

시스플라틴에 의한 염증성 사이토카인의 청각유모세포 사멸 효과

이정환 · 박찬희 · 박래길*

원광대학교 의과대학 미생물학교실 및 전정와우기관 연구센터

Received April 16, 2008 / Accepted April 19, 2008

The Effects of Pro-inflammatory Cytokines by Cisplatin on the Death of Sensory Hair Cells. Jeong-Han Lee, Channy Park and Raekil Park*. *Department of Microbiology & Vestibulocochlear Research Center, Wonkwang University College of Medicine 344-2 Shinyong-dong Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea* - Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II: CDDP) is the most widely used anticancer drug against a variety of human neoplasms. However, its clinical use is limited by the onset of severe side effects, including ototoxicity and nephrotoxicity. Even though a number of evidences in cytotoxic mechanism of cisplatin have been suggested, the role of pro-inflammatory cytokines in cisplatin cytotoxicity of auditory cells has not yet been demonstrated. Herein our data clearly demonstrated that cisplatin decreased the viability of HEI-OC1 auditory cells, which was inhibited by the addition of neutralizing anti-TNF- α , anti-IL-1 β and anti-IL-6 antibodies. Consistently, Neutralization with antibodies against pro-inflammatory cytokines ameliorated the cell death and disarrangement of cochlea hair cell layers in the rat primary cochlear explants which were treated with cisplatin. Furthermore, exogeneous supplementation with free radical scavengers, including GSH and NAC, significantly prevented the cytotoxicity of cisplatin in the rat primary cochlea explants. We also observed that TNF- α was predominantly expressed in Deiters and Hensen's cells located in hair cell zone of cisplatin-treated cochlear explants. These findings suggest that pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β and IL-6, may play a pivotal role in the pathophysiology of hair cell damages caused by ototoxic drug cisplatin.

Key words : Cisplatin, cytokine, hair cell, ototoxicity, antioxidant

서론

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II: CDDP)은 다양한 암의 치료에 널리 사용되고 있는 유용한 항암제임에도 불구하고 임상적으로 이명(tinnitus), 고주파 청력손실 (high frequency hearing loss) 및 청력 감소 등의 청각기능 손상과 신장독성 등의 부작용을 유발한다[5]. Cisplatin에 의한 이독성은 코르티기관의 외측 청각유모세포(outer hair cell; OHC)의 손상에 기인한다[1,13,21]. 특히 cisplatin은 세포내에서 DNA adduct 형성[9,11]과 활성산소종 과생성을 유도하여[6, 20] 최종적으로 감각 유모세포의 세포자멸사 (apoptosis)나 세포괴사(necrosis)를 초래한다. Cisplatin의 세포독성 유발기전에 근거하여 cisplatin의 이독성과 신장독성 등의 부작용을 예방할 수 있는 다양한 약물탐색 연구가 진행되고 있다.

염증반응이란 생체 조직의 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정으로서 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 유발하여 손상을 극소화하고, 손상된 부위를 수복하는 정상적인 생체 기능의 하나다[2]. 염증반응은 호중구를 포함한 염증세포에서 생성한 cytokines, prosta-

glandin E2 (PG-E2), lysosomal enzyme, 및 free radical 등 다양한 인자의 상호 작용에 의하여 이뤄진다[19]. 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)는 호중구의 활성화와 염증 부위로 이동을 유도하며, IL-1 β 는 PG-E2 생성에 의한 발열반응을 유발하여 TNF- α 와 함께 염증반응의 주된 매개자로 작용하는 일산화질소(Nitric Oxide: NO) 및 superoxide anion 등의 형성을 유도한다[8].

TNF- α 는 대표적인 염증성 사이토카인으로서 여러 면역반응에 참여함과 동시에 multiple sclerosis와 같은 중추신경계 내의 염증성 탈수초 질환(inflammatory demyelinating diseases)을 유발하는 주요 인자로 알려져 있다. 중추신경계 내의 주된 교세포(glia cells)인 astrocyte는 TNF- α 자신을 포함한 여러 사이토카인에 반응하여 TNF- α 를 생성, 분비함으로써 질환의 병인인자로 직접 작용한다. 또한 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 세포내 신호전달을 수행하는 전사인자로서 여러 cytokine 유전자의 promotor 부위에 결합하여 염증성 사이토카인과 chemokine 유전자의 발현을 조절한다. 그러나 지금까지 cisplatin에 의한 이독성에서 염증반응의 중요성에 대한 연구가 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 청각세포주 HEI-OC1세포와 neonatal rat cochlear explant의 배양에서 cisplatin에 의한 청각세포 손상 기전을 밝히기 위하여, 염증성 사이토카인의 분비와 이들 사

*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6777, Fax : +82-63-852-0220

E-mail : rkpark@wku.ac.kr

이토카인이 세포 손상에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주

마우스 와우기관 코르티기관에서 유래한 청각세포주 HEI-OC1는 미국 House Ear Institute (Los Angeles, CA, USA)의 Kalinec 박사[10]로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

Sprague-Dawley rat

Sprague-Dawley rat은 다물싸이언스(대전)에서 생후 2일령을 분양받아 실험에 사용하였다.

시약

우태아혈청과 trypsin은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA.), 흡광도계 측정용 96 well plate, 배양용기 12 well plate, 24 well plate 그리고 10 cm dish는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Phalloidin-TRITC, Basal Medium Eagle (BME), dimethyl sulfoxide (DMSO), Cisplatin, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 Collagen (Type I; from rat tail)은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA.), anti-TNF α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6), RNAlater 및 pro-inflammatory cytokine assay kit은 R&D system (Minneapolis, USA.)의 제품을 사용하였다.

세포 배양

HEI-OC1 세포는 CO₂ 세포배양기(33°C, 5% CO₂)에서 항생제 첨가 없이 10% 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하여 log phase에 있는 세포를 실험에 사용하였다.

세포생존율 측정

세포생존율은 MTT 방법으로 측정하였다. 세포(5×10⁴ cells/ml)는 세포 배양판 24 well plate에 1 ml씩 분주하여 12 시간 이상 CO₂ 세포 배양기에서 부착시킨 후, 각각의 조건에 따라 시료를 처리하였다. 조건에 맞춰 배양한 후 각각의 well에 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 배양액 최종부피의 1/10이 되도록 첨가하였다. 반응 4시간 후 상층액을 제거하여 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨다. 500 μ l의 DMSO로 용해시킨 후에 100 μ l를 96 well plate에 넣어 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co. Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

Sprague-Dawley rat에서 cochlea 분리 및 배양

생후 2일이 지난 랫트를 알코올로 소독한 후 clean bench에서 모든 분리작업을 수행하였다. 실험도구는 알코올에 소독한 후 사용하였으며, 랫트 두경부를 통하여 두개골을 절단하고 bullar를 노출 시킨 후 냉 생리식염수로 세척 후에 와우기관을 분리하였다. 와우기관의 배양은 collagen으로 코팅한 coverslip을 이용하였다. 먼저, coverslip을 알코올로 소독해서 12 well plate에 넣고, Type I rat-tail collagen (3.76 mg/ml in 0.02 N acetic acid), 10 \times basal medium Eagle (BME) 그리고 2% sodium carbonate를 9:1:1의 비율로 혼합하여 coverslip에 15 μ l씩 분주한다. 실온에서 15분 반응하여 collagen matrix가 완성되면 media를 첨가하였다. 와우기관에서 분리한 코르티기관은 base, middle, apex의 세 부분으로 구분하였으며 이 연구에서는 basal turn만을 실험에 사용하였다. 코르티기관 basal turn은 12 well plate의 coverslip에 부착한 후 CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

염증성 사이토카인 분비 측정

Cisplatin에 의한 염증성 사이토카인의 생성은 30 μ M의 cisplatin을 처리한 세포배양 상층액에서 pro-inflammatory cytokine assay kit (R&D System Inc., Minneapolis, USA)를 이용하여 ELISA 방법으로 TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6의 사이토카인을 정량하였다.

Total RNA의 분리

배양 세포로부터 total RNA의 분리는 TRIzol[®]을 이용하였다. 세포는 냉 생리식염수로 세척하여 1.5 ml microtube로 옮긴 후 3,000 rpm에서 5분 원심분리하여, 침전물을 1 ml TRIzol[®]로 용해시킨 후, 200 μ l chloroform을 첨가하여 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 새로운 microtube에 옮긴 상층액은 동량의 isopropanol과 혼합하여 4°C에서 30분 반응하여 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 침전물은 80% 에탄올로 세척하였다. 세척한 RNA는 건조 후 DEPC를 처리하여 RNase 활성이 제거된 증류수로 용해시켰다. Total RNA량을 정량하기 위하여 Nano drop (Nano Drop Technologies Inc., USA)을 이용하여 시료의 total RNA의 양을 정량하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 하기 위하여 cDNA를 먼저 합성하였다. cDNA는 2 μ g total RNA와 Reverse Transcriptase (Superscript II, Invitrogen, USA)를 이용하여 합성하였다. Total RNA를 70°C에서 10분 변성한 후 4°C에서 급랭하였다. 역전사 반응에 의한 cDNA의 합성은 total RNA (2 μ g), 1 μ l oligo d (T), 2 μ l dNTP (10 mM), 2 μ l Superscript II reverse transcriptase (5 U/ μ l), DTT (10 mM), 및 RNasin (1 μ l)을 최종적으로 20 μ l 완충용액(50

mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)과 혼합하여 42°C에서 60분 반응시켰다. cDNA는 1/10으로 희석하여 RT-PCR에 사용하였으며 특정 유전자 증폭을 위한 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)은 2 µl cDNA, 2 µl 역전사 반응액, 2 µl dNTP (2.5 mM), 2.5 µl sense 와 antisense primer (1.1 µM), Taq DNA polymerase (0.6 U; TAKARA)가 함유된 최종 30 µl 반응액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)을 이용하였다. 이 때 사용한 각 유전자에 대한 sense 및 antisense primer 서열 및 반응조건은 다음과 같다.

Primer Sequences

1. TNF- α

5'-CAG GGG CCA CCA CGC TCT TC-3'
5'-CTT GGG GCA GGG GCT CTT GAC-3'

2. IL-1 β

5'-TCA TGG GAT GAT GAT GAT AAC CTG CT-3'
5'-CCC ATA CTT TAG GAA GAC AGG GAT TT-3'

3. IL-6

5'-TTG CCT TCT TGG GAC TGA TGC-3'
5'-TTG GAA ATT GGG GTA GGA AGG A-3'

Phalloidin 염색

배양한 cochlear explant는 시약 처리 후, 4% paraformaldehyde로 30분 고정하고 생리식염수로 세척한 후 0.1% Triton X-100으로 5분 실온에서 반응하였다. TRITC-labeled phalloidin (Sigma P1951, 1:4,000)으로 30분 실온에서 반응한 후 PBS로 3회 세척하고 표본 제작하여 형광현미경으로 관찰하였다.

Immunocytochemistry

배양된 cochlear explant를 PBS로 3번 세척하여 4% paraformaldehyde로 30분 고정한 후 PBS로 세척하였다. Blocking solution (100 µl of normal goat serum, 5 µl of 10% Triton X-100 및 895 µl of PBS)에 2시간 실온에서 반응하였다. Cochlear explant는 1차 항체 anti-TNF- α (2 µl goat anti TNF- α antibody, 2 µl Triton X-100 (10%), 6 µl normal goat serum, 190 µl PBS)를 4°C에서 12시간 반응하였다. 이 검체는 PBS로 3번 세척한 후에 2차 항체인 anti-goat IgG FITC (1 µl FITC-labeled phalloidin, 12 µl normal goat serum, 4 µl Triton X-100 (10%) and 383 µl PBS)와 상온에서 90분 반응하고, PBS로 각각 10분 3번 세척하였다. 최종적으로 검체는 50% glycerin을 이용하여 slide에 mounting한 후에 형광현미경으로 관찰하였다. 필요한 경우에 검체는 Phalloidin-TRITC와 DAPI를 동시에 염색하였다.

통계 처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D)를 산출하여 결과를 표시하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test와 One-way ANOVA 분석을 통하여 처리하였으며 *p*-value가 최대치 0.05(*p*<0.05) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

Cisplatin이 청각세포주 HEI-OC1 세포생존율에 미치는 영향

Cisplatin에 대한 HEI-OC1세포의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 cisplatin을 24시간 처리 후 MTT 방법으로 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 cisplatin은 10 µM의 농도에서 약 17%, 20 µM의 농도에서 약 50%의 세포 죽음을 유도하여 처리 농도에 의존적인 세포독성을 나타냈다(Fig. 1A). 또한 세포생존율은 20 µM cisplatin을 다양한 시간 처리한 결과, 처리 18시간 후부터 감소하기 시작하여 처리 24시간 후 현저히 감소하여 약 50%의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 1B). 이상의 결과에서 cisplatin에 의한 세포독성은 HEI-OC1세포에서 농도 및 시간 의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한, 20 µM 농도의 cisplatin을 24시간까지 처리한 후 시간에 따른 염증성 사이토카인 mRNA 발현 변화를 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA는 cisplatin 처리 12시간에 관찰할 수 있었으며, 처리 시간에 비례하여 발현양이 증가하였다. 그러나 이들 사이토카인의 발현 시기는 사이토카인의 종류에 따라 차이가 있었다(미발표 결과).

염증성 사이토카인 중화(neutralization)에 의한 cisplatin 세포독성 예방 효과

Cisplatin에 의해서 생성된 염증성 사이토카인의 기능을

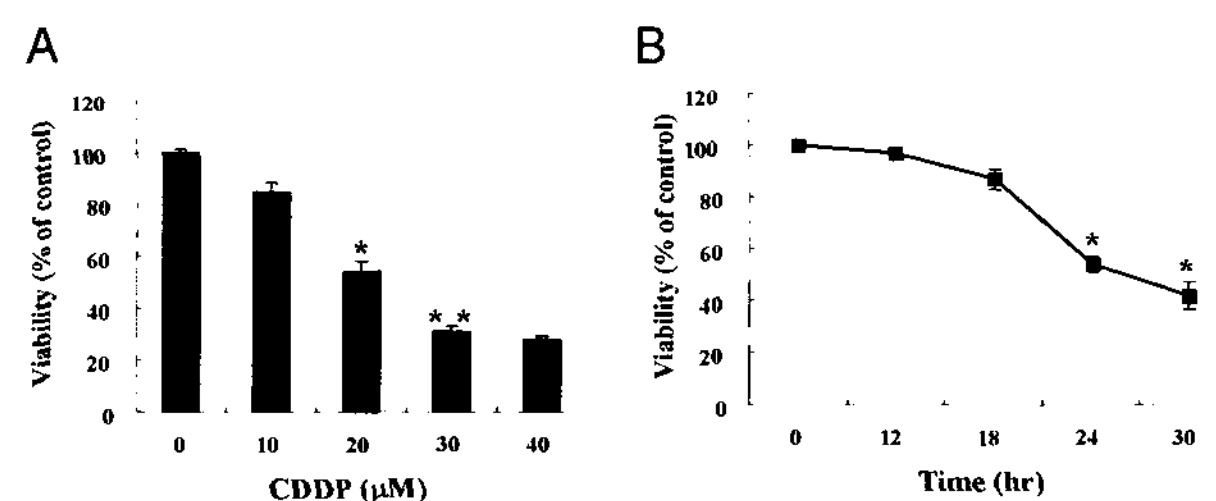


Fig. 1. Cisplatin decreased the viability of HEI-OC1 cells in a dose- and time-dependent manner. Cells were treated with various dose of cisplatin (CDDP) for 24 hr (A) and with 20 µM cisplatin for 30 hr (B). Cell viability was measured by MTT assay. The data represents the mean \pm S.D. from independent triplicates. **p*<0.05, ***p*<0.01

확인하기 위하여 HEI-OC1세포에 anti-TNF- α , anti-IL-1 β 및 anti-IL-6 항체 1.5 μ g/ml과 20 μ M cisplatin을 24시간 처리한 후 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다(Fig. 2). Anti-TNF- α 항체의 전처리는 cisplatin 세포독성을 예방하여 세포생존율이 cisplatin 단독 처리군의 50% 수준에서 70%로 증가하였다. 그러나 anti-IL-1 β 및 anti-IL-6 항체의 전처리는 cisplatin에 의한 HEI-OC1 청각세포의 생존율 회복에 유의한 변화를 나타내지 않았다. 또한, 이들 염증성 사이토카인 모두를 중화할 수 있는 anti-TNF- α , anti-IL-1 β 및 anti-IL-6 항체를 동시 전처리한 실험군의 cisplatin 세포독성 억제효과는 anti-TNF- α 항체만을 단독 전처리한 실험군과 유의한 차이가 없었다. 이상의 결과에서 염증성 사이토카인 TNF- α 가 cisplatin에 의한 청각세포 손상의 중요한 인자로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

Cisplatin이 랫트 코르티기관의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향

랫트 청각기관에서 cisplatin에 의한 염증성 사이토카인 생성을 확인하기 위하여 랫트 와우에서 분리 배양한 cochlear explant에 cisplatin을 처리한 후 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 분비를 ELISA 방법으로 조사하였다. Cisplatin 30 μ M을 30시간 처리한 상층액으로부터 염증성 사이토카인을 정량하였다(Fig. 3). Cisplatin 처리는 랫트 코르티기관의 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 분비를 현저히 증가시킴을 확인할 수 있었다.

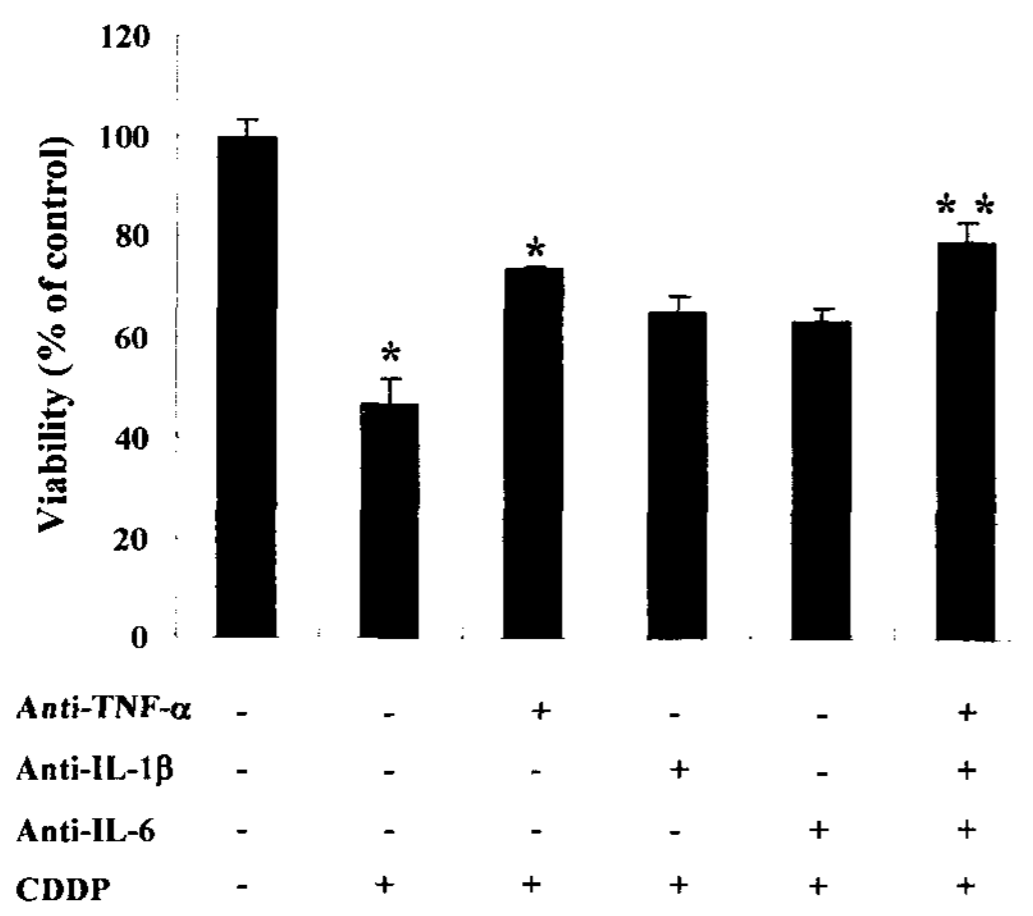


Fig. 2. Neutralization of TNF- α by pretreatment of anti-TNF- α antibody attenuated the cytotoxicity of cisplatin in HEI-OC1 cells. Cells were pretreated with 1.5 μ g/ml of monoclonal antibodies against pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β and IL-6, and then followed by the addition of 20 μ M cisplatin for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Data represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01

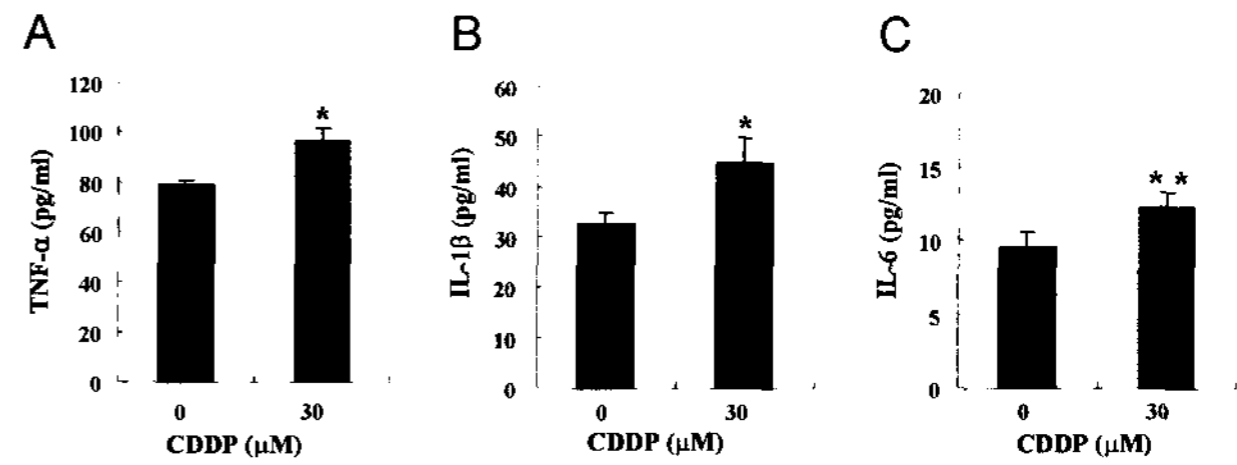


Fig. 3. Treatment with cisplatin resulted in an increase of the release of pro-inflammatory cytokine from the rat organ of Corti. The organ of Corti from day 2 neonatal rat was isolated and treated with 30 μ M cisplatin for 30 hr. Then, the secretion of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β and IL-6, was determined from culture supernatants by using ELISA kit. * p <0.05, ** p <0.01

Cisplatin 및 염증성 사이토카인이 청각세포 손상에 미치는 영향

염증성 사이토카인이 청각세포에 미치는 직접적인 영향을 조사하기 위하여, 랫트에서 분리한 organ of Corti 배양액에 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등을 처리한 후 청각세포의 stereocilia에 결합하는 phalloidin-TRITC 염색을 시행하였다. 정상 조직은 세 줄의 외측 청각유모세포(outer hair cell)와 한 줄의 내측 청각유모세포(inner hair cell) 배열로 이루어져 있으나, 30 μ M cisplatin 처리는 청각유모세포 손상에 의한 세포층 배열의 이상을 초래하였다. 또한 염증성 사이토카인 TNF- α (200 ng/ml), IL-1 β (200 ng/ml) 및 IL-6 (200 ng/ml)을 각각 처리한 실험군에서도 cisplatin 세포독성과 유사한 청각유모세포 배열의 파괴를 초래하였다. 이들 세 염증성 사이토카인의 병용처리는 상승효과를 나타내서 더욱 현저한 청각 유모세포 손상을 초래하였다(Fig. 4A). Fig. 4B는 각 실험군에서 임의로 정한 3개의 구역에서 청각유모세포의 수로 정량화하여 그래프로 표시하였다.

염증성 사이토카인의 중화(neutralization)가 cisplatin에 의한 코르티기관 청각유모세포 손상에 미치는 효과

염증성 사이토카인이 cisplatin에 의한 코르티기관 청각유모세포 손상에 미치는 효과를 조사하기 위하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6에 대한 중화항체를 전 처리한 후, phalloidin-TRITC 염색을 시행하였다. Cisplatin (30 μ M) 처리는 청각유모세포 stereocilia 손상을 초래하여, cisplatin에 의해 파괴된 외측 및 내측 청각유모세포의 배열은 anti-TNF- α (1.5 μ g/ml), anti-IL-1 β (1.5 μ g/ml) 및 anti-IL-6 (1.5 μ g/ml) 항체의 전처리에 의하여 현저히 보호되었다(Fig. 5A). Fig. 5B에서는 각 실험군에서 임의로 정한 3개의 구역에서 anti-TNF- α (1.5 μ g/ml), anti-IL-1 β (1.5 μ g/ml) 및 anti-IL-6 (1.5 μ g/ml) 항체 전처리에 의한 청각유모세포의 보호 효과를 phalloidin-TRITC 염색 세포수로 정량화하여 도식화 한 결과이다.

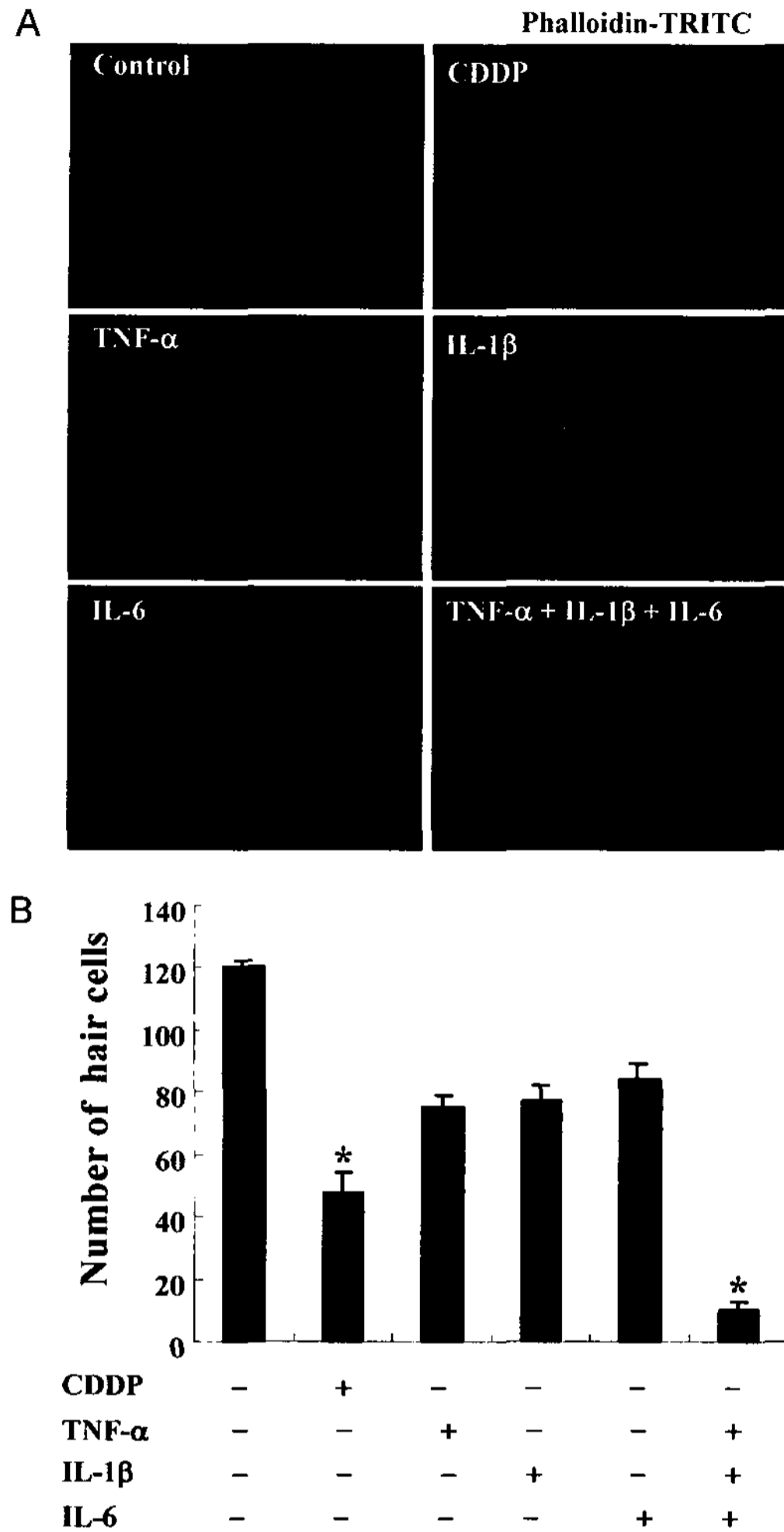


Fig. 4. Treatment with pro-inflammatory cytokine directly resulted in the disarrangement of sensory hair cell layers and decreased in the number of hair cells in organ of Corti. The rat primary organ of Corti was isolated and maintained with pro-inflammatory cytokines, including TNF- α (200 ng/ml), IL-1 β (200 ng/ml) and IL-6 (200 ng/ml) for 36 hr. Then, the sensory hair cells were stained by phalloidin-TRITC (A). The numbers of sensory hair cells, including IHC and OHC, were counted in the basal turn of the cochlea at 30 hr after treatment with cisplatin or at 36 hr after treatment with pro-inflammatory cytokines and represented as histogram (B). * p <0.05

항산화제가 cisplatin에 의한 organ of Corti의 청각 유모 세포 손상에 미치는 영향

Cisplatin에 의한 활성산소종의 과생성은 산화적 스트레스 기전을 통하여 세포 손상을 초래한다[6]. 랫트에서 분리한 organ of Corti의 청각유모세포 손상에 대한 활성산소종의 역할을 확인하기 위하여 대표적 항산화제인 GSH (15 mM) 와 NAC (15 mM)를 각각 1시간 전처리하고, 다양한 농도의 cisplatin (20-50 μ M)을 30시간 처리한 후에 phalloidin-

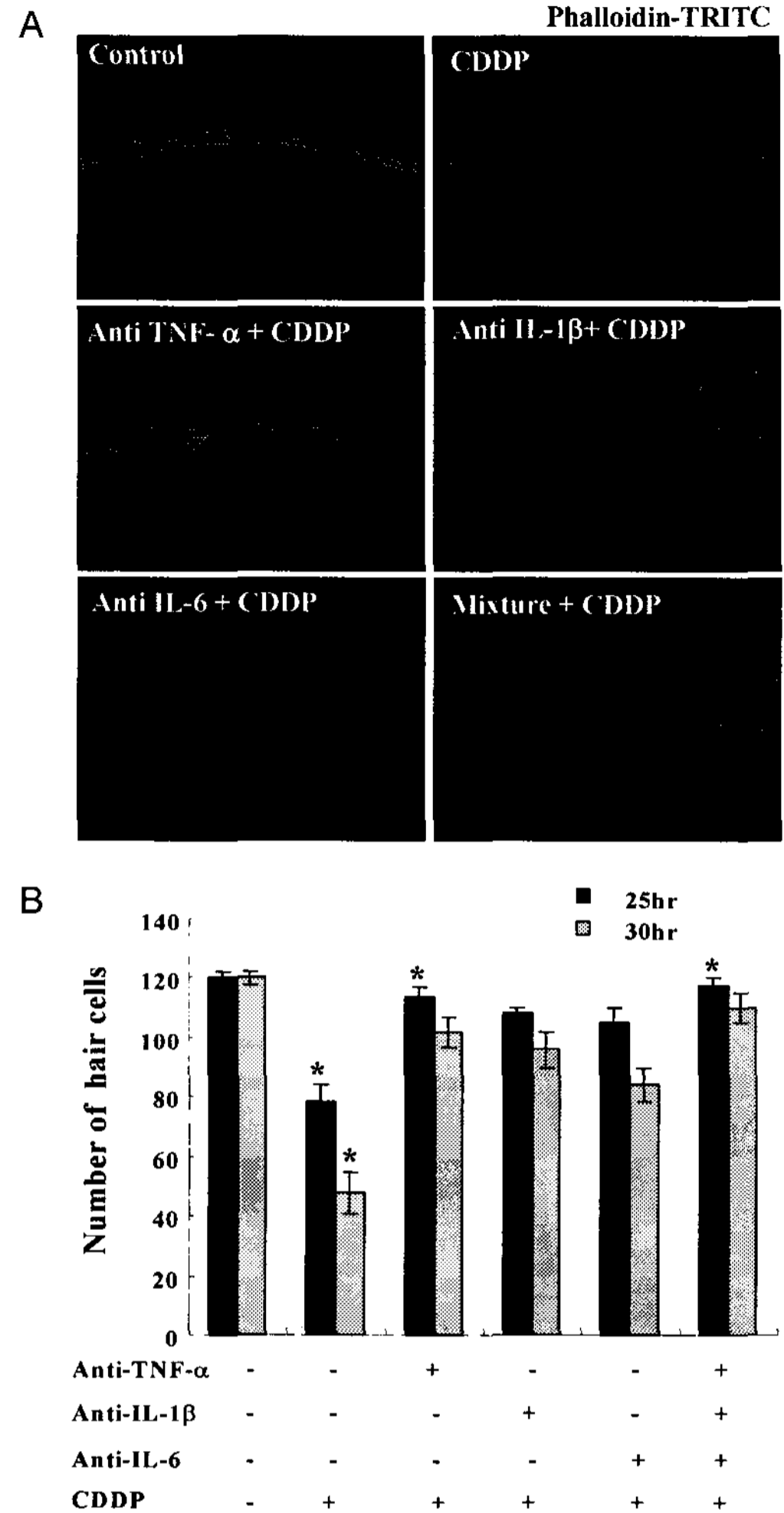


Fig. 5. Neutralization with pro-inflammatory cytokines attenuated the cytotoxicity of cisplatin in sensory hair cells of rat organ of Corti. The organ of Corti cultures were pretreated with monoclonal neutralizing antibodies, including anti-TNF- α , anti-IL-1 β and anti-IL-6 antibodies, and then followed by the addition of 30 μ M cisplatin for 25 hr and 30 hr. Stereocilia bundle of organ of Corti was stained by phalloidin-TRITC (A). The numbers of sensory hair cells, including IHC and OHC, were counted in the basal turn of the cochlea at 25 hr and 30 hr after treatment with cisplatin or pro-inflammatory cytokines and represented as histogram (B). * p <0.05

TRITC 염색을 시행하였다. 항산화제 GSH와 NAC의 전처리는 다양한 농도의 cisplatin에 의하여 유발된 청각 유모세포의 손상과 배열의 파괴를 현저히 보호하였다(Fig. 6A). Fig. 6B에서는 각 실험군에서 임의로 정한 3개의 구역에서 GSH와 NAC에 의한 organ of Corti 청각 유모세포의 보호 효과를 phalloidin-TRITC 염색 세포 수로 정량화하여 도식화 한 결과이다(Fig. 6B).

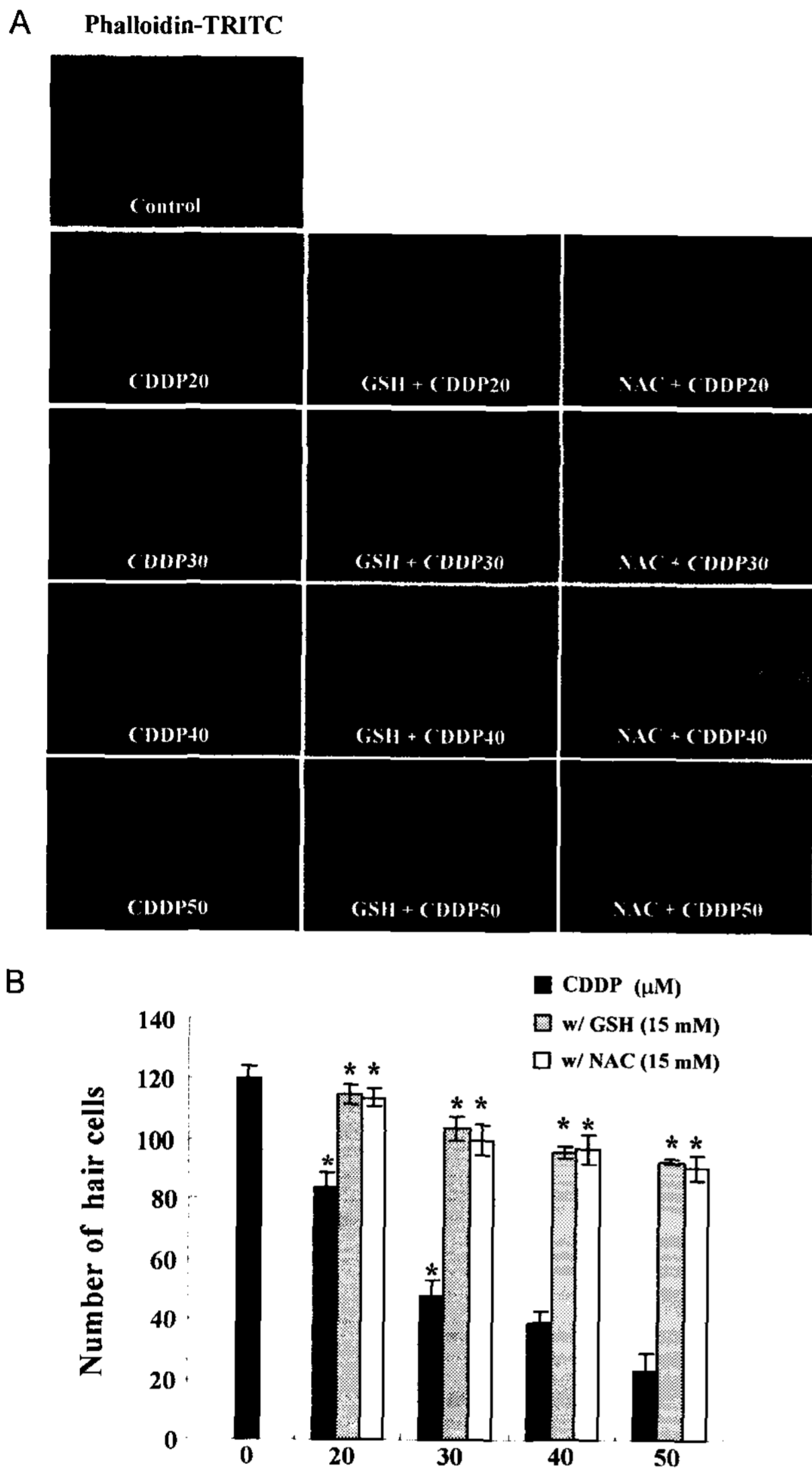


Fig. 6. Pretreatment of antioxidants significantly protected sensory hair cells of organ of Corti from cisplatin. The cultures of rat cochlear explants were pretreated with antioxidants, including GSH and NAC, for 1hr before the addition of 20-50 μM cisplatin for 30 hr. The whole cochlear explants were stained with phalloidin-TRITC (A). The numbers of sensory hair cells, including IHC and OHC, stained with phalloidin-TRITC were counted in the basal turn of the cochlea and represented as histogram (B). Each column represents the mean±S.D. from three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01

Cisplatin치리에 의한 청각유모세포의 TNF-α 발현

Cisplatin에 의한 청각유모세포 손상은 염증성 사이토카인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등의 분비와 연관함을 확인하였기 때문에, cisplatin을 처리한 cochlear explant에서 cisplatin에 의한 TNF-α의 발현을 immunocytochemistry 방법을 통하여 조사하였다. 랫트 코르티기관 청각유모세포는 phalloidin-TRITC, DAPI 그리고 anti-TNF-α 항체를 이용하여 면역형광을 시행

한 후에 형광현미경으로 관찰하였다. Cisplatin에 의한 TNF-α 발현은 cochlear explant의 Hair cell zone에 위치한 Deiters 세포(Fig. 7A, white arrow)와 Hensen's 세포(Fig. 7A, red arrow)에 현저하였으며, 외측 및 내측 Pillar 세포, spiral ganglion neurons, 및 cochlear nerve에서도 관찰되었다. 그러나 claudius 세포에서 TNF-α 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

고찰

청각유모세포는 최종적인 세포 분화 이후에 소음, 이독성 약물 및 노화 등에 의한 손상으로부터 영원히 재생하지 않는 특징을 가진다. 중추신경계의 신경세포와도 유사한 특징을 가진 청각유모세포는 성장, 분화 그리고 사멸 기전이 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다.

Cisplatin은 다양한 종류의 항암치료에 사용하고 있으나 이독성과 신장독성 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있기 때문에 효과적인 암치료를 위한 사용에 제한을 받고 있다[5]. Cisplatin의 이독성에 관련된 연구는 *in vitro* [15,17], *ex vivo* [3,6] 및 *in vivo* [7,12,16]에서 활발하게 진행되고 있다. Cisplatin에 의한 이독성 기전은 활성산소종 생성에 의한 lipid peroxydation 증가, 미토콘드리아 기능 이상, DNA 손상

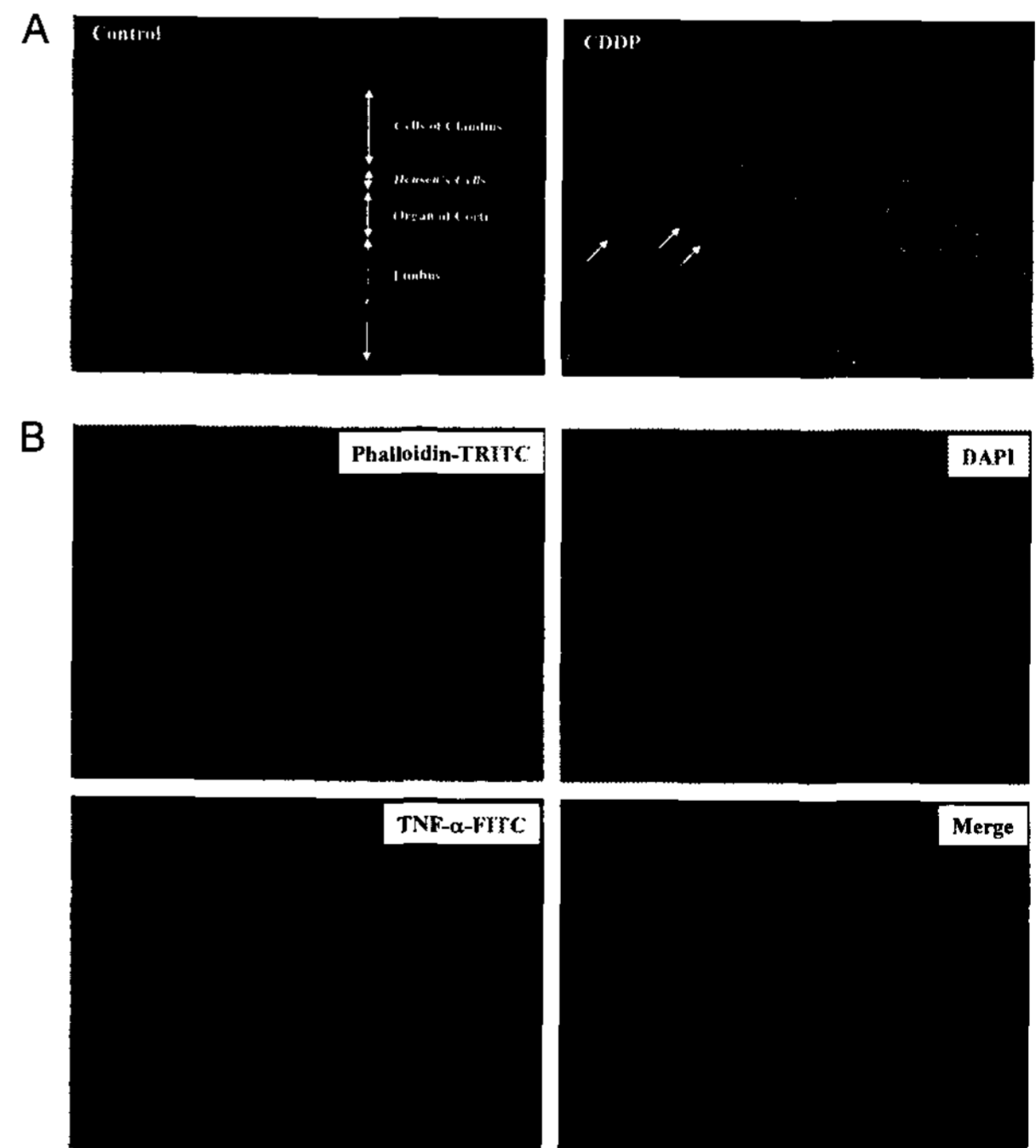


Fig. 7. TNF-α was mainly expressed in Deiters and Hensen's cells of cochlear explants after treatment with cisplatin. The cultures of cochlear explants were maintained with 30 μM cisplatin for 25 hr, stained with hair cell specific phalloidin-TRITC (red), DAPI (blue), and anti-TNF-α (green) and observed under fluorescent microscope.

등이 잘 밝혀져 있다[6,11,15]. 그러나, cisplatin에 의한 염증성 사이토카인 생성과 이에 연관된 청각 유모세포 손상에 대한 연구는 아직까지 미비하다.

TNF- α 는 염증반응에서 가장 중요한 염증성 사이토카인으로 염증반응과 다양한 면역질환의 병인으로 잘 알려져 있으며 세포자멸사 뿐만 아니라 세포괴사의 원인이 된다. 또한, TNF는 세포 면역물질이면서 종양을 괴사시키는 특수한 성질 때문에 다방면으로 연구되어져 왔다. 세포가 방출하는 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인은 세포가 가진 수용체를 통하여 근접 세포내로 신호가 전달되어진다. 세포 표면에는 death receptor가 존재하며, 이들은 세포를 죽음으로 유도하는 물질들을 인지하고, 수용하여 세포내로 신호를 전달하는 기능을 한다[2,8,19].

IL-1 β 는 호중구를 활성화시켜 염증부위로 이동시키며 Prostaglandin E2 (PG-E2) 생성유도에 의해 발열을 유발하여 TNF- α 와 함께 염증반응의 주된 매개자로 작용하는 NO를 비롯한 superoxide anion등의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다[8]. 염증반응이 일어나면 TNF- α , IL-1 β 와 같은 초기 염증반응 사이토카인을 분비한다. IL-2, IL-4, IL-6와 같은 후기 염증반응 사이토카인은 염증 반응을 더욱 심하게 만든다[2].

이 연구에서는 cisplatin에 의한 이독성이 염증성 사이토카인과 관련되어 있는지에 대하여 조사하였다. Cisplatin 처리는 cochlear explant에서 TNF- α 발현을 유도하였다. TNF- α 발현은 주로 Deiters 및 Hensen's 세포에 현저하게 증가되어 있었으며, 외측 및 내측 청각유모세포를 지지하는 phalangeal 세포와 inner/outer pillar 세포, Interdental 세포, 및 limbus에서도 관찰되었다. 그러나, cochlear nerve에서는 TNF- α 발현이 미미하였으며, Claudius 세포에서는 TNF- α 발현을 관찰할 수 없었다. TNF- α 발현의 근원세포나 조직을 규명하기 위해서는 추가적인 *in situ* hybridization 실험이 추가적으로 요구된다. TNF가 수용체에 결합하게 되면 phosphatidylcholine-specific phospholipase C와 acidic, neutral sphingomyelinase를 활성화시켜 ceramide를 생성시키고, ceramide는 proline-directed kinase (CAPK, MAPK)를 활성화시킨다. CAPK, MAPK에 의해 phospholipase A2가 방출되고, phospholipase A2는 arachidonic acid를 생성하여 대사과정 중에 산소라디칼이 형성된다. 이와 같이 TNF는 유해활성산소를 생성시키는 여러 효소의 생성을 촉진하여 세포 내 독성을 유도함이 보고되어져 있다[22]. 이와 같은 보고에 의하여 염증반응의 주된 매개자로 작용하는 활성산소종을 항산화제로 감소시켰을 경우에 코르티기관의 청각유모세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이 실험에서 대표적인 항산화제 GSH와 NAC는 cisplatin에 의한 청각 유모세포의 사멸을 완벽하게 억제 할 수 있었다.

Cisplatin에 의한 염증성 사이토카인의 생성 증가는 신장 세포에서 보고되었지만[23], 이들 염증성 사이토카인이 청각

기능 상실의 원인으로 작용할 수 있다는 연구는 대단히 중요하다. 그러나 cisplatin에 의한 염증성 사이토카인 발현 유도 기전에 대한 연구와 염증성 사이토카인과 활성산소종의 상관관계에 대한 추후 연구가 필요하다고 생각된다.

이 연구에서는 청각세포주 HEI-OC1세포와 랫트 cochlear explant에 cisplatin을 처리한 결과 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 증가시켰으며, 이들 염증성 사이토카인은 상호 작용을 통하여 세포독성에 대한 상승효과를 나타냈다. 또한 cisplatin에 의하여 생성된 염증성 사이토카인의 직접적인 세포독성 작용은 이들 염증성 사이토카인의 중화항체 실험에서 확인하였다.

이상의 결과는 cisplatin을 포함한 이독성의 원인 기전으로 청각 유모세포에 대한 염증성 사이토카인의 직접적인 손상기전이 작용할 수 있음을 확인할 수 있었으며 또한, 염증성 사이토카인의 조절을 통한 이독성의 예방과 치료방법의 개발 가능성을 제공할 수 있으리라 생각된다.

요 약

Cisplatin은 임상적으로 다양한 종류의 종양 치료에 사용되는 중요한 항암제 중의 하나이다. 그러나 cisplatin은 이독성, 신장독성, 골수독성, 위장독성 및 말초신경독성 등의 심각한 부작용으로 인하여 사용이 제한적이다. Cisplatin에 의한 청각 장애에서 organ of Corti 외측 유모세포(outer hair cells) 손상이 유발한다. Cisplatin에 의한 세포독성에 대한 연구가 진행중이지만 pro-inflammatory cytokine과 관련된 청각세포사멸에 대한 연구는 미비하다. 이 연구에서 cisplatin은 청각세포주 HEI-OC1 세포와 랫트 cochlear explant에서 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 유전자 발현과 분비를 현저히 증가시켰다. 이들 염증성 사이토카인은 organ of Corti 청각유모세포에 직접적인 세포독성을 나타내어 외측 및 내측 유모세포와 배열을 파괴하였다. 염증반응에서 중요한 TNF- α 를 cisplatin을 처리한 실험군에서 immunocytochemistry를 통하여 관찰 한 결과 organ of Corti에서의 발현이 현저히 증가됨을 관찰하였다. 염증성 사이토카인에 대한 중화항체를 처리하여 cisplatin에 의한 세포독성이 현저히 감소됨을 HEI-OC1 세포와 청각유모세포에서 확인하였다. 또한 GSH, NAC와 같은 항산화제를 처리하여 세포독성이 현저히 감소됨을 확인하였다. 이상의 결과는 cisplatin에 의한 청각유모세포의 죽음에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인이 병리 생리학적으로 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교 승산연구비 지원에 의해서 수행됨.

References

1. Alam, S. A., K. Ikeda, T. Oshima, M. Suzuki, T. Kawase, T. Kikuchi and T. Takasaka. 2000. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hearing Research* **141**, 28-38.
2. Brueckmann, M., T. Bertsch, S. Lang, T. Sueselbeck, C. Wloper, J. J. Kaden, C. Jaramillo, G. Huhel, M. Borggreffe and K. K. Haase. 2004. Time course of systemic markers of inflammation in patients presenting with acute coronary syndromes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, 1132-1139.
3. Ding, D., A. Stracher and R. J. Salvi. 2002. Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity. *Hearing Research* **164**, 115-126.
4. Estrem, S. A., R. W. Babin, J. H. Ryu and K. C. Moore. 1981. Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **90**, 638-645.
5. Farm, R. J. 1992. Cisplatin and platinum analogues: recent advances. *Curr. Opin. Oncol.* **4**, 1073-1079.
6. Feghali, J. G., W. Liu and T. R. Van De Water. 2001. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope.* **111**, 1147-1155.
7. Fujinobu, T., C. A. Whitworth and L. P. Rybak. 2003. Influence of PH on the ototoxicity of cisplatin: a round window application study. *Hearing Research* **177**, 21-31.
8. Hikiji, H., W. S. Shin, T. Koizumi, T. Takato, T. Susami, Y. Koizumi, Y. Okai-Matsuo and T. Toyo-Oka. 2000. Peroxynitrite production by TNF-alpha and IL-1beta: implication for suppression of osteoblastic differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E1031-E1037.
9. Jordan, P. and M. Carmo-Fonseca. 2000. Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 1229-1235.
10. Kalinec, G. M., P. Webster, D. J. Lim and F. Kalinec. 2003. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol. Neurootol.* **8**, 177-189.
11. Kartalou, M. and J. M. Essigmann. 2001. Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* **478**, 23-43.
12. Kathleen, C. M., L. P. Campbell, R. P. Rybak and L. H. Meech. 1996. D-Methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hearing Research* **102**, 90-98.
13. Kopke, R. D., W. Liu, R. Gabaizad, A. Jacono, J. Feghali, D. Spray, P. Garcia, H. Steinman, B. Malgrange, R. J. Ruben, L. Rybak and T. R. Van De Water. 1997. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *AM. J. Otol.* **18**, 559-571.
14. Laurell, G. and S. D. Batter. 1991. Degeneration of the organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. *Acta. Otolaryngol.* **111**, 891-898.
15. Prasad, D., S. Michelle, M. C. Patricia, M. S. Park, E. C. Nora, G. Kalinec and F. Kalinec. 2002. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of dath receptor and mitochondrial pathways. *Hearing Research* **174**, 45-54.
16. Rybak L. P., K. Husain, C. Whitworth and S. M. Somani. 1999. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: Antioxodant defense system. *Toxicological Sciences* **47**, 195-202.
17. So, H. S., C. Park, H. J. Kim, J. H. Lee, S. Y. Park, J. H. Lee, Z. W. Lee, H. M. Kim, F. Kalinec, D. J. Lim and R. Park. 2005. Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. *Hearing Research* **204**, 127-139.
18. So, H., H. Kim, J. H. Lee, C. Park, Y. Kim, E. Kim, J. K. Kim, K. J. Yun, K. M. Lee, H. Y. Lee, S. K. Moon, D. J. Lim and R. Park. 2007. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **8**, 338-355.
19. Strock, M., M. Schilling, K. Burkhardt, R. Prestel, D. Abendroth and C. Hamme. 1994. Production of proinflammatory cytokine and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic Kidney perfusion. *Transpl. Int.* **1**, S647-S649.
20. Teranishi, M., T. Nakashima and T. Wakabayashi. 2001. Effects of alphatocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hearing Research* **151**, 61-70.
21. Watanabe, K. C., K. Jinnouchi, A. Hess, O. Michel, S. Baba and T. Yagi. 2002. Carboplatin induces less apoptosis in the cochlea of guinea pigs than cisplatin. *Chemotherapy* **48**, 82-87.
22. Yang, C. S., H. M. Lee, J. Y. Lee, J. A. Kim, S. J. Lee, D. M. Shin, Y. H. Lee, D. S. Lee, J. El-Benna and E. K. Jo. 2007. Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J. Neuroinflammation* **4**, 27.
23. Zhang, B., G. Ramesh, C. C. Norbury and W. B. Reeves. 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* **72**, 37-44.