



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



2016년 2월
박사학위논문

Cisplatin 유발성 이독성에 대한 Tempol의 보호효과

조선대학교 대학원

의학과

김준

Cisplatin 유발성 이독성에 대한 Tempol의 보호효과

Protective effect of tempol against
cisplatin-induced ototoxicity

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

김준

Cisplatin 유발성 이독성에 대한 Tempol의 보호효과

지도교수 : 도 남 용

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함.

2015년 10월

조선대학교 대학원

의학과

김준

김 준의 박사학위논문을 인준함

위 원장 성균관대학교 교수 홍성화 인

위 원 조선대학교 교수 도남용 인

위 원 조선대학교 교수 최지윤 인

위 원 조선대학교 교수 박준희 인

위 원 조선대학교 교수 조성일 인

2015년 12월

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

도목차	i
영문초록	1
I. 서 론	3
II. 연구재료 및 방법	4
III. 결 과	10
IV. 고 쟈	14
V. 결 론	17
VI. 참고문헌	18
VII. 사진부도	22

도 목 차

Fig. 1. Effect of tempol on viability of HEI-OC1 cells. The viability was not significantly affected until a 50 μ M concentration of tempol was reached. However, tempol was cytotoxic at a concentration over 100 μ M. HEI-OC1 cells were maximally protected at 50 μ M concentration of tempol. *Optimal experimental concentration of tempol. ----- 22

Fig. 2. HEI-OC1 cells were pretreated with 50 μ M tempol for 2 h, and then exposed 30 μ M cisplatin for 24 h. Tempol provided a significant protection against cisplatin cytotoxicity. (CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$) ----- 23

Fig. 3. Apoptotic features in HEI-OC1 cells were reduced by pretreatment with 50 μ M tempol for 2 h before cisplatin exposure for 24 h. The Control and tempol treated cells show round-shaped nuclei with homogeneous intensity (A,C). Ciplatin exposed cells show condensed and fragmented nuclei (B). These features are reduced in pretreated cells with tempol (D). ----- 24

Fig. 4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was determined by flow cytometry (A). ROS production increased in the cisplatin group. However, the tempol-pretreated group had significantly lower ROS production (B, CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$). ----- 25

Fig. 5. The number of apoptotic cells was counted using flow cytometry.

Apoptotic cells were reduced by pretreatment with 50 μ M tempol for 2 h before cisplatin exposure for 24 h. (CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$) ----- 26

Fig. 6. Effect of tempol on cisplatin-induced changes in apoptosis markers

and nitric oxide synthase (NOS). Expression of cleaved PARP, cleaved caspase-3 and iNOS increased in the cisplatin-treated group. However, tempol inhibited the expression of cleaved PARP, cleaved caspase-3 and iNOS. (CP; cisplatin, TP; tempol) ---- 27

Fig. 7. Confocal microscopic studies of the mitochondria and the nucleus

in HEI-OC1 cells. Cells seeded on coverslips were treated with 30 μ M cisplatin for 24 h with or without pretreatment of 50 μ M tempol for 2 h. Mitochondrial structure was detected by Mitotracker (red dot) staining in the control and tempol groups. In contrast, the mitochondrial structure decreased in the cisplatin alone group. Pretreatment with tempol improved the structural expression. - 28

Fig. 8. Mitochondrial polarization was determined by flow cytometry (A).

Exposure to 30 μ M cisplatin for 24 h caused mitochondrial depolarization. Enhancement of mitochondrial depolarization significantly decreased in pretreated cells with 50 μ M tempol for 2 h before cisplatin exposure (B, CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$). ----- 29

ABSTRACT

Protective effect of tempol against cisplatin-induced ototoxicity

Kim Jun

Advisor : Nam-Yong Do, MD, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

One of the major side effects of cisplatin chemotherapy is hearing loss. Ototoxicity disturbs treatment and often reduces the dosage of the cisplatin chemotherapy. This study aimed to investigate the effect of tempol on cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. Cultured HEI-OC1 cells were exposed to 30 μ M of cisplatin for 24 hours with or without pre-treatment with tempol. Cell viability was determined by the MTT assay. Cells undergoing apoptosis were identified using Hoechst 33258 staining and flow cytometry. Western blot analysis was done to determine whether tempol inhibited cisplatin-induced C-PARP, C-Caspase and mNOS activation. Intracellular reactive oxygen species(ROS) were tested to investigate whether tempol was able to scavenge cisplatin-induced ROS accumulation. Confocal microscopic studies of the mitochondria was done and mitochondrial membrane potential was tested to investigate whether tempol was able to protect cisplatin-induced mitochondrial dysfunction. The cisplatin-treated group showed decreased cell viability, increase in apoptotic features and markers, increase in ROS

accumulation and increase in mitochondrial dysfunction. Pre-treatment of tempol before cisplatin exposure significantly increased cell viability and reduced apoptotic features, ROS production and mitochondrial dysfunction. These results demonstrate that tempol inhibited cisplatin-induced cytotoxicity in the auditory cell line and tempol could play a preventive role against cisplatin-induced ototoxicity.

Key Words : Cisplatin, Ototoxicity, Tempol, Apoptosis

I. 서 론

Cisplatin은 두경부 종양을 포함한 난소, 고환, 폐, 방광등에 발생한 고형암의 치료에 효과적인 치료제이다. 하지만, 우수한 효과에도 불구하고 이독성으로 인한 난청이 발생할 수 있어 그 사용이 제한될 수 있으며(Rybak LP et al, 2007) 이로 인해 효과적인 항암치료에 제한을 받을 수 있다. 아직까지 Cisplatin에 의한 이독성의 정확한 기전은 완전히 밝혀지지 않았으나 증가된 활성산소종(Reactive oxygen species)이 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 와우내 항산화효소의 결핍으로(Dehne N et al, 2001), 유모세포로의 칼슘 유입을 일으켜 세포 자멸사(Apoptosis)를 유발하여 발생하는 것이 주된 기전으로 보고되고 있다(Gonçalves MS et al. 2013).

Tempol(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxy)은 Nitroxide 화합물의 일종으로 Superoxide dismutase(SOD)나 Catalase와 같은 막투과성 유리기 제거제(radical scavenger)이다. 세포내 산화균형을 회복시키고 산화 스트레스를 완화시켜 신장독성을 완화시키거나(Ahmed LA et al, 2014) 심근경색 실험모델에서 경색 크기를 줄이고(McDonald MC et al. 1999) 림프구 유전독성에 대한 보호효과가 있는 것으로 그동안 보고되었다. 특히 혈뇌장벽을 쉽게 통과하여 신경보호 작용을 나타낼 수 있다(Liang Q et al, 2005). 이와 같은 Tempol의 항산화제로서의 역할은 Cisplatin에 의한 산화 스트레스도 억제할 가능성이 높을 것으로 생각되어진다.

이에 저자는 Cisplatin에 의한 이독성을 유발하는 기전으로 알려진 활성산소종에 의한 세포 자멸사 억제에 Tempol이 관여하는지 확인하고 Cisplatin 유발성 난청의 보호 물질로서의 가능성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

청각 세포주중 이독성에 민감하고 코르티 기관의 특징적인 문자 표지자를 나타내는 것으로 알려진 House Ear Institute–Organ of Corti 1(HEI-OC1) 세포주를 사용하였다. HEI-OC1 세포주는 Transgenic immortomouse의 생후 코르티 기관에서 분리되었다.

2. 연구방법

가. 세포 배양

HEI-OC1 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Lonza Walkersville, MD, USA)과 함께 고농도의 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; GIBCO BRL, NY, USA)에서 배양하였으며 5% CO₂와 33°C의 환경으로 유지하여 분화되지 않고 계속적 증식이 가능하게 하였다. Cisplatin, Tempol(Sigma, Saint Louis, MO, USA)에 각각 24시간 동안 노출시켜 배양하였으며 Tempol의 전처치군에서는 2시간 동안 Tempol을 전처치한 후 Cisplatin에 24시간 동안 노출시켜 배양하였다.

나. MTT 분석

세포 생존율 분석을 위해 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 시행하였다. HEI-OC1 세포를 24 well plate에 각 well당 3×10^4 세포를 분주한 후 5% CO₂와 33°C의 환경이 유지되는 항온항습기에서 배양하였다. 각 well의 0.5ml 세포액에 5 mg/ml의 MTT

용액(Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 처리하여 5% CO₂와 33°C의 항온항습기에 4시간 더 배양하였다. Formazan 결정을 원심분리후 각 well당 500 μL의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가한 후에 570 nm의 파장에서 분광광도계(BioTek, VT, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

다. Hoechst 33258 염색

자멸사에 의한 세포사를 검사하기 위해 HEI-OC1 세포의 핵을 Hoechst 33258(Sigma, Saint Louis, MO, USA) 시약을 이용하여 염색하였다. HEI-OC1 세포를 6 well plate에 각 well당 3×10^5 세포를 분주한 후 5% CO₂ 와 33°C의 환경이 유지되는 항온항습기에서 배양하였다. 각 well에 10 μg/mL Hoechst 33258 시약을 사용하여 10분간 염색하였다. 세포를 13000 rpm로 200 초 동안 원심분리 후 배양액을 제거하였다. 모아진 세포들은 phosphate buffered saline(PBS)로 세척 후 상온에서 10분 동안 4% formaldehyde로 고정하였다. PBS를 사용하여 2회 세척 후 형광현미경(Olympus IX71, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하였다.

라. Western blot 분석

세포들을 모아 2000 rpm으로 3분 동안 원심분리 후 배양액을 제거하였다. 세포들을 PBS로 씻은 후 lysis buffer(20 mM HEPES; pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM glycerol phosphate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, and 5 mM NaF)와 0°C에서 10분간 반응시키고 15000 rpm으로 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bio-Rad dye binding microassay(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량한 후 Laemmli sample buffer에서 98°C로 5분간 가열한 후 SDS-PAGE gel 전기영동을 시행하였다. 단백질을 nitrocellulose membrane(Millipore, Darmstadt, Germany)으로 옮긴 후 TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137

mM NaCl, and 0.1% Tween-20)와 5% skim milk를 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 결합을 억제한 다음 일차 항체와 반응시켰다. 일차 항체는 Cleaved PARP, Cleaved Caspase-3, iNOS(Cell signaling Technology, Danvers, USA), COX-1, β -actin(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 사용하였고, 각각 TBST 용액에 1:1000으로 희석하여 membrane을 넣고 4°C에서 밤새 반응시켰다. 그리고 TBST로 15분 동안 4차례 세척한 후 이차 항체를 1:4000으로 희석한 5% skim milk 용액에 2시간 동안 반응시킨 후 다시 TBST로 4차례 세척 하였다. 2차 항체는 Sheep anti-mouse, Donkey anti-rabbit(Jackson immunoresearch, PA, USA), Donkey anti-gout(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 사용하였다. 단백질 랜드는 Western blot detection system(iNtRON biotechnology, Daejun, Korea)을 이용하여 검출하였으며 이미지 분석기(LAS-3000 imaging system, FujiFilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영을 시행하였다.

마. 세포내 활성산소종 측정

HEI-OC1 세포를 6 well plate에 각 well당 3×10^5 세포를 분주한 후 5% CO₂와 33°C의 환경이 유지되는 항온항습기에서 배양하였다. 배양용기의 세포들에 Trypsin을 처리하여 단일 세포로 분리한 후 1000 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 상층액을 버리고, PBS를 이용하여 세척하였다. 10 μ M의 CM-H₂DCFDA(fluorochrome marker 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 용액에 세포를 부유시켜 15분동안 5% CO₂와 33°C의 환경이 유지되는 항온항습기에서 배양하였다. 세포들을 PBS로 2회 씻은후 Flow cytometry(FACScalibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 형광 강도를 측정하였다. 활성산소종 측정은 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 분석하였고, 계산된 형광 강도 측정치의 평균값으로 비교 분석하였다.

바. 자멸사 세포 분석

배양용기에 부착된 세포에 Trypsin을 처리하여 분리된 세포들을 2000 rpm 으로 3분 동안 원심분리 후 배양액을 제거하였다. 세포들을 Ice-cold PBS로 세척 후 4°C에서 30분 동안 70% cold ethanol로 고정하였다. PBS로 다시 두 번 세척 후 Propidium iodide 용액(50ug/ml PI, 50ug/ml RNase A, and 0.05% Tritone X-100 in PBS)에 15분 동안 반응시켰다. PI 시약이 염색된 세포 DNA의 형광 강도를 Flow cytometry(FACScalibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였고 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 형광 강도에 따라 DNA 양을 계산하였다. G0/G1 주기 미만 세포수를 Sub-G0/G1 세포라 하고 자멸사 세포로 분석하였다.

사. 형광현미경을 통한 미토콘드리아의 형태학적 분석

6 well plate에 각 well에 Poly-L-lysine(Sigma, Saint Louis, MO, MSA)을 입힌 12mm cover glass(Deckglaser, Braunschweig, Germany)를 넣고 HEI-OC1 세포를 분주한 후 Cisplatin 및 Tempol을 처리하여 5% CO₂와 3 3°C의 환경이 유지되는 항온항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포는 혈청이 없는 배지에서 200 nM MitoTracker® Red CMXRos(Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 20분간 염색하였다. 염색된 세포를 PBS를 이용하여 세척 후 실온에서 15분간 3.7% formaldehyde 1mL를 이용하여 고정하였다. 고정된 세포들을 PBS로 2회 세척후 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) (GBI Labs)를 포함한 Fluorescent mounting medium을 이용하여 세포가 부착된 cover glass를 슬라이드에 고정하였고 Zeiss LSM 510 Meta 공초점 현미경(Carl Zeiss, Milano, Italy)으로 촬영하였다.

아. Mitochondrial membrane potential 분석

MitoTracker® Red CMXRos(Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 Mitochondrial membrane potential 분석을 시행하였다. HEI-OC1 세포에 Cisplatin 및 Tempol을 처리한 후 24시간 배양하였다. 혈청이 없는 배지에서 200 nM MitoTracker® Red CMXRos(Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 20분간 염색하였다. 세포에 Trypsin을 처리하여 세포를 분리한 후 1000 rpm으로 3분동안 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 세포들을 PBS로 2회 세척 후 Flow cytometry(FACScalibur, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 형광 강도를 측정하였고 Cell Quest 소프트웨어(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 계산하였다.

자. 미토콘드리아 분리

배양된 세포들을 2000 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 세포들을 ice-cold PBS로 세척 후 1mL 세포질 추출 buffer(1 mM HEPES (ph 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 0.2% NP-40)에서 5분 동안 얼음환경하에 반응시켰다. 배양한 후 25개이지 1mL 주사기를 이용하여 20회 통과시켰다. 세포 파괴물(Cell debris)은 4°C에서 15분 동안 13000 rpm으로 원심분리하여 제거하였다. 상층액은 다시 15분 동안 80000 rpm으로 원심분리 하였으며 가라앉은 미토콘드리아를 1mL 세포질 추출 buffer로 세척하여 단백질을 제거하였다. 이 후 미토콘드리아를 100 µL lysis buffer(20 mM HEPES; pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM glycerol phosphate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, and 5 mM NaF)에 용해시켰다. 미토콘드리아의 순도를 높이기 위하여 3초 동안 2회 초음파 처리를 한 후 4°C에서 15분 동안 13000 rpm으로 원심분리하여 상층액 미토콘드리아 단백질을 분리하였다.

차. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Student's paired t -test를 이용하여 검정하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. Tempol에 의한 HEI-OC1 세포 생존력 변화

Tempol이 세포 생존력에 미치는 영향을 알아보고자 HEI-OC1 세포를 Tempol 농도별로 노출시켜 세포 생존력을 분석하였다. 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M에 24시간 노출한 결과 세포 생존력은 각각 104.8 \pm 1.8%, 97.8 \pm 4.9%, 97.3 \pm 5.3%, 96.0 \pm 5.2%, 90.3 \pm 3.1%, 86.2 \pm 2.7%의 생존율을 나타내었다. 각각의 Tempol 농도별로 2시간 전처치후 30 μ M의 Cisplatin에 24시간 동안 노출하여 세포 생존력을 분석한 결과 각각 65.6 \pm 2.1%, 69.0 \pm 1.9%, 82.0 \pm 4.3%, 83.9 \pm 3.9%, 79.7 \pm 6.8%, 75.3 \pm 5.1%의 생존율을 나타내었다. 50 μ M의 Tempol 농도까지 세포생존력에 큰 변화는 없었으며 50 μ M 농도의 Tempol을 전처치한 결과 Cisplatin에 대한 가장 큰 보호효과를 나타내어 실험을 위한 적정 농도로 사용하였다(그림 1).

2. Tempol의 Cisplatin 세포독성에 대한 보호효과

HEI-OC1 세포를 각각 Control 군, 30 μ M Cisplatin 처치군, 50 μ M Tempol 처치군, 50 μ M Tempol로 2시간 전처치후 30 μ M Cisplatin 처치군으로 나누어 24시간 동안 세포배양 후 세포 생존력을 비교하였으며 Control 군 대비 각각 59.2 \pm 3.1%, 96.0 \pm 5.2%, 83.9 \pm 3.9%의 생존율을 나타내었다. Tempol을 전처치 후 Cisplatin 처치군이 Cisplatin만 처치한 군에 비하여 유의하게 세포 생존율이 증가하였다($p<0.05$, 그림 2).

3. Hoechst 33258 염색에 의한 자멸사 특징의 변화

자멸사에 의한 세포사의 형태학적 특징을 비교해 보고자 HEI-OC1 세포를 각각 Control군, Cisplatin군, Tempol군, Tempol 전처치후 Cisplatin 노출군으로

나누어 24시간 동안 세포배양후 Hoechst 33258염색을 시행하여 형태학적 특징을 비교하였다. Control군은 균일한 밝기의 둥근 세포핵을 관찰할 수 있었으며 Tempol 군에서도 동일한 소견이 확인되었다. Cisplatin군에서는 자멸사 특징인 응축되고 분열된 세포핵이 관찰되었고 Tempol을 전처치한 군에서는 이와 같은 소견이 감소되었다(그림 3).

4. 세포내 활성산소종의 변화

Cisplatin 노출 후 증가된 활성산소종의 양이 Tempol의 전처치로 인하여 억제되는지 알아보고자 4가지 군에서 세포내 활성산소종의 양을 측정하였다. Control군, Cisplatin군, Tempol군, Tempol 전처치후 Cisplatin 노출군에서 각각 $50.5\pm2.9\%$, $93.7\pm1.7\%$, $46.2\pm4.0\%$, $73.2\pm4.9\%$ 의 결과를 나타내었다. Cisplatin에 의해 증가된 활성산소종이 Tempol 전처치후 유의하게 그 양이 감소하였다($p<0.05$, 그림 4).

5. 자멸사된 세포수의 변화

Cisplatin 세포독성으로 나타나는 주된 세포사의 형태인 자멸사 세포가 Tempol의 전처치에 의하여 억제되는지 알아보고자 자멸사 세포의 수를 Flow cytometry를 이용하여 측정하였다. Control군, Cisplatin군, Tempol군, Tempol 전처치후 Cisplatin 노출군에서 각각 6.5 ± 2.1 , 234.0 ± 27.0 , 23.0 ± 3.5 , 162.0 ± 11.0 의 결과를 나타내었다. Cisplatin에 의하여 자멸사 세포의 수 증가가 확인되었으며 Tempol 전처치에 의하여 자멸사 세포의 수가 유의하게 감소하였다($p<0.05$, 그림 5).

6. 자멸사 단백 C-PARP, C-Caspase 3와 미토콘드리아 Nitric oxide synthase의 변화

Cisplatin 세포독성에 의해 나타나는 자멸사 변화가 Tempol의 전처치에 의

하여 억제되는지를 확인하기 위하여 대표적인 자멸사 마커의 활성 형태인 Cleaved PARP, Cleaved Caspase-3 단백 발현을 측정하였다. Cisplatin에 의하여 Cleaved PARP, Cleaved Caspase-3 단백 발현 증가가 확인되었으며 Tempol 전처치에 의해 그 발현이 감소되었다. Cisplatin 세포독성에 의한 산화스트레스가 미토콘드리아에 미치는 영향을 확인하기 위해 미토콘드리아 단백질만 분리하여 iNOS를 측정하였다. Cisplatin에 의해 미토콘드리아의 iNOS 발현 증가가 확인되었으며 Tempol 전처치에 의해 그 발현이 감소되었다.(그림 6).

7. 세포내 미토콘드리아의 형태학적 변화

Cisplatin 세포독성에 의하여 나타나는 미토콘드리아의 형태학적 변화가 Tempol의 전처치에 의하여 억제되는지 확인하기 위하여 미토콘드리아 구조에 대한 형광염색을 통하여 비교하였다. Control군에서는 DAPI 염색된 핵이 잘 관찰되었으며 세포질에 붉은색으로 염색되는 미토콘드리아 네트워크 (Mitochondrial network)가 잘 관찰되었다. Tempol군에서도 Control군과 비슷한 소견이 관찰되어 미토콘드리아 네트워크가 잘 보존되는 것을 확인할 수 있었다. Cisplatin군에서는 핵모양의 변형과 분열이 관찰되었으며 세포질내 미토콘드리아 네트워크도 감소하였다. Tempol 전처치후 Cisplatin 노출군에서는 Cisplatin군과 비교하여 미토콘드리아 네트워크의 형태학적 변화가 보존되는 것을 확인하였다(그림 7).

8. 미토콘드리아 Transmembrane potential의 변화

Cisplatin 세포독성에 의해 나타나는 미토콘드리아 변화가 Tempol의 전처치에 의하여 억제되는지 확인하기 위하여 Transmembrane depolarization (%)을 측정하였다. Control군, Cisplatin군, Tempol군, Tempol 전처치후 Cisplatin 노출군에서 각각 $50.7\pm1.9\%$, $85.4\pm2.7\%$, $43.4\pm2.2\%$, $78.3\pm2.8\%$ 의 결

과를 나타내었다. Cisplatin에 의해 증가된 Transmembrane depolarization^{◇]} Tempol 전처치후 유의하게 그 양이 감소하였다($p<0.05$, 그림 8).

IV. 고 칠

Cisplatin은 고형암에 널리 쓰이는 대표적인 항암제이지만 영구적이고 비가역적인 난청을 유발할 수 있어 그 사용이 제한될 수 있다. Cisplatin이 청각기 손상을 일으키는 데에는 몇가지 기전이 관여한다. 가장 잘 알려진 기전으로는 활성산소종의 생성으로 이것이 산화 스트레스와 지질 과산화를 유발하고 유모세포, 지지세포, 혈관선조, 청신경의 자멸사를 일으키는 것이다 (Gonçalves MS et al. 2013; Campbell KCM et al, 2000). 활성산소종이 증가하게 되면 와우내의 내인성 항산화제(Endogenous antioxidant)로 알려진 glutathione, superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 활성화되어 이를 제거하게 된다(Rybak LP et al, 2009). 하지만 Cisplatin에 지속적으로 노출시 활성산소종이 과다 축적되게 되고 이는 이러한 내인성 항산화제의 합성을 억제하게 된다. Tempol은 안정적인 Nitroxide 화합물로서 과산화 음이온(Superoxide anion)과 반응하여 Hydrogen peroxide를 형성하는 SOD와 유사한 작용을 가지고 있는 막투과성 유리기 제거제(radical scavenger)이다(Wilcox CS et al, 2010). Tempol은 저분자량(MW: 172)을 가지고 있기 때문에 쉽게 세포막을 통과하여 세포내 과산화 음이온을 제거할 수 있고(Samuni et al, 1988; Thiemermann, 2003) 이와 같은 특성으로 다른 항산화제들보다 쉽게 혈뇌장벽을 통과하여 신경보호 작용을 나타낼 수 있다 (Liang Q et al, 2005). 지금까지 조직내에서의 염증이나 산화 손상에 대한 여러 보호 작용들이 보고 되었으며(Gonzalez EJ et al, 2015; Thiemermann, 2003) 특히, 다른 항산화제들보다 혈뇌장벽을 쉽게 통과하는 특성으로 뇌외상, 허혈성 뇌졸중, 파킨슨병 등의 모델에서 신경보호 작용이 보고 되었다 (Januszkowski K et al, 2014; Wanyong Y et al, 2015; Deng-Bryant Y et al, 2008).

Tempol은 세포의 과산화 음이온을 제거하는데 기존에 항산화제로 가장 많이

보고되는 N-acetyl cystein(NAC)만큼 효과적이며 NAC은 저농도에서는 오히려 과산화 음이온을 증가시키는 것과는 달리 Tempol은 이러한 효과를 나타내지 않아 세포보호에 더욱 효과적이다(Wilcox CS, 2010; Patel K et al, 2006). 또한, Catalase와 같이 Hydrogen peroxide의 대사를 촉진하고 독성 히드록실 라디칼(Hydroxyl radical) 생성을 억제한다(Wilcox CS et al, 2008). 과산화 음이온과 산화질소(NO)는 강한 옥시던트(oxidant)인 ONOO⁻를 만들어 세포손상을 일으키나 Tempol은 이러한 과정을 또한 억제할 수 있다(Caroll et al, 2000). 본 연구에서 Cisplatin 유발성 세포독성에 대한 Tempol의 보호효과를 알아보기 위해 세포내 활성산소종을 측정한 결과 Cisplatin에 의해 증가된 활성산소종의 양이 Tempol 전처치후 유의하게 감소하였다.

과산화 음이온은 세포질내로 Pro-apoptotic Bax 단백을 세포질 내로 이동시키고 미토콘드리아 벽의 손상으로 Cytochrome c의 유리를 일으키며 Caspase-3의 활성화를 일으켜 자멸사를 일으키게 된다(Rybalk LP et al, 2009). 또한 활성 산소종은 Transient vanilloid receptor potential 1 이온 채널의 발현을 증가시켜 세포내로 칼슘의 유입을 증가시켜 Caspase-3의 활성화를 일으킨다(Mukherjea D et al, 2008). 본 연구에서도 Cisplatin에 의해 증가된 자멸사 단백 Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP가 Tempol의 전처치료 발현이 억제되어 항자멸사 효과가 있는 것을 확인하였다. 과산화 음이온에 의한 Pro-apoptotic Bax 단백의 세포질내 이동은 미토콘드리아 막의 구멍을 형성하게 되고 이는 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial transmembrane potential)의 저하를 가져오게 되며(Bomer C, 2003) Mitochondrial depolarization이 증가하게 된다(Margiotta N et al, 2010; Nawrocki ST et al, 2013). 본 연구에서 Cisplatin에 의해 증가된 미토콘드리아의 형태학적 손상과 Mitochondrial depolarization이 Tempol의 전처치에 의해 감소됨으로서 Cisplatin 유발성 산화스트레스에 의한 미토콘드리아 손상에도 억제효과가 있음을 알 수 있었다.

다른 Cisplatin 유발성 세포독성 기전으로는 Cisplatin이 DNA의 guanine 염

기에 결합하여 p53을 유도하고 세포주기를 정체시켜 자멸사를 유발하는 것이다(Casares C et al, 2012). 본 연구에서 Flow cytometry를 이용하여 세포주기를 분석하여 자멸사 세포의 수를 확인한 결과 Cisplatin은 자멸사 세포의 증가를 일으켰으며 Tempol의 전처치가 이를 억제하여 보호 효과를 보였다. Tempol은 효과적인 항산화제이며 항자멸사효과를 가지고 있지만 아직까지 이독성과 관련하여 연구는 많지 않으며 소음성 난청 모델에서 난청에 대한 보호효과가 보고 되고 있다. Minami등(2007)은 소음에 노출된 기니아貂에 Tempol을 투여한 결과 청각역치의 호전을 확인하였으며 소음성 난청에서 세포사를 일으키는 데 역할을 하는 유리기(Free radical)를 억제하여 보호효과가 나타난다고 하였고 경구로 약제를 투여한 결과 혈뇌장벽을 통과하여 와우에 도달함을 확인하였다. Murashita등(2006)은 마우스에서 소음에 의한 와우 손상이 Tempol에 의해 예방되는 것을 보고하였다. Nagashima등(2010)은 소음 노출에 의한 ROS와 NO 축적으로 인해 나선인대(Spiral ligament)의 손상이 나타나며 이는 JNK 경로의 활성화, Connexin 26의 하향 조절(Down regulation)로 인하여 발생하고 Tempol의 투여로 이와 같은 작용이 억제되어 청력이 보존 됨을 보고하였다.

본 연구에서는 Tempol이 기존에 보고되고 있는 소음 손상 이외에도 이독성 약제인 Cisplatin에 의한 세포손상, 산화스트레스를 효과적으로 억제함을 보여 주었다. 현재까지 많은 항산화제, ROS 제거제, 항염증 약물들이 Cisplatin 유발성 이독성의 보호 약제로 연구되어 왔으나(Langer T et al, 2013) 아직까지 임상연구가 필요한 실정이다. Tempol은 기존 물질들에 비하여 저분자량을 가지고 있어 혈뇌장벽 투과력이 상대적으로 높아 보호 물질로서의 가치를 가질 수 있을것으로 생각된다.

V. 결 론

Cisplatin 노출 후 HEI-OC1 청각세포에서 발생하는 세포독성에 대한 Tempol의 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Cisplatin 유발성 세포독성에 Tempol의 전처치가 산화스트레스에 의한 세포 손상으로부터 보호 작용을 하는 것으로 확인되었으며 이러한 작용은 Cisplatin 유발성 난청의 보호 물질 개발에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

- Ahmed LA, Shehata NI, Abdelkader NF, Khattab MM. "Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice." PLoS One. 2014 Oct 1;9(10):e108889.
- Borner C. "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Mol Immunol. 2003;39(11):615-47.
- Campbell KCM, Kalkanis J, Glatz FR. "Ototoxicity: mechanisms, protective agents and monitoring." Curr Opin Otol Head Neck Sur. 2000;8:436-40.
- Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR. "Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models." Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012;269(12):2455-9.
- Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS, Hall ED. "4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration." Chem Res Toxicol. 2000;13(4):294-300.
- Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. "Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals." Toxicol Appl Pharmacol. 2001;174(1):27-34.
- Deng-Bryant Y, Singh IN, Carrico KM, Hall ED. "Neuroprotective effects of tempol, a catalytic scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, in a mouse traumatic brain injury model." J Cereb Blood Flow Metab. 2008;28(6):1114-26.

Gonçalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, Hyppolito MA. "Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review." *J Laryngol Otol.* 2013;127(6):536-41.

Gonzalez EJ, Peterson A, Malley S, Daniel M, Lambert D, Kosofsky M, Vizzard MA. "The effects of tempol on cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat micturition reflexes." *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:545048.

Januschowski K, Mueller S, Dollinger R, Schnichels S, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, Szurman P, Thaler S. "Investigating retinal toxicity of tempol in a model of isolated and perfused bovine retina." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(6):935-41.

Langer T, am Zehnhoff-Dinnesen A, Radtke S, Meitert J, Zolk O. "Understanding platinum-induced ototoxicity." *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(8):458-69.

Liang Q, Smith AD, Pan S, Tyurin VA, Kagan VE, Hastings TG, Schor NF. "Neuroprotective effects of TEMPOL in central and peripheral nervous system models of Parkinson's disease." *Biochem Pharmacol.* 2005;70(9):1371-81.

Margiotta N, Denora N, Ostuni R, Laquintana V, Anderson A, Johnson SW, Trapani G, Natile G. "Platinum(II) complexes with bioactive carrier ligands having high affinity for the translocator protein." *J Med Chem.* 2010;53(14):5144-54.

McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiermann C. "Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion." *Free Radic Biol Med.* 1999;27(5-6):493-503.

Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. "Creatine and tempol attenuate noise-induced hearing loss." *Brain Res.* 2007 May 7;1148:83–9.

Mukherjea D, Jajoo S, Whitworth C, Bunch JR, Turner JG, Rybak LP, Ramkumar V. "Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat." *J Neurosci.* 2008;28(49):13056–65.

Murashita H, Tabuchi K, Hoshino T, Tsuji S, Hara A. "The effects of tempol, 3-aminobenzamide and nitric oxide synthase inhibitors on acoustic injury of the mouse cochlea." *Hear Res.* 2006;214(1-2):1–6.

Nagashima R, Yamaguchi T, Tanaka H, Ogita K. "Mechanism underlying the protective effect of tempol and N ω -nitro-L-arginine methyl ester on acoustic injury: possible involvement of c-Jun N-terminal kinase pathway and connexin26 in the cochlear spiral ligament." *J Pharmacol Sci.* 2010;114(1):50–62.

Nawrocki ST, Kelly KR, Smith PG, Espitia CM, Possemato A, Beausoleil SA, Milhollen M, Blakemore S, Thomas M, Berger A, Carew JS. "Disrupting protein NEDDylation with MLN4924 is a novel strategy to target cisplatin resistance in ovarian cancer." *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3577–90.

Patel K, Chen Y, Dennehy K, Blau J, Connors S, Mendonca M, Tarpey M, Krishna M, Mitchell JB, Welch WJ, Wilcox CS. "Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(1):R37–43.

Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. "Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies." *Tohoku J Exp Med.* 2009;219:177–86.

Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. "Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention." *Hear Res.* 2007;226(1-2):157-67.

Samuni A, Krishna CM, Riesz P, Finkelstein E, Russo A. "A novel metal-free low molecular weight superoxide dismutase mimic." *J Biol Chem.* 1988;263(34):17921-4.

Thiemermann C. "Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation." *Crit Care Med.* 2003;31(1 Suppl):S76-84.

Wanyong Y, Zefeng T, Xiufeng X, Dawei D, Xiaoyan L, Ying Z, Yaogao F. "Tempol alleviates intracerebral hemorrhage-induced brain injury possibly by attenuating nitrative stress." *Neuroreport.* 2015;26(14):842-9.

Wilcox CS. "Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress." *Pharmacol Ther.* 2010;126(2):119-45.

Wilcox CS, Pearlman A. "Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides." *Pharmacol Rev.* 2008;60(4):418-69.

논문 사진부도 I

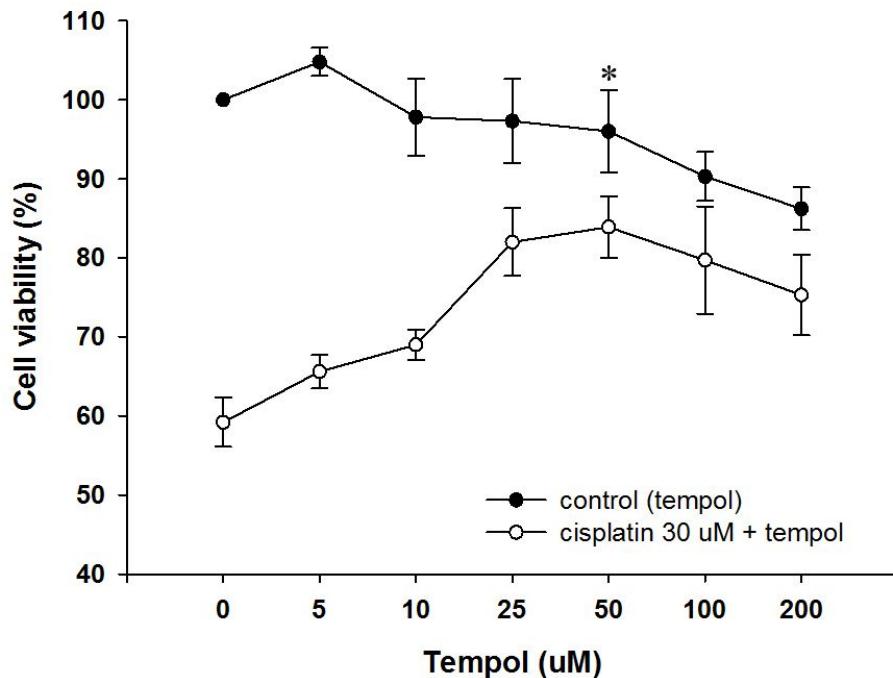


Fig. 1. Effect of tempol on viability of HEI-OC1 cells. The viability was not significantly affected until a 50 μM concentration of tempol was reached. However, tempol was cytotoxic at a concentration over 100 μM . HEI-OC1 cells were maximally protected at 50 μM concentration of tempol. *Optimal experimental concentration of tempol.

논문 사진부도 II

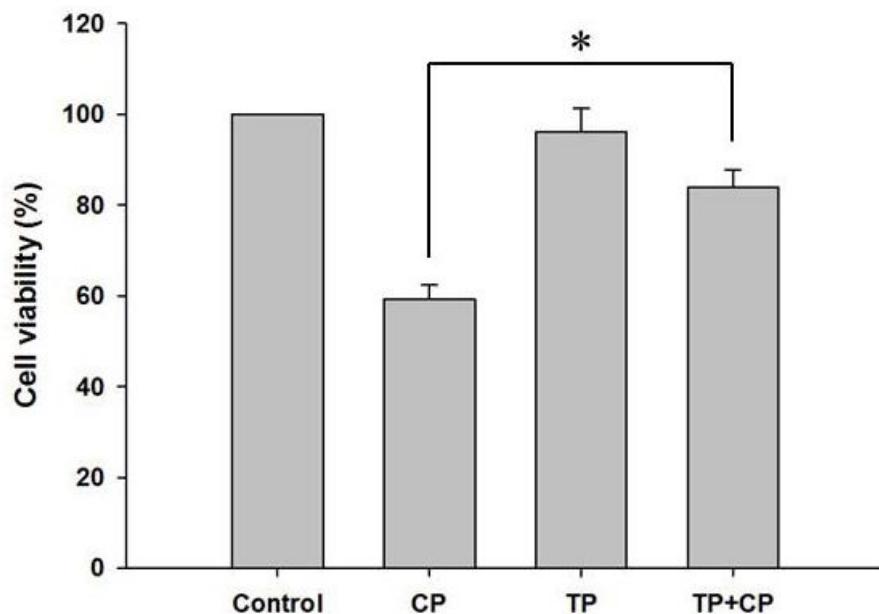


Fig. 2. HEI-OC1 cells were pretreated with 50 μ M tempol for 2 h, and then exposed 30 μ M cisplatin for 24 h. Tempol provided a significant protection against cisplatin cytotoxicity. (CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$)

논문 사진부도 III

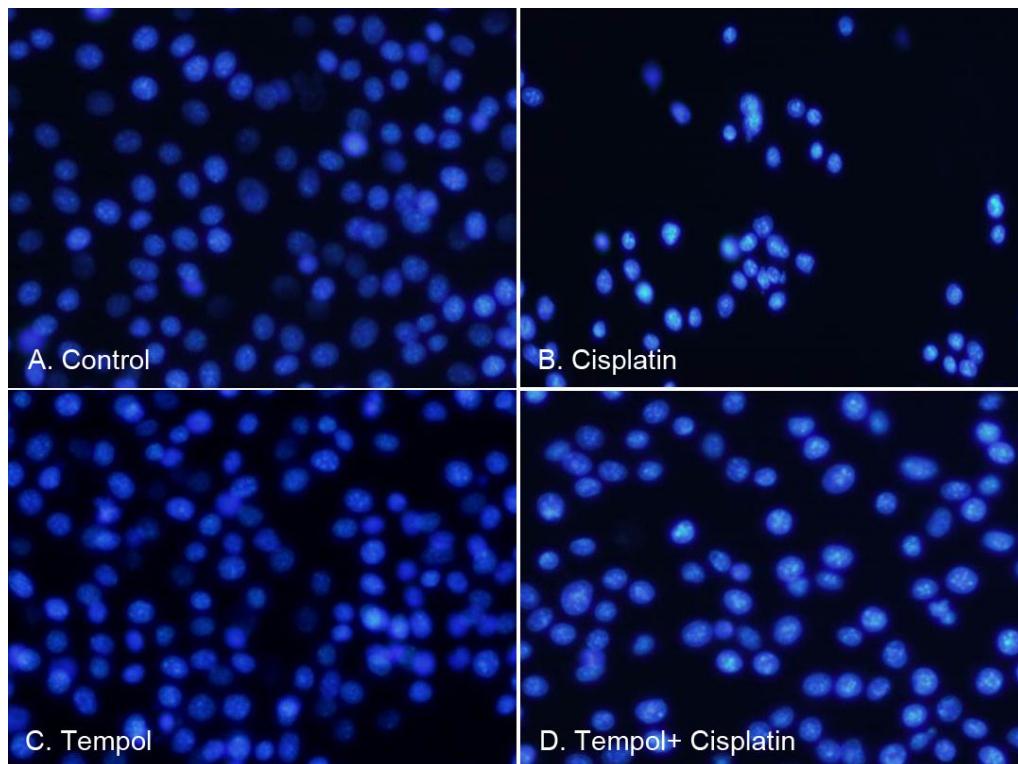


Fig. 3. Apoptotic features in HEI-OC1 cells were reduced by pretreatment with 50 μ M tempol for 2 h before cisplatin exposure for 24 h. The Control and tempol treated cells show round-shaped nuclei with homogeneous intensity (A,C). Ciplatin exposed cells show condensed and fragmented nuclei (B). These features are reduced in pretreated cells with tempol (D).

논문 사진부도 IV

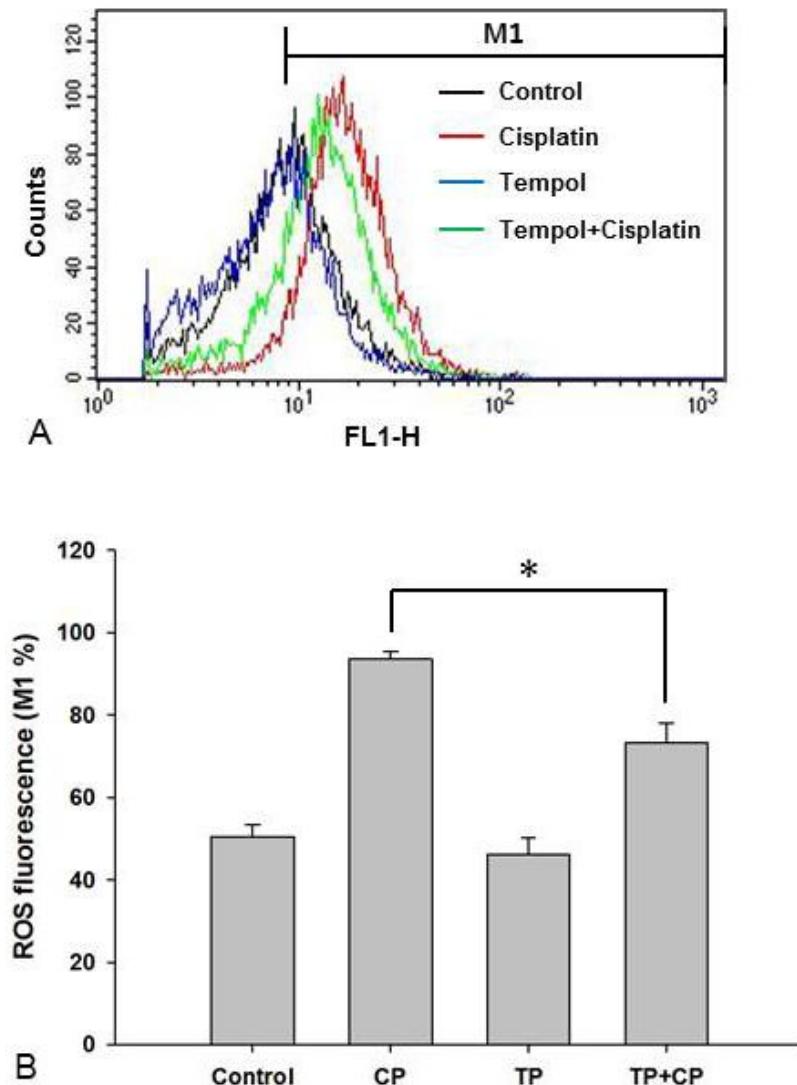


Fig. 4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was determined by flow cytometry (A). ROS production increased in the cisplatin group. However, the tempol-pretreated group had significantly lower ROS production (B, CP; cisplatin, TP; tempol, $*p < 0.05$).

논문 사진부도 V

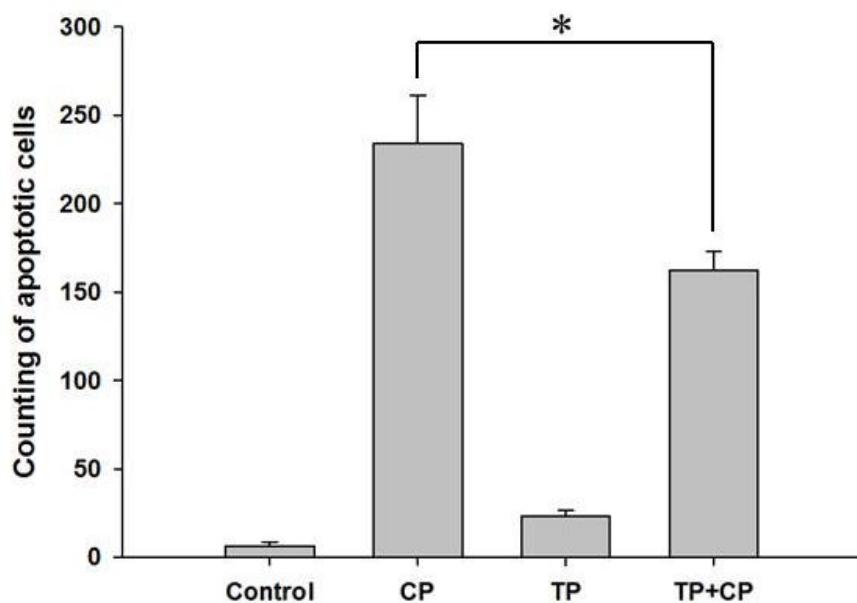


Fig. 5. The number of apoptotic cells was counted using flow cytometry. Apoptotic cells were reduced by pretreatment with 50 μ M tempol for 2 h before cisplatin exposure for 24 h. (CP; cisplatin, TP; tempol, * $p<0.05$)

논문 사진부도 VI

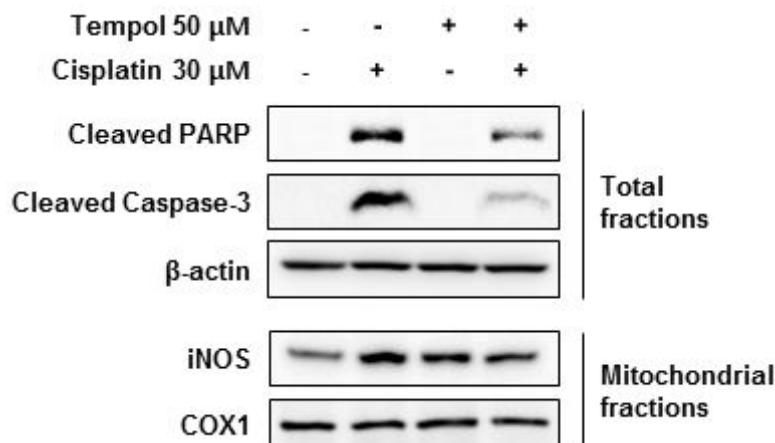


Fig. 6. Effect of tempol on cisplatin-induced changes in apoptosis markers and nitric oxide synthase (NOS). Expression of cleaved PARP, cleaved caspase-3 and iNOS increased in the cisplatin-treated group. However, tempol inhibited the expression of cleaved PARP, cleaved caspase-3 and iNOS. (CP; cisplatin, TP; tempol)

논문 사진부도 VII

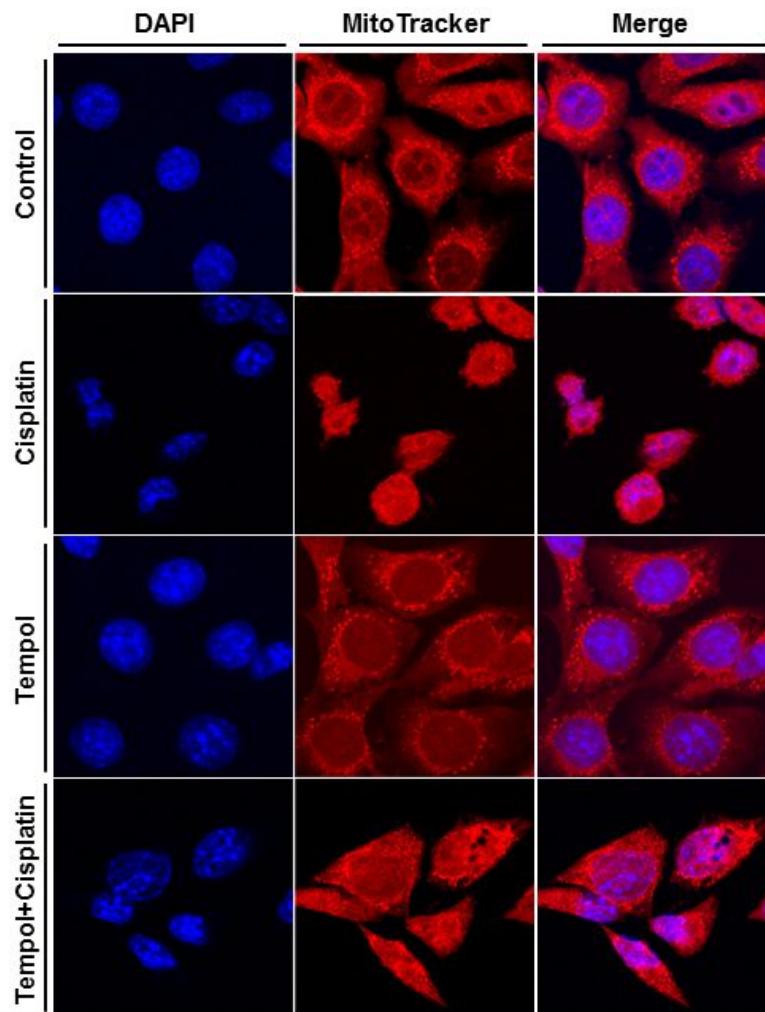


Fig. 7. Confocal microscopic studies of the mitochondria and the nucleus in HEI-OC1 cells. Cells seeded on coverslips were treated with 30 μ M cisplatin for 24 h with or without pretreatment of 50 μ M tempol for 2 h. Mitochondrial structure was detected by Mitotracker (red dot) staining in the control and tempol groups. In contrast, the mitochondrial structure decreased in the cisplatin alone group. Pretreatment with tempol improved the structural expression.

논문 사진부도 VII

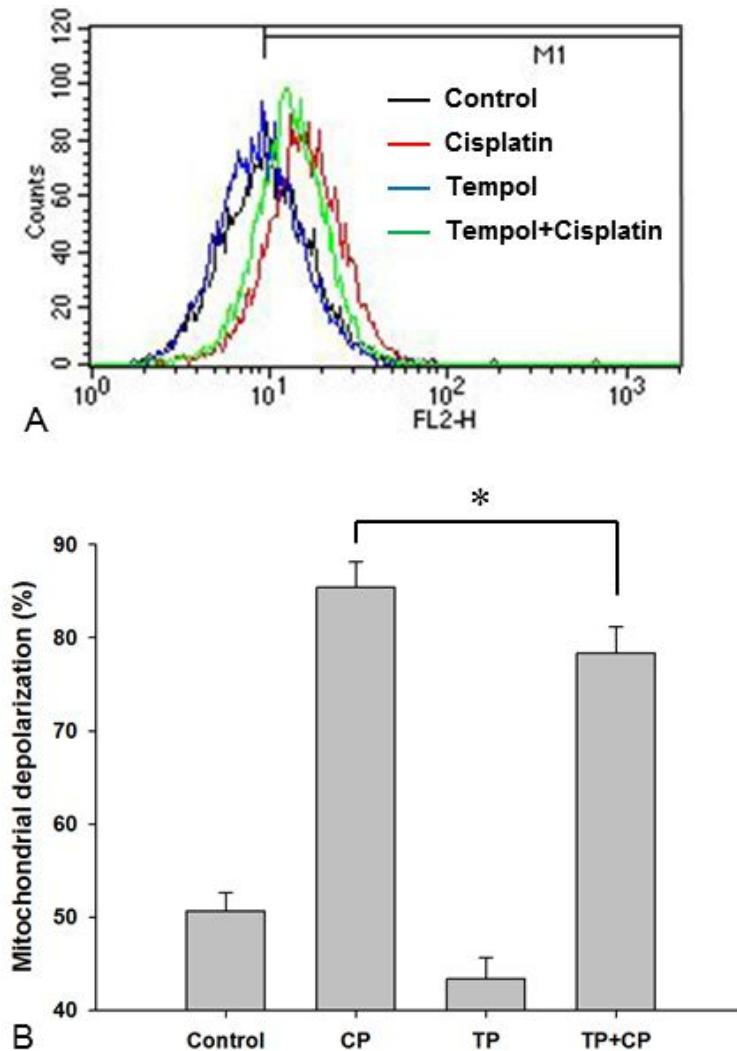


Fig. 8. Mitochondrial polarization was determined by flow cytometry (A). Exposure to 30 μM cisplatin for 24 h caused mitochondrial depolarization. Enhancement of mitochondrial depolarization significantly decreased in pretreated cells with 50 μM tempol for 2 h before cisplatin exposure (B, CP; cisplatin, TP; tempol, $*p < 0.05$).

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20127252	과 정	박 사
성 명	한글 : 김 준	한문 : 金 駿	영문 : Kim Jun		
주 소	서울특별시 강남구 대치동 한신휴플러스아파트 301호				
연락처	E-MAIL : mdjunek@medimail.co.kr				
논문 제목	한글 : Cisplatin 유발성 이독성에 대한 Tempol의 보호효과				
	영문 : Protective effect of tempol against cisplatin-induced ototoxicity				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

- 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
- 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
- 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
- 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
- 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
- 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
- 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2016년 2월 일

저작자 : 김 준 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하