online©ML Comm

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:207-14
DOI 10.3342/kjorl-hns.2009.52.3.207

와우 세포주에서 겐타마이신에 의해 유발된 세포자멸사의 특성

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 생리학교실,[2] 신경외과학교실,[3] 경북대학교 의과대학 생리학교실[4]

남성일[1] · 송대규[2] · 박성희[2] · 이재훈[1] · 이우근[1] · 김일만[3] · 박재식[4]

Characterization of Gentamicin-Induced Apoptosis in a Cochlear Cell Model

Sung-Il Nam, MD[1], Dae-Kyu Song, MD[2], Sung-Hee Park[2], Jae-Hoon Lee, MD[1], Woo-Keun Lee, MD[1], Eal-Maan Kim, MD[3] and Jae-Sik Park, MD[4]

[1]Department of Otorhinolaryngology; [2]Physiology; [3]Neurosurgery, Keimyung University School of Medicine, Daegu; and [4]Department of Physiology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Aminoglycoside antibiotics are ototoxic. Understanding of the molecular mechanisms underlying the drug-induced ototoxicity, however, has been hampered by limited cell availability. Recently, HEI-OC1 cells, which are of an immortalized cochlear cell line sensitive to ototoxic drugs, have been derived from the auditory sensory organ. This study was performed to confirm whether cultured HEI-OC1 cells can be used to evaluate aminoglycoside-induced ototoxicity and the effect of antioxidants against aminoglycoside-induced colchlear cell damage. **Materials and Method** : Gentamicin was administered for 3 days in the media containing HEI-OC1 cells. **Results** : Cell viability was decreased by gentamicin in a dose-dependent manner. The cell number was decreased by 50% 3 days after the exposure to 2 mM gentamicin. Penicillin did not have any significant effect. Flow cytometric analysis revealed that sub G1 arrest representing cellular apoptosis was accelerated by gentamicin treatment but not by penicillin. Expression of $p27^{Kip1}$, the cyclin-dependent kinase inhibitor, was exclusively increased by gentamicin. Reactive oxygen species were also increased by gentamicin when compared with those of the control or when penicillin was used. Caspase-3 activity became increased according to the elevation of gentamicin concentrations. N-acetyl cysteine, but not vitamin E or vitamin C, ameliorated cell survival dose-dependently against gentamicin. **Conclusion** : The present study reveals that the HEI-OC1 cell line is a good model to evaluate gentamicin-induced ototoxicity. The results suggest that gentamicin-induced apoptosis may be, at least partially, linked to the overproduction of a reactive oxygen species called. N-acetyl cysteine, a free radical scavenger, that decreases the gentamicin ototoxicity. **(Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:207-14)**

KEY WORDS : Cochlea · Gentamicin · Caspase-3 · p27 · N-acetyl cysteine.

서 론

미로내의 유모세포(hair cell)는 머리의 움직임, 균형, 그리고 음파를 감지하는 내이에 있는 기계적 수용기(mechanoreceptor)이다. 포유동물의 감각 유모세포는 출생 후에는 재생되지 않는다.[1)] 그러므로 이들 수용기들의 상실은 포유동물의 영구적인 청각 소실과 균형감각 장애를 초래한다. 의미 있는 청각 소실이 전 인구의 10%에서 나타난다. 청각 손상의 발생이 높게 나타나는 경우에는 아미노글리코시드(aminoglycoside) 항생제, 헨리계제 이뇨제들(loop diuretics)과 항종양성 약제들(antineoplastic agents)과 같은 치료용 약제들 그리고 노화, 감염, 소음성 장애에 의한 유모세포 손상이 관련 된다.[2)]

겐타마이신(gentamicin) 같은 아미노글리코시드는 신장독성(nephrotoxicity)과 내이독성(ototoxicity)이라는 2가지 중요한 부작용을 가지고 있다. 아미노글리코시드 항생제에 의한 내이독성의 발생률은 사용량과 사용기간에 비례하며, 사용자의 10~63%에 이른다. 여러 연구에 의하면, 내이세포의 항산화 방어 능력을 초과하는 활성 산소종(reactive oxygen species)과 유리 라디칼의 형성이 유모세포의 손실을 초래할 수 있다고 알려져 있다.[3,4)]

아미노글리코시드에 의한 내이독성의 병리생리학적 지식을 발전시킨 많은 연구가 있었음에도, 아미노글리코시드에 의한 청각소실을 회복시킬 수 있는 결정적인 내이 보호

논문접수일 : 2008년 9월 15일 / 심사완료일 : 2008년 12월 10일
교신저자 : 남성일, 700-712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 250-7715 · 전송 : (053) 256-0325
E-mail : entnamsi@dsmc.or.kr

방법은 현재까지 없다. 그것의 가장 큰 이유 중 하나는 유모세포는 순수하게 생체로부터 분리 배양하기 어렵기 때문에 실험에 제약이 있다. 이로 인해 내이의 독성 기전에 대한 광범위한 평가가 제한되어 왔다. 이러한 제한점을 해결하기 위해 유전자 도입 마우스(Immortomouse)의 와우각 세포의 장기 배양에서 유래되어 HEI-OC1(House Ear Institute-organ of Corti 1)으로 명명된 새로운 세포주가 개발되었다.[5] 이 세포주는 인터페론-감마 유도성 프로모터 요소(promoter element)가 통제하는 SV40 large T-antigen(Tag) 유전자의 열-민감성 돌연변이를 가지고 있기 때문에, 인터페론-감마가 있는 배지로 33℃에서 배양하면(permissive conditions), Tag 단백질의 발현이 시작된다. 반면, 배양온도를 39℃까지 올리고 인터페론-감마가 없는 배지에서 세포를 배양하면(non-permissive conditions), Tag 단백질이 변성되고 불활성화되기 때문에, 결국 증식이 억제되고 세포는 유사분열 이전으로 돌아가게 된다. 그러나 HEI-OC1 세포주가 실질적으로 아미노글리코시드의 독성을 잘 반영하는지에 대해 다른 여러 조건의 실험실에서 완전히 검증된 적이 없으며, 실제 내이세포로 실험한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험과 어떤 특징적 차이점을 가지는지 연구된 바가 적은 실정이다. 따라서 본 실험은 HEI-OC1 세포주를 사용하여, 실제 내이세포에서 일어나는 약물독성을 반영할 수 있는지를 평가하고자 하며, 이것을 생체의 청각기관에서 얻은 것 보다 복합적인 결과들과 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

시 약

겐타마이신, 페니실린(penicillin), cisplatin, 그리고 인터페론-감마(interferon-γ)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 겐타마이신, 페니실린, cisplatin은 증류수에 녹인 후 여과하여 멸균하였고, 인터페론-감마는 1 M phosphate-buffered saline(PBS, pH 8.0)에 녹인 후 여과하여 멸균하였다.

세포 배양

HEI-OC1 세포주는 House Ear Institute(Los Angeles, CA, USA)에서 공급받아 사용하였다. HEI-OC1 세포는 10% fetal bovine serum과 25 U/mL 인터페론-감마가 포함되었지만, 항생제는 없고, 고농도(25 mM)의 포도당이 들어있는 Dulbecco's modified Eagle medium에서 배양하였다. 이 실험에서 HEI-OC1 세포는 항상 33℃, 10% CO_2의 permissive condition(Kalinec 등 2003) 하에서 배양하여 분화되지 않고 계속적 증식이 가능하게 하였다. 실험약물은 실험의 종류에 따라 적정한 세포수를 정한 후 처리하였으며, 약물투여 3일 후에 지표변화를 측정하였다.

Trypan blue 염색에 의한 생존세포수 산정

세포 생존율은 trypan blue 염색법에 의해 생존세포수를 측정하였다. 약물 투여 3일 후 세포에 트립신을 처리하여 배양액에 부유시킨 후 동량의 0.4% trypan blue 염색약(Gibco Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 부드럽게 섞어 주고 실온에서 3분간 방치하였다가 hemocytometer를 사용하여 세포수를 산정하였다. Trypan blue는 세포내 유입 후 살아있는 세포들에 의해서는 세포외 유출이 가능하나, 죽은 세포에서는 세포외 유출이 가능하지 않아 세포를 푸르게 염색시킨다. 따라서 생존세포수 산정 시 푸르게 염색된 세포는 배제하였고, 세포 윤곽이 명확한 염색되지 않은 세포를 살아있는 세포로 간주하였다.

세포 주기의 분석

약물들의 투여나 항산화제의 추가 공급이 세포의 생존율에 영향을 미친다면, 세포 주기에도 변화가 올 것이다. 이러한 세포 주기의 변화양상을 분석하기 위하여, 세포를 60 mm 세포배양용기에서 배양하였으며, 배양용기당 5×10^5 세포의 밀도로 분주하였다. 약물 투여 3일 후 배양용기에 부착된 세포에 트립신을 처리하고, 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 침전물에 PBS를 첨가하여 한차례 씻은 후 PBS를 100 μL 다시 첨가하여 부유시켰다.

지속적으로 교반하면서 100% 에탄올 1 mL를 천천히 첨가하고 4℃에서 1시간 동안 방치하여 세포를 고정하였다. Flow cytometry 분석을 하기 전에 세포를 PBS로 한차례 다시 씻고, 50 g/mL RNase A, 50 g/mL propidium iodide, 0.1%(w/v) sodium citrate, 그리고 0.1%(v/v) NP-40이 들어있는 차가운 propidium iodide 용액 1 mL로 부유시켰다. 그리고 37℃의 어두운 곳에서 30분간 반응을 시킨 후, flow cytometer(FACS Caliber, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)와 Cell Quest software로 분석을 수행하였으며, 각 조건마다 10,000개 정도의 세포가 분석에 사용되었다. Propidium iodide는 레이저 조사에 의해 발광하는 형광성질을 가지며, 세포의 DNA에 흡착되어 DNA의 양을 간접적으로 표현해 준다. 세포분열 과정에 들지 못하는 세포는 DNA의 양이 적으며, 크기도 줄어들고, 이것이 subG1 phase 세포들로 분류된다. SubG1 phase 세포 비율이 증가한다는 것은 주어진 실험조건 하에서 세포사가

증가한다는 것을 알 수 있다.

활성 산소종 측정

약물에 의한 세포 생존율의 변화가 활성 산소종의 생성과 연관되는 지를 관찰하였다. 활성 산소종의 생성은 6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 기질로 사용하여 flow cytometry 분석을 통해 측정하였다. DCFH-DA는 형광을 가지며, 활성 산소종과 반응할 때 많은 형광을 발산한다. 약물 투여나 항산화제의 투여가 활성 산소종의 발생에 어떤 영향을 주는지 알고자 하였다. 약물 투여 3일 후 각 배양 용기당 DCFH-DA가 20 μM이 되도록 첨가하여 37℃의 어두운 곳에서 20분간 반응시킨 다음 세포를 모아 PBS로 씻고 PBS 1 mL당 1×10^6 세포가 되도록 부유시켰다. 그리고 FACS caliber flow cytometer로 측정한 10,000개 세포의 DCF fluorescence intensity(FL-1, 530 nm)를 통해 활성 산소종의 생성을 확인하였다.

Caspase 활성도

약제에 의해 유도된 caspase-3 활성은 ac-DEVD-pNA enzymatic cleavage 분석법을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 caspase-3 효소의 기질을 일정하게 투여하여 효소 반응 결과물의 흡광도를 측정하여, 그 효소의 활성을 비교, 관찰하는 것이다. 약물 투여 3일 후 세포를 얼음 위에서 lysis buffer{50 mM Tris(pH 7.5), 0.03% NP-40, 1 mM DTT}와 30분 동안 반응시켜 파괴하였고, 원심분리하여 상층액을 Bradford assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량하였다. 단백질 추출물(20 μg)을 전체 부피가 0.1 mL가 되도록 0.2 mM ac-DEVD-pNA(Calbiochem, San Diego, CA, USA)와 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 분석은 2회 반복하여 평균 흡광도로 나타내었다.

사용된 항체, 단백질 추출 및 Immunoblotting

세포 생존율이나 세포주기에 변화가 생긴다면, 세포 분열을 조절하는 세포주기 조절단백들의 발현에 변화가 생길 수 있으므로, 그 중 대표적인 단백들의 발현을 비교하고자 하였다. Anti-p27, anti-p16, 그리고 anti-p21(Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)은 1 : 1,000으로 희석하여 사용하였다. Anti-β actin antibody(Sigma)는 1 : 2,000으로 희석하여 사용하였다. 약물 투여 3일 후 세포를 차가운 PBS로 씻고, lysis buffer{10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 130 mM NaCl, 5%(v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 200 nM aprotinin, 20 μM leupeptin, 50 μM phenanthroline, 280 μM benzamidine-HCl}와 4℃에서 20분간 반응시켜 세포성 단백질을 추출하였다. 세포 파쇄액은 원심분리로 정제하였고, 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분리한 다음 Immobilion-P membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮겼다. 이동을 끝낸 Immobilion-P membrane은 실온에서 1시간 동안 Tris-buffered saline-0.05% Triton X-100 (TBS-T)-4%(w/v) milk와 반응시켜 비특이적인 결합을 억제한 다음 4℃에서 TBS-T 4%(w/v) milk로 희석한 일차 항체와 밤새 반응시켰다. 그리고 TBS-T로 씻은 후 TBS-T 4%(w/v) milk로 희석한 horseradish peroxidase 이차 항체(1 : 5,000 ; Santa Cruz)와 다시 반응시키고 TBS-T로 씻은 후, 결합한 항체를 enhanced chemiluminescence(Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)로 검출하였다.

항산화제들의 효과 관찰

N-acetyl cysteine(NAC, 100~500 μM, Sigma), vitamin E(50~500 μM, Sigma) 또는 vitamin C(56~840 μM, Sigma)를 HEI-OC1 세포주에 1 mM 겐타마이신과 함께 처리하였다. 약제를 처리하고 3일 후에 trypan blue 염색을 통해, 살아있는 세포의 수를 확인하고, 대조군과 서로 비교하였다.

통 계

통계적인 유의성은 마이크로소프트사의 엑셀 소프트웨어를 이용한 Student's t-test를 통해 평가하였는데, p-value가 0.05보다 작은 것을 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

겐타마이신에 의한 HEI-OC1 세포주 손상의 형태학적 증거

33℃에서 인터페론-감마가 포함된 배지로 HEI-OC1 세포주를 배양하였을 때 36시간의 복제주기를 가졌으며, 방추형의 전형적인, 신경세포와 유사한 형태를 가지고 있었다. 계속적인 증식이 이루어지는 상태로써 분화를 끝낸 세포와는 특성상 차이가 있을 것으로 생각되었다. 겐타마이신을 처리하고 3일 후, 투여된 겐타마이신 농도에 비례하여 세포수가 감소하였고, 겐타마이신 처치군의 살아있는 세포들도 납작해지고 무딘 모양으로 변형되었다. 또한 200 μM cisplatin을 처리하였을 때는 세포사가 심하게 관찰되

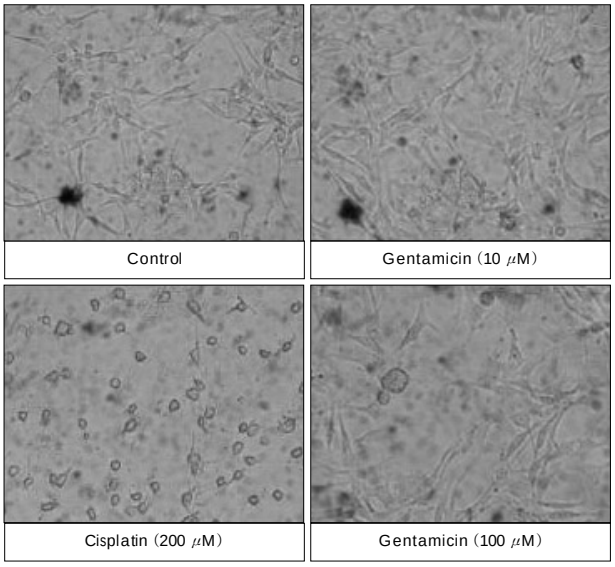

Fig. 1. Light microscopic findings. HEI-OC1 cells treated with gentamicin and cisplatin for 3 days (×100).

었으며, 신경돌기들이 더 많이 소실되었다(Fig. 1). 유의한 세포사는 100 μM의 겐타마이신 처리 후에 관찰되었고 (81±11%), 2 mM의 겐타마이신을 처리하였을 때, 58±6.1%의 세포만이 살아있었다(Fig. 2).

이와 같은 현저한 세포사는 치료 용량 범위의 페니실린 처리 실험에선 관찰되지 않았으며, 이것은 HEI-OC1 세포주가 잘 알려진 내이독성 약물에 특이적으로 반응하고 있다는 사실을 보여주었다.

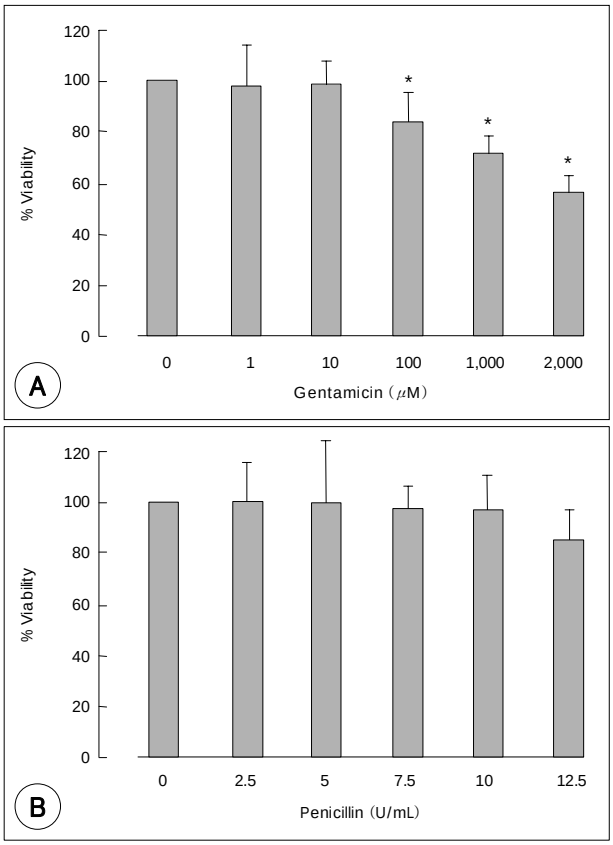

Fig. 2. Effect of treatment with gentamicin (A) and penicillin (B) on viability of HEI-OC1 cells. Cell count was performed 3 days after the drug treatment. Data were normalized as percentage of the cell count from untreated control. Data represent mean ±SE from three independent experiments. *p<0.05 compared to control untreated with the drug.

겐타마이신과 Cisplatin에 의한 활성 산소종의 증가

겐타마이신과 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포주의 세포사멸 과정에 활성 산소종의 관련성을 확인하기 위해 겐타마이신, cisplatin 또는 페니실린을 처리한 세포들간의 세포내 활성 산소종의 농도를 비교하였다(Fig. 3). 활성 산소종의 농도는 약물을 처리하고 72시간 후에 측정하였는데, 활성 산소종의 농도가 증가할수록 형광이 증가하여 도표는 오른쪽으로 편이를 보인다. 겐타마이신, cisplatin을 처리한 HEI-OC1 세포들에서 활성 산소종의 농도가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 예상했던 것처럼 페니실린의 경우에는 활성 산소종의 농도가 증가되지 않았는데, 이것은 겐타마이신이나 cisplatin에 의해 유도되는 세포사멸은 아마도 활성 산소종에 의해 매개될 것이라는 것을 암시하였다.

겐타마이신 또는 Cisplatin에 의한 세포성 세포자멸사(apoptosis)

내이독성 약물로 처리하였을 때 살아있는 HEI-OC1 세포들의 수가 감소하는 것이 세포자멸사와 관련이 있는지 확인하기 위해 세포주기 분석을 수행하였다(Fig. 4). 세포분열주기로 들어가지 못하는 세포들은 DNA 함량이 적어 그림의 M4 분획을 증가시킨다. 실험 결과, 겐타마이신 또는 cisplatin을 처리한 세포들에서는 subG1-phase(M4) 세포의 비율이 늘어난 반면, 페니실린을 처리한 세포들에서는 세포주기 각 단계의 세포 비율이 변하지 않는 결과를 얻었다. 그리고 약물 처리 3일 후에 caspase-3 활성도를 기질당 발생물질의 흡광도로 확인하였을 때, 약물처리를 하지 않은 대조군의 활성도에 비해 겐타마이신 처리군에서는 농도에 비례하여 그 활성이 증가하였고, 500 μM 겐타마이신과 200 μM cisplatin 처리 세포군에서 caspase-3 활성도가 각각 2배와 8배 증가함을 관찰하였다(Fig. 5).

겐타마이신 처리에 의한 Cyclin-dependent kinase inhibitor(CDKi)들의 발현 변화

겐타마이신에 의한 세포자멸사에 CDKi가 관련되어 있을 것으로 가정하고, p16, p21, 그리고 p27의 단백질 발

현 수준을 측정하였다(Fig. 6). 흥미롭게도 p27 단백질이 겐타마이신 투여에 의해 발현이 증가하는 양상을 보였다. 하지만, p16과 p21 단백질 발현은 반복된 실험에서도 겐타마이신에 의해 변화하지 않았다.

NAC에 의한 세포사 보호 효과

겐타마이신에 의한 세포사멸로부터 항산화제의 단독처리로 HEI-OC1 세포를 보호할 수 있는지 확인하기 위하여, 항산화제들을 겐타마이신과 함께 처리하였다. 약물 처리 3

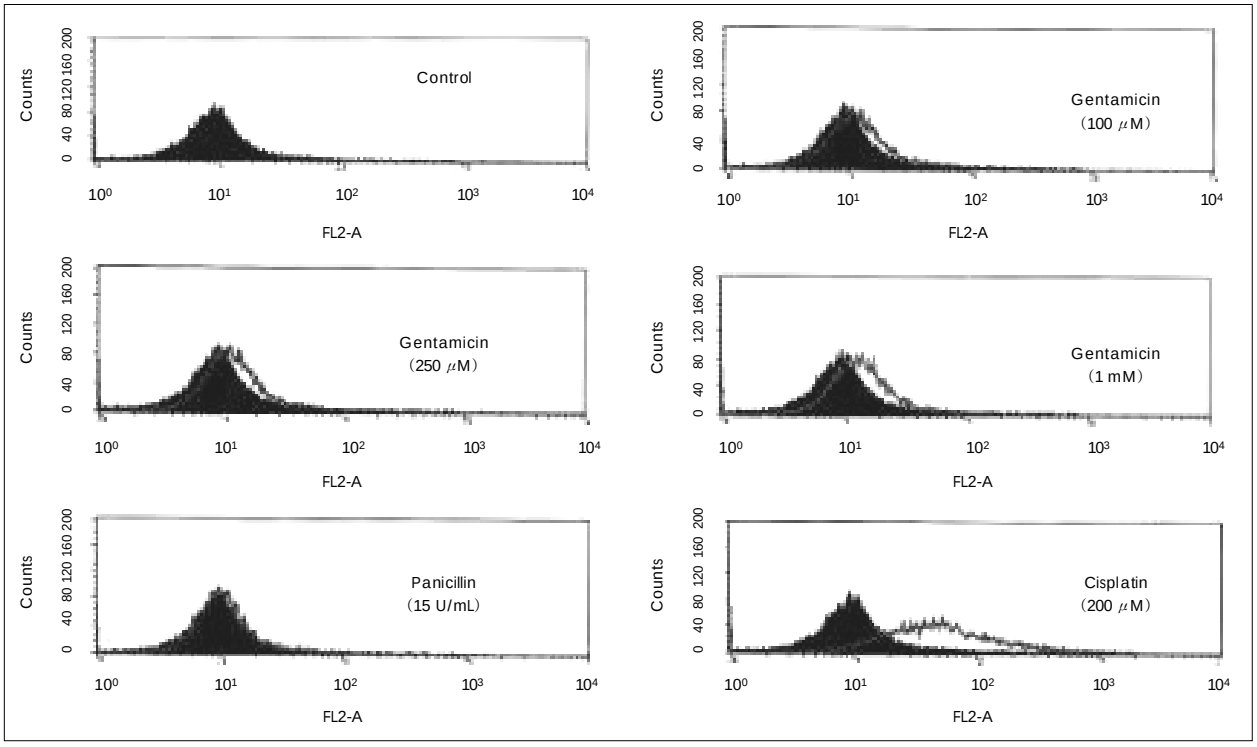

Fig. 3. Effect of treatment with gentamicin, penicillin, and cisplatin on generation of reactive oxygen species of HEI-OC1 cells. Flow cytometric analysis was performed 3 days after the drug treatment. The presented data were chosen among three independent experiments.

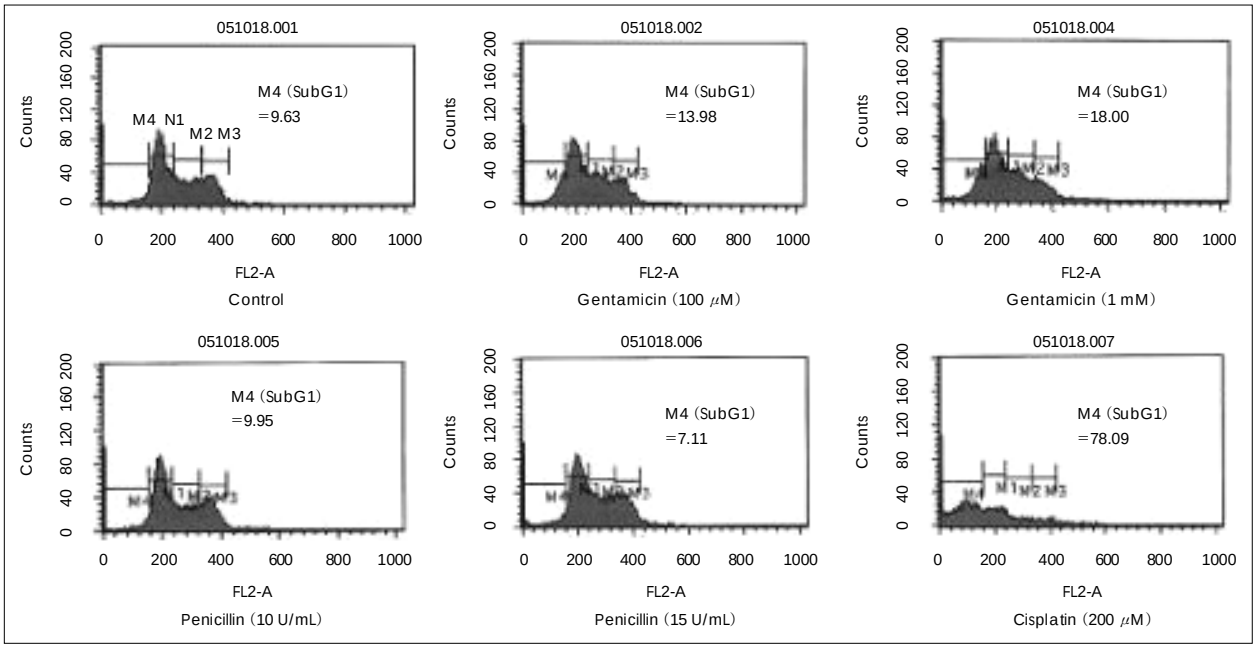

Fig. 4. Effect of treatment with gentamicin, penicillin, and cisplatin on cell-cycle fraction of cultured HEI-OC1 cells. Flow cytometric analysis was performed 3 days after the drug treatment. The presented data were chosen among three independent experiments.

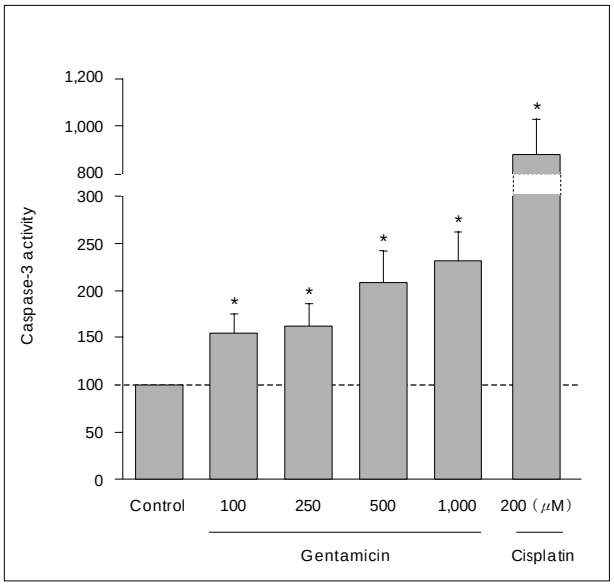

Fig. 5. Effect of treatment with gentamicin and cisplatin on caspase-3 activity of HEI-OC1 cells. The activity was performed 3 days after the drug treatment. Data represent mean±SE from three independent experiments. $*p<0.05$ compared to control untreated with the drug.

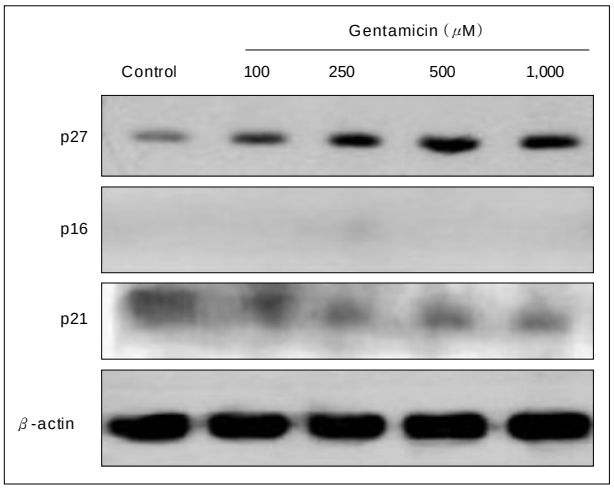

Fig. 6. Effect of treatment with gentamicin on expression level of p27, p16 and p21 protein of HEI-OC1 cells. Western blot was performed 3 days after the drug treatment.

일 후, 세포 생존율이 NAC에 의해 다소 증가된 것을 확인하였다(Fig. 7). 하지만 비타민 E와 비타민 C에 의해서는 세포 생존율이 현저한 변화를 보이지 않는 것으로 나타났다. 또한 NAC의 처치에 의해 겐타마이신에 의해 증가한 p27의 발현도 감소됨을 관찰하였다(Fig. 8).

고 찰

이 연구에서 HEI-OC1 세포주는 페니실린에는 반응하지

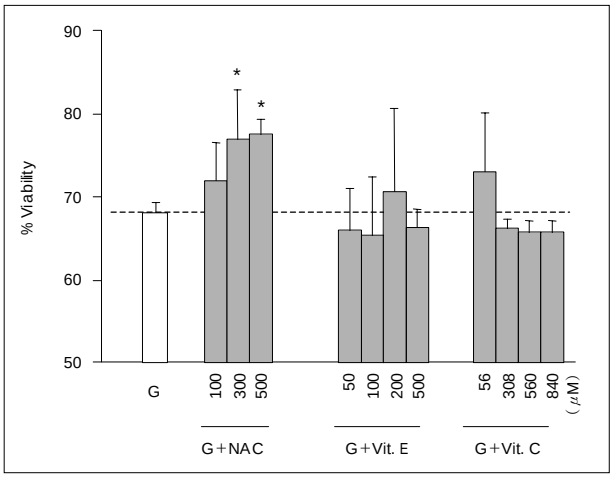

Fig. 7. Effect of co-treatment with N-acetyl cysteine (NAC), vitamin E or vitamin C on viability of 3-day gentamicin-treated HEI-OC1 cells. Cell count was performed 3 days after the drug treatment. Data were normalized as percentage of the cell count from untreated control. Data represent mean±SE. from three independent experiments. $*p<0.05$ compared to the group treated with gentamicin alone. G : 1 mM gentamicin.

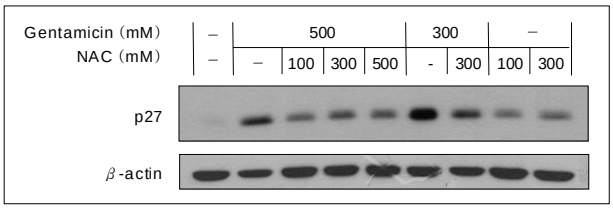

Fig. 8. Effect of treatment with gentamicin and NAC on expression level of p27 protein of HEI-OC1 cells. Western blot was performed 3 days after the drug treatment.

않고, 알려진 내이독성 약물에 의해 세포내 활성 산소종이 증가되고 이로 인해 세포사가 유도되는 특성을 잘 가지고 있음을 확인하였다. 본 실험에서 겐타마이신 1 mM을 3일 동안 처리하였을 때, caspase-3 활성은 2~3배 증가하였는데, 이것은 겐타마이신 처리 12시간 후 현저한 caspase-3 활성화가 나타나며, 24시간 후에 최고의 활성을 보이다가 48시간 후에 감소한다는 이전의 보고와 일치하였다.[5] 그 보고에 의하면, 1 mM 겐타마이신 처리 24시간 후에 caspase 활성도는 대조군에 비하여 5배 증가하였다. 이 실험에서 200 μM ciplatin을 처리하였을 때 caspase-3 활성이 8~9배 증가한 것 역시 선행 보고에서 활성도가 8배 증가하였다는 것과 일치한다.[5]

겐타마이신에 의한 내이독성의 정확한 기전에 대해서 완전하게 알려져 있지 않음에도 불구하고, 아미노글리코시드에 의한 청력 소실의 중심에는 활성 산소종의 생성이 있다는 증거들이 많이 보고되고 있다.[6] 아미노글리코시드에 의한 활성 산소종의 생성은 철(Fe^{2+})과 관련이 있는 것으로 보

인다.[6] 아미노글리코시드는 phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphate와 아라키돈산을 포함하는 세포막 지방 성분과 철의 3중 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 복합체는 산화되어 과산화 음이온을 생산하며, 이들은 다른 중요한 세포 구성 성분들과 반응할 수 있다. 또한 내이 조직에서 아미노글리코시드는 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase)를 활성화하여 산화질소의 증가를 자극한다. 이런 조건 하에서, 과산화물과 이용 가능한 산화질소가 반응하여 더욱 파괴적인 peroxynitrite 라디칼을 형성하거나 직접적으로 세포사 유도를 개시할 수 있다.

이와 같은 관점에서, 항산화제는 다양한 내이독성 약물로부터 와우각 유모세포를 보호할 것으로 생각되어 왔다.[8] 이 실험에서, NAC은 겐타마이신으로부터 세포의 생존율을 개선할 수 있었지만, 비타민 E와 C는 보호효과가 없었다. 다른 연구들도 이 실험과 일관되게 NAC은 내이 유모세포에서 내이독소에 대하여 보호 특성을 가지고 있다고 보고하고 있다.[8] 최근의 보고에 의하면, 아미노글리코시드는 주로 코르티 기관의 유모세포 외측면에 손상을 입힌다.[12] 이것은 세포 내부에서 만들어지는 항산화제이며, NAC의 최종 산물인 클루타티온의 수준이 코르티 기관에 있는 다른 종류의 세포들의 수준에 비해 유모세포 외측면에서 낮다는 보고와도 잘 일치한다.[13] 그러므로 NAC은 글루타티온의 제공자이기도 하기 때문에 겐타마이신에 대해서 다른 항산화제보다 더 효과적인 내이보호제일 수 있다고 생각된다. 하지만 비타민 E는 Hartley albino guinea pig에서 cisplatin-유도 청력 소실의 보호에 효과가 적기 때문에 tiopronin과 동시에 투여하여야 청력보호에 유용하다는 보고가 있다.[3,9] 비타민 C의 내이독소에 대한 유의한 내이세포 보호효과를 나타낸다는 보고는 없어서 본 실험의 결과와 일치하는 소견이다. 산화질소 저해제인 nitro-L-arginine methyl ester는 겐타마이신에 의한 고주파 영역 청각 소실에 대해서는 내이 보호제로 작용하지만, 중주파 혹은 저주파에 대해선 보호 효과가 없다.[10] 그러므로 유모세포를 내이독소로부터 보호하는데 있어서 항산화제 요법만으로는 충분한 보호 효과를 기대할 수 없을 것으로 보인다. 또 다른 보고에 의하면, 겐타마이신은 폴리아민과 비슷한 특성을 가지며, 내이의 유모세포에서와 마찬가지로 중추신경계 신경세포의 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체도 직접적으로 조절한다.[7] 또한 NMDA 길항제가 겐타마이신에 의해 유도된 내이독성을 감소시킨다.[11] Glutamate 수용체를 통한 흥분성 독성이 오직 활성 산소종의 생성에 기인한다고 할 수 없기 때문에, 일부 활성 산소종 차단제가 겐타마이신에 의한 와우각 유모세포의 손상에 현저한 보호 효과를 보이지 못하는 것도 이해할 수 있다. 과도한 활성 산소종은 유모세포를 세포자멸사와 세포 괴사로 유도하는 신호를 촉발시키는 것으로 생각된다. 이 연구에서 겐타마이신-유도 세포자멸사에서는 caspase-3의 활성화와 subG1기 세포분획 증가가 현저하게 나타났다. DNA fragmentation과 chromatin의 응축과 같은 아미노글리코시드-매개 세포자멸사의 다른 증거들은 이미 보고되어 있다.[14]

아미노글리코시드가 세포성 자멸과정을 촉발하면, CDKi의 발현이 변할 수 있다. 세포주기는 다양한 cyclin들과 CDKi에 의해 조절된다. 성장인자들은 이런 조절인자들의 활성을 촉진시키는 반면, transforming growth factor-β (TGF-β)는 세포 분열과 DNA 합성을 멈추기 위해 이런 조절인자들의 활성을 저해한다. CDKi에는 2종류가 있는데, Cip/Kip(Cdk inhibiting protein/Kinase inhibiting protein) group과 Ink4(Inhibitors of Cdk4) group이 있다. $p21^{Cip/Waf1}$, $p27^{Kip1}$과 $p57^{Kip2}$처럼 Cip/Kip group에 속하는 CDKi는 세포주기의 진행을 광범위하게 저해하는 반면, Ink4 group에 속하는 CDKi는 세포주기를 특이적으로 조절한다. 예를 들어, $p16^{INK4a}$는 cyclinD/CDK4 complex, phospho-Rb의 인산화, 그리고 세포주기에서 G1기에서 S기로의 이행을 저해한다. 현재까지 연구에서 $p21^{Cip/Waf1}$과 $p16^{INK4a}$ 단백질의 발현이 겐타마이신에 의해 유도된다는 증거는 없다. 일반적으로 포유동물 성체의 와우각 지지세포들(supporting cells)에서는 $p27^{Kip1}$의 발현이 관찰되고, 유모세포에선 발현이 관찰되지 않는 반면, 생후 재생이 가능한 조류의 유모세포에선 $p27^{Kip1}$이 발현된다.[15] 정상 생쥐에서 배아기를 지난 후에는 감각상피 조직에 새로운 세포가 추가되지 않는 것[15,16]은 아마도 지지세포에서의 $p27^{Kip1}$의 발현이 증가하기 때문에 감각상피조직으로의 세포 공급이 중지되기 때문이다. 본 연구에서 사용된 생쥐 유래 HEI-OC1세포주는 지지세포들에서만 관찰되는 nestin 같은 유전자들의 발현이 확인된다.[5] 마찬가지로 본 실험에서 보듯이 $p27^{Kip1}$의 발현도 관찰되는 바, 유모세포와 지지세포들의 성격을 모두 가지는 성상을 보인다. 그런 의미에서 본 연구결과만으로 겐타마이신-유도 세포사가 $p27^{Kip1}$ 발현의 증가와 연관되어 있다고 단정적으로 말할 수는 없다. 또한 HEI-OC1 세포주의 겐타마이신에 의한 세포사가 $p27^{Kip1}$의 활성 증가와 연결되어 있다고 말하기에는 본 실험의 결과만으로는 무리가 있다. HEI-OC1 세포에서 활성 산소종의 과잉이 겐타마이신의 독성에 어느 정도 관여할 것으로 생각되며, $p27^{Kip1}$ 발현의 증가가 이와 동반되어 관찰되었다고 말할 수 있겠다. 그럼에도 HEI-OC1 세포주는 아미노글리코시드 항생제의

독성과 그를 예방하는 약제 연구에는 유용한 도구로 사용될 수 있다 하겠다. 즉, 세포분열을 야기하는 본 실험과 같은 조건(33℃)에서는 미분화된 내이세포의 성상을 띄며, 만일 세포분열을 억제하고 세포분화만을 유도하는 조건(39℃)에서는 성숙되고 재생되지 않는 내이세포의 실험이 가능할 수도 있다고 보인다.

중심 단어 : 와우세포주 · 겐타마이신 · Caspase-3 · p27 · N-acetyl cysteine.

REFERENCES

1) Roberson DW, Rubel EW. *Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. Am J Otol 1994;15 (1):28-34.*
2) Kalinec F, Kalinec G, Boukhvalova M, Kachar B. *Establishment and characterization of conditionally immortalized organ of corti cell lines. Cell Biol Int 1999;23 (3):175-84.*
3) Fetoni AR, Sergi B, Scarano E, Paludetti G, Ferraresi A, Troiani D. *Protective effects of alpha-tocopherol against gentamicin-induced Oto-vestibulo toxicity: An experimental study. Acta Otolaryngol 2003; 123 (2):192-7.*
4) Corbacella E, Lanzoni I, Ding D, Previati M, Salvi R. *Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. Hear Res 2004;197 (1-2):11-8.*
5) Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, Kalinec F. *A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. Audiol Neurootol 2003; 8 (4):177-89.*
6) Rybak LP, Whitworth CA. *Ototoxicity: Therapeutic opportunities. Drug Discov Today 2005;10 (19):1313-21.*
7) Hong SH, Park SK, Cho YS, Lee HS, Kim KR, Kim MG, *et al. Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. Hear Res 2006;211 (1-2):46-53.*
8) Ton C, Parng C. *The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. Hear Res 2005;208 (1-2):79-88.*
9) Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. *Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. Acta Otolaryngol 2004;124 (4):421-6.*
10) Nordang L, Anniko M. *Nitro-L-arginine methyl ester: A potential protector against gentamicin ototoxicity. Acta Otolaryngol 2005;125 (10):1033-8.*
11) Takumida M, Anniko M, Shimizu A, Watanabe H. *Neuroprotection of vestibular sensory cells from gentamicin ototoxicity obtained using nitric oxide synthase inhibitors, reactive oxygen species scavengers, brain-derived neurotrophic factors and calpain inhibitors. Acta Otolaryngol 2003;123 (1):8-13.*
12) Usami S, Hjelle OP, Ottersen OP. *Differential cellular distribution of glutathione-an endogenous antioxidant-in the guinea pig inner ear. Brain Res 1996;743 (1-2):337-40.*
13) Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. *Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. Hear Res 2001;155 (1-2):1-8.*
14) Nakagawa T, Yamane H, Takayama M, Sunami K, Nakai Y. *Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following chronic aminoglycoside treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol 1998;255 (3):127-31.*
15) Torchinsky C, Messana EP, Arsura M, Cotanche DA. *Regulation of $p27^{Kip1}$ during gentamicin mediated hair cell death. J Neurocytol 1999;28 (10-11):913-24.*
16) Kanzaki S, Beyer LA, Swiderski DL, Izumikawa M, Stöver T, Kawamoto K, *et al. p27(Kip1) deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss. Hear Res 2006;214 (1-2):28-36.*