Each bar showed mean  $\pm$  SEM (n = 4). \*p < 0.05 vs. Sham, †p < 0.05 vs. AC.

완반응에 영향을 줄 수 있는 지방과산화 및 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. Fig. 2에서 도시된 바와 같이 지방과산화 정도 및 대동맥의 활성산소종 생성은 대동맥협착 시 증가하였으며, 대동맥협착을 제거한 군에서는 정상으로 회복되는 경향을 보였다.

#### 4. 대동맥협착 동물에서 산화환원조절단백질의 발현

고혈압 유도 시 APE1/Ref-1의 발현변화를 규명하기 위하여 신장 및 대동맥조직에서 APE1/Ref-1의 발현을 규명하고자 하였다. 정상 및 Sham군에서 APE1/Ref-1의 발현은 미미하였다. 대동맥협착군의 신세뇨관에서 APE1/Ref-1은 핵 및 세포질 내 발현이 증가되었으며, 대동맥의 내피 세포 및 평활근세포에서 발현이 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). 고혈압 유도 시 APE1/Ref-1의 발현변화를 정량

적으로 규명하기 위하여 신장 및 대동맥조직 균질액에서 APE1/Ref-1의 발현을 Western blot분석으로 통하여 규명하고자 하였다. 대동맥협착군의 신장조직에서 APE1/Ref-1은 정상 및 Sham군에 비하여 유의한 증가를 보였으나 대동맥협착을 제거한 군에서 APE1/Ref-1의 발현은 정상으로 회복되지 않았다. 대동맥협착군의 대동맥조직에서 APE1/Ref-1은 정상 및 Sham군에 비하여 유의한 증가를 보였으나 대동맥협착을 제거한 군에서 APE1/Ref-1의 발현은 대동맥협착군에 비하여 유의한 감소를 보여 주어 가역적인 변화를 보여주었다(Fig. 4).

#### 고 찰

본 연구에서는 대동맥협착에 의하여 유도된 고혈압 동물에서 내피 의존성 이완반응의 감소, 활성산소 생성증

가, 지방과산화 증가 및 APE1/Ref-1의 발현증가를 확인하였다. 또한 대동맥협착을 제거하는 경우 혈관내피세포의 조직손상 및 APE1/Ref-1의 발현증가는 다시 회복되었다.

본 연구에서 사용된 동물모델로는 복부대동맥협착 고혈압 모델이었다. 복부대동맥협착 고혈압 동물모델은 협착 상부의 고혈압과 협착 하부의 저혈압을 유도할 수 있는 동물모델이며, 신동맥 상부의 복부대동맥의 협착은 레닌 의존성 고혈압 유도가 가능한 동물모델이다. 대동맥협착 동물모델에서 대동맥협착 후 2-6일 동안 신관류량이 감소됨으로써 혈중 레닌의 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup>

혈관내피 의존성 이완반응은 대동맥협착에 의한 고혈압 동물에서 감소되어 있으며,<sup>19,20)</sup> 이러한 혈관 이완반응의 감소는 혈관 노화의 원인으로 대두되고 있으며, 항고혈압제의 투여는 혈관질환에 예방 효과가 있다고 알려져 있다.<sup>21,22)</sup> 최근 고혈압을 보이는 대동맥협착의 상부에서는 내피 의존성 반응이 감소되며 혈압이 감소된 대동맥협착 하부에서는 내피 의존성 이완반응이 정상으로 보인다고 알려져 있다.<sup>14)</sup> 이러한 결과는 혈압상승이 혈관내피세포 손상의 주요 원인으로 생각되고 있다. 본 연구에서도 고혈압 유도는 내피 의존성 이완반응을 감소시켰으며, 대동맥협착 부위를 제거하는 경우 손상된 내피 의존성 이완반응이 회복되었다. 이러한 결과는 혈압증가가 손상된 내피 의존성 이완반응의 원인이 되며 혈압조절에 의하여 가역적이라고 생각할 수 있다.

산화적 스트레스는 심혈관질환 특히 고혈압의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하고 있다. 고혈압 환자에서 활성산소, 지방과산화가 증가되어 있다.<sup>23)</sup> 특히 일산화질소의 불활성증가는 혈관기능손상의 주요 원인으로 생각되고 있으며 활성산소종의 증가는 NADPH oxidase의 발현증가가 주요한 원인이다.<sup>24-26)</sup>

산화적 스트레스의 증가와 관련이 있는 혈압상승은 다양한 조직에 산화적 손상을 유도한다. 산화적 손상에 대한 세포 내 방어기전으로는 superoxide dismutase와 같은 항산화 단백질이 있다. 산화 및 항산화제 간의 불균형은 활성산소종의 생성을 촉진하여 조직의 손상을 유도하게 된다. 내피 의존성 이완반응에 영향을 줄 수 있는 주요 요

소는 일산화질소의 생물학적 이용률(bioavailability)이다. 일산화질소의 생물학적 이용률을 감소시키는 요인으로서는 주로 활성산소의 생성증가이다. 본 연구에서 대동맥협착에 의한 고혈압 백서에서 활성산소종증가 및 지방과산화증가는 혈관내피세포의 일산화질소의 생물학적 이용률을 감소시켜 혈관내피 의존성 이완반응을 감소시킨 것으로 생각되고 있다. 고혈압 동물에서 활성산소의 생성과 직접적으로 관련이 있는 p66shc의 인산화는 대동맥협착 고혈압 동물의 대동맥 혈관에서 증가되어 있으며 이러한 증가는 endothelial nitric oxide synthase의 활성을 억제하여 내피 의존성 이완반응을 감소시킨다는 보고<sup>14)</sup>가 있어 본 연구결과를 뒷받침하고 있다.

APE1/Ref-1 단백질의 발현이 대동맥협착에 의한 고혈압 백서의 조직에서 증가되었다. APE1/Ref-1은 세포 내 유전자 손상을 복구하고 전사인자의 활성을 조절하는 기능 및 세포 내 산화적 스트레스를 줄여주는 기능을 하는 다기능단백이다.<sup>27)</sup> APE1/Ref-1의 발현증가는 주로 활성산소종의 증가가 원인으로 생각되고 있다.<sup>28,29)</sup> 다량의 활성산소종의 증가와 같은 산화적 스트레스 환경에서 APE1/Ref-1의 발현은 DNA 손상복구 및 활성산소종의 증가를 억제하기 위하여 증가되는 것으로 생각된다.<sup>30)</sup>

활성산소종에 의한 APE1/Ref-1 발현증가는 APE1/Ref-1 promotor의 cyclic AMP response element binding protein (CREB) 부위의 활성화에 기인하는 것으로 알려졌다.<sup>31)</sup> 사람과 마우스에서 APE1/Ref-1 promotor에 CREB 결합 부위는 산화적 스트레스에 의한 APE1/Ref-1의 전사조절에 중요한 역할을 하고 있다.<sup>32)</sup> 고혈압 동물에서 CREB이 과발현되어 있으며, 엔지오텐신에 의한 plasminogen activator inhibitor-1와 같은 유전인자의 발현은 CREB siRNA 처리에 의하여 감소된다고 알려져 있다.<sup>33)</sup>

본 연구에서 고혈압 동물모델을 이용하여 혈압상승 시 대동맥의 APE1/Ref-1 발현이 증가되었으며 이러한 APE1/Ref-1의 발현증가는 대동맥협착을 제거하는 경우 회복되는 경향을 확인할 수 있었다. 이러한 APE1/Ref-1의 발현증가는 혈관 활성산소종의 생성증가 및 지방과산화 정도의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 대동맥협착을 제거하는 경우 APE1/Ref-1 발현이 회복되는



경향은 혈압이 정상화되면서 활성산소종의 생성 및 지방과산화 정도가 정상으로 회복되는 것에 기인하는 것으로 판단된다. 그러나 신장의 APE1/Ref-1의 발현은 대동맥에서의 발현과 상이한 결과를 얻었다. 대동맥협착군에서 신장의 APE1/Ref-1은 정상군에 비하여 증가하였으며, 대동맥협착을 제거한 군에서도 증가된 APE1/Ref-1 발현은 정상으로 회복되지 않았다. 또한 대동맥협착군의 신장에서 APE1/Ref-1의 발현증가는 면역염색결과 주로 신세뇨관에서 발현이 증가되었다. 이러한 신세뇨관의 APE1/Ref-1의 증가는 대동맥협착을 제거한 경우에도 증가되는 경향이 지속되었다. 대동맥협착을 제거한 동물에서 신세뇨관 및 신장조직에서 APE1/Ref-1의 발현증가는 대동맥협착 기간 동안 혈압증가에 의하여 이미 신세뇨관이 손상되어 대동맥협착을 제거하여 혈압을 정상으로 회복시키는 경우에도 지속되는 것으로 생각된다.

대동맥협착 고혈압 동물모델에서 내피 의존성 이완반응은 감소는 대동맥협착 부위의 제거에 의하여 회복되며 이러한 내피 의존성 이완반응의 회복은 혈관조직의 활성산소 생성의 감소 및 지방과산화의 감소에 기인되는 것으로 판단된다. 또한 고혈압 동물에서 산화환원조절단백의 발현증가는 향후 고혈압 동물의 바이오마커로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

**연구배경:** 본 연구에서는 대동맥협착 고혈압 동물모델을 이용하여 혈압변화 시 산화환원조절단백-1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1, APE1/Ref-1)의 발현변화를 규명하고자 하였다.

**방법:** 실험동물은 Sprague-Dawley 백서를 이용하였으며 대동맥협착군, 협착 제거군 및 Sham 대조군 및 정상군으로 나누었다. 혈관내피세포의 기능은 내피 의존성 이완반응으로 확인하였다. 활성산소종 및 지방과산화 정도는 lucigenin 발광반응과 thiobarbituric acid-reactive substances 방법을 이용하였으며 APE1/Ref-1의 발현은 Western blot 및 면역조직염색방법을 이용하여 확인하였다.

**결과:** 대동맥협착군의 수축기/이완기혈압은 171/114

mm Hg로써 정상군의 114/94 mm Hg에 비하여 유의한 증가를 보였다. 대동맥협착군에서 내피 의존성 이완반응은 현저히 감소하였으며, 활성산소종 및 지방과산화 정도는 증가하였다. 혈압상승에 의하여 감소된 내피 의존성 이완반응은 대동맥협착 제거에 의하여 정상으로 회복되었다. APE1/Ref-1 발현은 대동맥협착군의 대동맥 및 신장조직에서 증가하였다. 대동맥조직에서 APE1/Ref-1의 발현증가는 대동맥협착 제거에 의하여 회복양상을 보였으나 신장조직에서는 회복되지 않았다.

**결론:** 연구결과를 종합해 볼 때 산화환원조절단백 -1 (APE1/Ref-1)은 혈압증가에 의하여 발현이 증가됨으로써 고혈압의 바이오마커 가능성이 제시되었다. 고혈압 동물에서 나타난 내피 의존성 이완반응의 감소현상은 대동맥협착 제거한 1주 후 회복되어 내피 의존성 이완반응의 가역성을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년 고혈압학회 학술연구비 지원과 한국연구재단 기초과학연구센터 연구비(2011-0006231) 지원으로 수행되었다.

**이해상충:** 해당사항 없음.

## References

1. Demple B, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:11450-4.
2. Robson CN, Hickson ID. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5519-23.
3. Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, Kelley MR. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:601-20.
4. Lee HM, Yuk JM, Shin DM, Yang CS, Kim KK, Choi DK, et al. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is a key modulator of keratinocyte inflammatory responses. *J Immunol*. 2009;



- 183:6839-48.
5. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29-38.
6. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension.* 2000;36:142-6.
7. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74:139-62.
8. Fernandes M, Onesti G, Weder A, Dykyj R, Gould AB, Kim KE, et al. Experimental model of severe renal hypertension. *J Lab Clin Med.* 1976;87:561-7.
9. Parker FB Jr, Streeten DH, Farrell B, Blackman MS, Sondheimer HM, Anderson GH Jr. Preoperative and post-operative renin levels in coarctation of the aorta. *Circulation.* 1982;66:513-4.
10. Jeon BH, Gupta G, Park YC, Qi B, Haile A, Khanday FA, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. *Circ Res.* 2004;95:902-10.
11. Sengupta S, Chattopadhyay R, Mantha AK, Mitra S, Bhakat KK. Regulation of mouse-renin gene by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) via recruitment of histone deacetylase 1 corepressor complex. *J Hypertens.* 2012;30:917-25.
12. Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Soma M, Yamaguchi M, et al. Haplotype-based case-control study on human apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor-1 gene and essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2010;23:186-91.
13. Rojo-Ortega JM, Genest J. A method for production of experimental hypertension in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1968;46:883-5.
14. Lee SK, Kim HS, Song YJ, Joo HK, Lee JY, Lee KH, et al. Alteration of p66shc is associated with endothelial dysfunction in the abdominal aortic coarctation of rats. *FEBS Lett.* 2008;582:2561-6.
15. Yoo DG, Song YJ, Cho EJ, Lee SK, Park JB, Yu JH, et al. Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer.* 2008;60:277-84.
16. Kim CS, Park JB, Kim KJ, Chang SJ, Ryoo SW, Jeon BH. Effect of Korea red ginseng on cerebral blood flow and superoxide production. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23:1152-6.
17. Lee SK, Chung JI, Park MS, Joo HK, Lee EJ, Cho EJ, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 inhibits protein kinase C-mediated p66shc phosphorylation and vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2011;91:502-9.
18. Yayama K, Horii M, Hiyoshi H, Takano M, Okamoto H, Kagota S, et al. Up-regulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:736-43.
19. Goetz RM, Holtz J. Enhanced angiotensin-converting enzyme activity and impaired endothelium-dependent vasodilation in aortae from hypertensive rats: evidence for a causal link. *Clin Sci (Lond).* 1999;97:165-74.
20. Bell DR. Vascular smooth muscle responses to endothelial autacoids in rats with chronic coarctation hypertension. *J Hypertens.* 1993;11:65-74.
21. Ishimitsu T. Antihypertensive therapy considering the prevention of vascular aging. *J Korean Soc Hypertens.* 2011;17:85-94.
22. Choo EH, Ihm SH, Kim OR, Jang SW, Park CS, Kim HY, et al. Imatinib mesylate attenuates cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Korean Soc Hypertens.* 2011;17:48-56.
23. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2000;2:98-105.
24. Sindhu RK, Roberts CK, Ehdaie A, Zhan CD, Vaziri ND. Effects of aortic coarctation on aortic antioxidant enzymes and NADPH oxidase protein expression. *Life Sci.* 2005;76:945-53.
25. Vaziri ND, Ni Z. Expression of NOX-1, gp91phox, p47phox and p67phox in the aorta segments above and below coarctation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1723:321-7.
26. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* 2004;165:219-26.
27. Jeon BH, Irani K. APE1/Ref-1: versatility in progress. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:571-4.
28. 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 re-

- sponse to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5061-6.
29. 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.
30. Bhakat KK, Mantha AK, Mitra S. Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:621-38.
31. Grosch S, Kaina B. Transcriptional activation of apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape, Ref-1) by oxidative stress requires CREB. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:859-63.
32. Harrison L, Ascione AG, Takiguchi Y, Wilson DM 3rd, Chen DJ, Demple B. Comparison of the promoters of the mouse (APEX) and human (APE) apurinic endonuclease genes. *Mutat Res*. 1997;385:159-72.
33. Rose P, Bond J, Tighe S, Toth MJ, Wellman TL, Briso de Montiano EM, et al. Genes overexpressed in cerebral arteries following salt-induced hypertensive disease are regulated by angiotensin II, JunB, and CREB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H1075-85.