Otology
online©ML Comm
Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:527-33 / DOI 10.3342/kjorl-hns.2010.53.9.527
pISSN 2092-5859 / eISSN 2092-6529

Expression and Distribution of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Mice Cochlea Exposed to Noise

Min Ho Jo, Chang Ju Kim, Seung Hyun Koh, Gi Sung Nam, Ha Min Jeong, Jae Hoon Lee and Sang Heon Lee

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wonkwang University College of Medicine, Iksan, Korea

소음자극 후 마우스 내이에서 TNF-Alpha의 발현과 분포 양상

조민호 · 김창주 · 고승현 · 남기성 · 정하민 · 이재훈 · 이상헌

원광대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

Received May 27, 2010
Revised July 16, 2010
Accepted July 20, 2010

Address for correspondence
Sang Heon Lee, MD
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
Wonkwang University College of Medicine,
344-2 Sinyong-dong,
Iksan 570-711, Korea
Tel +82-63-859-1443
Fax +82-63-841-6556
E-mail pericomo@wku.ac.kr

Background and Objectives Recent studies have shown that inflammatory responses occur in the inner ear under various damaging conditions including noise-overstimulation. Identification of time-dependent expression patterns of pro-inflammatory cytokines during the response initiation should lead to rational therapeutic strategies that block the response and reduce the damaging sequelae.

Materials and Method We evaluated the time-dependent expression pattern of pro-inflammatory cytokines in noise-exposed mouse cochlea (white noise, 120 dB SPL, 3 hours) using immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results The most potent pro-inflammatory cytokine, the tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), was up-regulated after noise exposure. Immunohistochemical analyses showed that the TNF-α expression was distinctively induced within the spiral ganglion and stria vascularis. RT-PCR showed that TNF-α was induced shortly after noise exposure and persisted upto seven days following noise exposure.

Conclusion Taken together, acoustic trauma induces cochlear inflammation and the data suggest that TNF-α may have some role in cochlea damage that occur following noise exposure.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:527-33

Key Words Noise-induced hearing loss · Cytokines · Tumor necrosis factor-alpha.

서 론

염증성 매개물질은 감염, 외상, 염증 또는 면역반응 등의 스트레스 후에 염증세포들로부터 분비되는 물질로 interleukin, chemokine, tumor necrosis factor, interferon 등이 있으며 일부는 질병을 악화시키는 역할을 하고, 일부는 염증을 완화시켜 질병을 치유하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 중 interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α)는 강력한 염증성 싸이토카인(pro-inflammatory cytokine)으로 알려져 있다.[1] 와우 조직 내에 싸이토카인과 그 수용체의 존재가 알려진 이후, 영구적 역치변동을 일으킬 정도의 소음 노출 직후에 전사 인자 및 싸이토카인과 관련된 유전자들이 발현된다고 알려졌으며 싸이토카인, 혈관유주인자 및 염증세포들 또한 소음노출 후 발견되고 있어 기계적인 손상과 활성 산소기의 생성 외에도 염증반응이 과도한 소음 노출 후 와우를 손상시키는 한 기전으로 주목 받고 있다.[2-4]

따라서 저자들은 소음성 난청과 싸이토카인과의 관계를 알아보기 위해 영구적 청력손실 마우스 모델에서 소음 노출 후 청력역치의 변화와 그에 따른 싸이토카인들의 와우 내 발현 부위와 변화 양상 및 시간에 따른 변화를 조사하였다.

Copyright ⓒ 2010 Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery

대상 및 방법

소리인지반사(Preyer's reflex) 양성인 정상 암컷 balb/c 마우스 48마리를 소음에 노출시키지 않은 대조군과 실험군으로 구분하였다. 이 중 실험군을 소음 노출 후 안락사 시키기까지의 시간대 별로 0, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 120 및 168 시간의 11개 군으로 분류하여 대조군을 포함하여 총 12군으로 나누었다. 4마리씩 무작위로 선별하였고 소음에 노출 시킨 후 청각을 검사한 후 조직을 적출하였다. 또한 4마리는 따로 청각검사군으로 설정하여 소음 노출 전과 노출 후 24시간, 72시간, 120시간, 168시간, 336시간, 504시간, 672시간에 청각검사를 시행하였다. 모든 실험방법은 본교의 실험동물윤리위원회의 심의를 통과하였다.

소음 노출

소음 노출은 방음실에서 시행하였으며 소음발생기는 파형발생 범위가 0.1 Hz~15 MHz인 function/arbitrary waveform generator(Agilent 33120A, HP, MA, USA)를 사용하였고, 증폭기(R300 Plus, InterM, Seoul, Korea)와 0.5~20 kHz 음역대의 고음역 스피커(입, 출력 8 Ω, 2", 0.5~20 kHz, 112 dB SPL, Beyma CP-800Ti, Spain) 및 Horn (JBL, USA)을 연결하여 소음부스(Jeonju acryl, Jeonju, Korea)에 스피커와 Horn이 수평과 90°가 되도록 장착하였다. 부스의 바닥은 15° 기울여 소음이 균등하게 퍼지도록 하였으며, 소음부스 내부의 각 부위별 음량차를 sound level meter(Cel-187, Cel instrument, Coventry, UK)를 이용하여 아홉 부위에서 측정하였으며 각 부위 평균값의 차이는 2 dB SPL 이내였다. 실험 동물의 위치에서 1/4" 마이크와 주파수 및 음량분석기(Dual channel real time frequency analyser type 2144, Brüel & Kjær, Denmark)를 이용하여 소음의 주파수와 에너지를 각각 측정하였고 평균 소음에너지는 120 dB SPL이었으며 주변소음은 40 dB SPL 이하였다(Fig. 1). 마우스를 각각 한 마리씩 직경 10 cm의 정방형 철망에 넣은 후 스피커 및 Horn 바로 아래에 위치시키고 120 dB SPL의 백색잡음에 3시간 노출시켰다.

청각역치의 측정

Rodent cocktail(ketamine 100 mg/kg+xylazine 5 mg/kg) 근육주사로 마취한 후 TDT사의 system 3(Turker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA)를 사용하여 청성뇌간반응검사(auditory brainstem response, ABR)를 시행하였다. 자극음은 click음과 4, 8, 16 및 32 kHZ의 tone burst음을 사용하였고 자극음의 횟수는 300회, 주파수 여

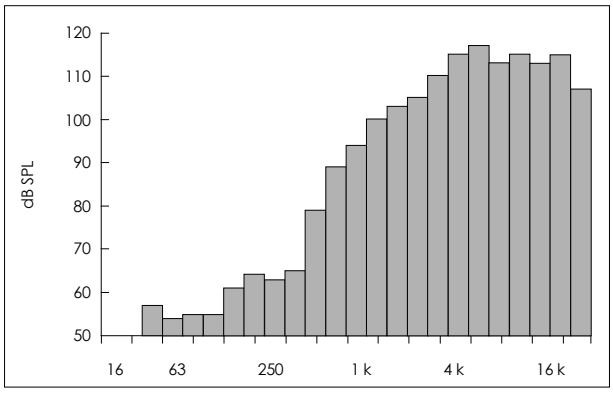

Fig. 1. Sound spectrum used in this experiment, a broad band noise, total sound energy is 120 dB SPL (measured with Dual Channel Real-time Frequency Analyzer Type 2144, Brüel & Kjær).

과기 조절은 100~3,000 Hz로 하였다. 90 dB SPL의 강도부터 10 dB SPL씩 감약하면서 파형을 얻었으며 얻어지는 파형들 중 가장 일정하게 발현되는 파형을 분석에 사용하였다. 반응의 진폭이 0.2 μV 이상이면서 직전자극음에 의한 반응과 유사한 모양을 보이는 파형을 유의한 파형으로 판단하였다. 두 명의 검사자가 분석하여 일치하는 최소 자극음 강도를 청각역치로 결정하였고 소음 노출 전후 청각역치의 변화값(threshold shift)을 계산하였다.

측두골 분리

대조군, 소음 노출 직후, 노출 후 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 120, 168시간째 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)와 4% 포름알데히드용액(4% formaldehyde)으로 심장관류시킨 후 측두골을 분리하였다. 측두골에서 분리한 각 실험군의 8귀 중 4귀는 RNA 분리를 위해 Trizol® 1 mL 보관하였고, 4귀는 4% 포름알데히드용액에 고정하여 2귀는 면역조직화학염색에, 나머지 2귀는 Phalloidin염색에 사용하였다.

Phalloidin 염색

분리된 측두골은 4% 포름알데히드용액에 넣어 4℃에서 약 16시간 가량 보관한 후 탈석회화를 위해 10% 에틸렌디아민사아세트산용액(10% EDTA)으로 옮긴 후 매일 용액을 교체하면서 5일간 보관하였고 그 후 조직을 인산염완충식염수용액으로 세척한 뒤 해부 현미경하에서 외부의 골조직을 제거하고 와우의 기저막을 세 부위(기저부, 중간부, 첨부)로 분리하였다. 분리한 와우기저막은 TRITC가 결합된 phalloidin 용액(0.05% Triton X-100, 1 : 4,000 TRITC-labeled phalloidin in PBS)과 30분 암실에서 반응시키고 인산염완충식염수용액으로 5분씩 세 번 세척한 후 DA-

PI 용액과 5분 반응시킨 뒤 다시 인산염완충식염수용액으로 세 번 세척하였다. 염색이 끝난 조직은 slide glass위에 50% 글리세롤용액으로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다.

조직 고정 및 면역조직화학 염색

위와 같은 방법으로 탈석회화 시킨 후 자동 침투기(LEICA TP 1050, LEICA Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)를 이용해 탈수 및 침투과정을 거친 후 와우축 중심부 방향으로 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직은 4 μm 두께로 조직을 세절하여 실험에 이용하였다. 면역염색 과정은 실온에서 시행하였다. 4 μm 두께로 세절한 조직을 크실렌용액(xylene)에 넣어 탈파라핀화 과정을 거친 후 100% 알코올에서 70% 알코올로 옮겨 가며 재함수화 과정을 거쳤다. LSAB-kit universal K680(DAKO, CA, USA)를 이용하였으며 모든 과정은 제조자의 매뉴얼을 따랐다. 내인성 과산화효소(peroxidase)의 활성을 억제하기 위해 실온에서 3% 과산화수소수용액(3% H_2O_2)에 5분간 반응시키고 인산염완충식염수용액으로 세척한 후 비특이적 반응을 억제하기 위하여 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)에 약 20분 가량 반응시켰다. 그 후 1차 항체를 1 : 200배 희석하여 1시간 가량 반응시킨 후 인산염완충식염수용액으로 여러 차례 세척하고 biotin이 표지된 2차 항체와 약 1시간 가량 반응시킨 후 streptavidin peroxidase와 5분간 반응시켰다. 마지막으로 인산염완충식염수용액으로 수 차례 세척한 후 기질용액(3 mg of 3-amino-9-ethylcarbazole in 10 mL of sodium acetate buffer pH 4.9, 500 mL of dimethylformamide, 0.03% hydrogen peroxide)에 10분간 반응시켰다. 면역염색된 세포의 핵을 염색하기 위하여 Mayer's hematoxylin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA)용액으로 30초 미만의 짧은 시간 동안 대조염색을 시행하였다. 세척 후 수용성 봉입제(Zymed, Califonia, USA)를 이용하여 봉입한 후 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다. 면역화학염색은 TNF-α, Interleukin-6(IL-6) 및 Interleukin-1 beta(IL-1β)에 대해 시행하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)은 2 μg total RNA와 역전사효소(Reverse transcriptase, Superscript II, Invitrogen, USA)를 사용하여 시행하였다. Total RNA를 oligo d(T) 1 μg과 섞은 후 70℃에서 5분간 변성시킨 후 4℃에서 급랭하였다. 역전사 반응에 의한 cDNA의 합성은$MgCl_2$, dNTP, 리보핵산분해효소(ribonuclease), 역전사효소(reverse transcriptase)를 인산염완충식염수용액에 혼합하여 20 μg로 만든 후 42℃에서 60분간 반응시켜 완성하였다. 증폭에 사용된 유전자들에 대한 sense 및 antisense primer 서열은 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-1β
   5'- TCA TGG GAT GAT GAT GAT AAC CTG CT-3'
   5'-CCC ATA CTT TAG GAA GAC ACC 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'

증폭된 유전자 산물은 우무겔전기이동(agarose gel electrophoresis)으로 확인하였으며 GAPDH로 발현차이를 정량화하였다.

결 과

소음 노출 후 청각역치의 측정

소음 노출 후 1일째 측정한 청각검사상 노출 전에 비해 약 55 dB의 역치변동이 있었고 3일째는 변화가 없었으나 약 5일째 50 dB, 7일째 45 dB 가량으로 약간 호전되었다. 청력검사군에서는 28일까지 청각검사를 계속 시행하였으며 7일 이후 28일까지는 청력의 변화가 없었고, 28일째 tone burst음을 사용해 측정한 청각역치변동은 4, 8, 16, 32 KHz에서 각각 34±4.5 dB, 58±4.3 dB, 55±3.9 dB, 43±3.8 dB였다(mean±SD) (Fig. 2A). Click음을 사용해 측정한 청성 뇌간유발반응검사도 유사하였으며 28일째 클릭음을 사용해 측정한 청각역치변동은 44±5.7 dB였다(Fig. 2B).

Phalloidin 염색

DAPI 염색과 Phalloidin TRITC 염색을 통해 소음 노출 전, 후 기저부 외유모세포의 변화를 확인하였다. 소음 노출

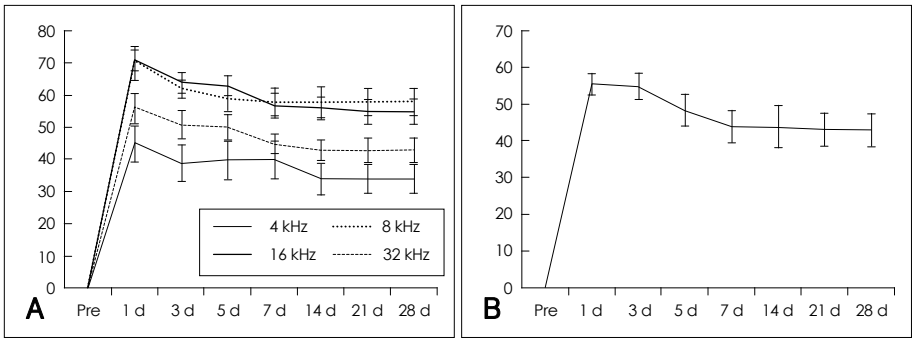

Fig. 2. Threshold shift after noise exposure (white noise, 120 dB SPL, 3 hours, n=4). Tone burst ABR. At the first day after noise exposure, threshold shift was about 55 dB. Until 7th day, about 10 dB improvement of threshold shift was observed. From 7th day to 28th day there was no meaningful change in threshold shift. The final threshold shift determined by tone burst were 34±4.5 dB, 58±4.3 dB, 55±3.9 dB and 43±3.8 dB (4,8,16,32 KHz, and click, respectively, mean±SD)(A). ABR test using click sound showed similar result to tone burst ABR. The final threshold shift determined by click ABR was 44±5.7 dB (B). ABR: auditory brainstem response.

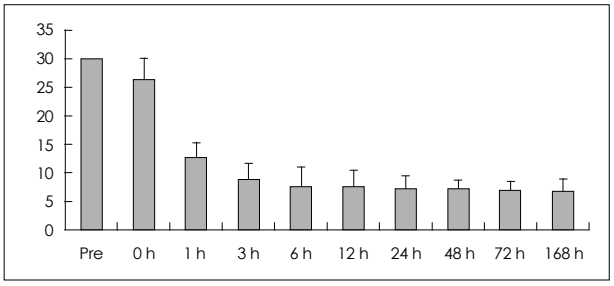

Fig. 3. Outer hair cell count after intense noise exposure (white noise, 120 dB SPL, 3 hours), basal turn.

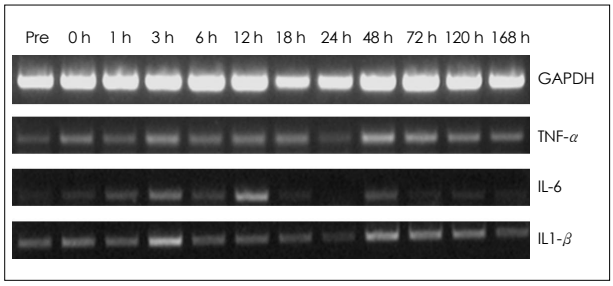

Fig. 4. RT-PCR was used to screen mRNA expression of 3 cytokines. There showed very weak expression of TNF-α in control mouse (pre-exposure). After noise exposure, intensity of TNF-α expression increased markedly until 3 hours. Although intensity of its expression was decreasing, there showed continuous expression until 7 days after exposure. Expression of IL-6 was markedly increased 3 hours and 12 hours after noise exposure and decreased quickly to the basal level. IL-1β showed a similar pattern to TNF-α. RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction, TNF-α: tumor necrosis factor-alpha, IL-6: interleukin-6, GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

후 중간부와 첨부에 비해 기저부의 외유모세포 손상이 두드러졌으며 기저부위를 이용하여 내유모세포 10개당 정상 외유모세포 수를 측정하는 방법으로 정상 외유모세포 수를 계산하였다. 소음 노출 전에는 평균 30개였으나 소음 노출 직후 26±3.2개, 1시간: 12.5±4.2개, 3시간: 8.7±4.9개, 6시간: 7.5±5.1개, 12시간: 7.3±4.9개, 24시간: 7.3±4.4개로 첫 6시간에는 감소폭이 컸으나 노출 후 7일째 7.1±3.9개로 24시간 이후와 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RT-PCR 검사에서 세 가지 싸이토카인(IL-1β, IL-6, TNF-α)이 와우조직 내에서 증가되었다. TNF-α는 소음 노출 전에 약하게 발현되었으나 소음 노출 직후부터 발현이 증가하여 3시간과 48시간에 강하게 발현되었으며 7일 후에도 발현되었다. IL-6는 노출 직후부터 발현되어 노출 후 3시간과 12시간에 가장 많이 발현된 후 감소하여 7일 후에는 소음 노출 전과 유사해졌다. IL-1β는 소음 노출 전에 약하게 발현되었으나 노출 후 뚜렷이 증가하여 3시간 후 가장 많이 발현되는 양상을 보였으며 이 후 서서히 감소하여 7일 후에는 노출 전과 유사하였다(Fig. 4).

면역조직화학염색

RT-PCR에서 발현증가를 보인 각각의 싸이토카인이 와우 내부의 어떤 세포에서 발현되는지를 관찰하기 위해 면역조직화학염색을 시행하였다. TNF-α는 소음 노출 전에는 약하게 염색되며 소음 노출 직후부터 나선신경절 부위의 신경섬유와 와우축에서 염색되기 시작하여 노출 3시간 후 가장 진하게 염색된 후 서서히 연해지는 양상을 보이지만 7일 후 까지도 지속적으로 염색되었다(Fig. 5). 혈관조의 중간세포와 기저세포에서는 3시간과 12시간 후에 염색되었으며 나선신경절에 비해 매우 약하게 염색되었고 24시간 이후에는 거의 염색되지 않았다. IL-6는 노출 직후부터 와우 주위 혈관과 혈관조의 중간세포와 혈관조의 혈관벽에서 염색되었고 노출 3시간 후에 혈관조의 중간세포와 기저세포 그리고 혈관내피세포에 진하게 염색되었다. 노출 6시간 후부터 약하게 염색되어 48시간 이후에는 거의 관찰되지 않

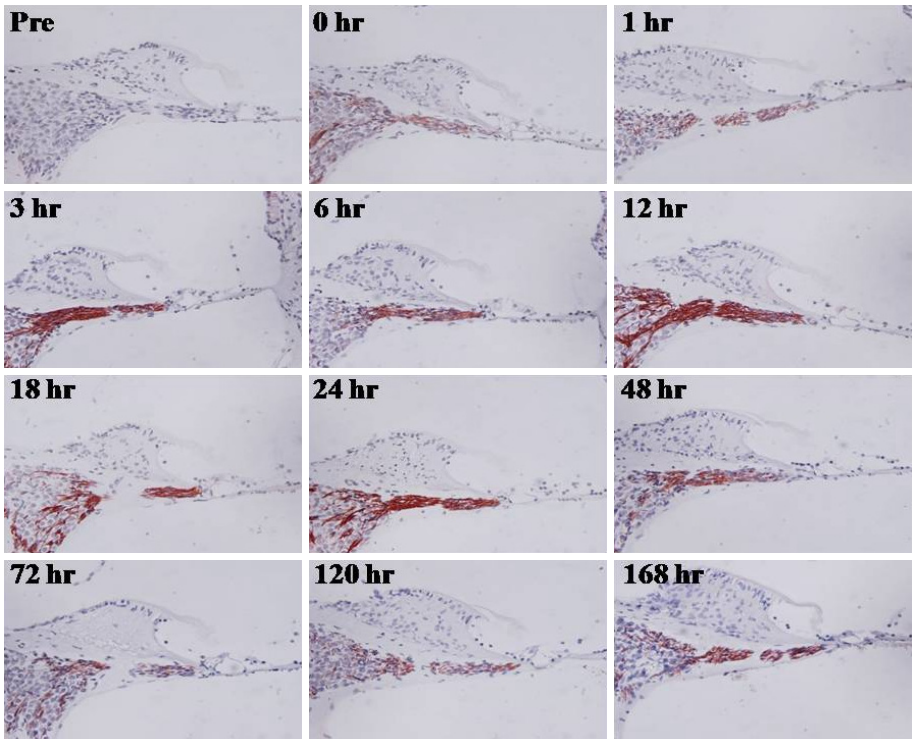

Fig. 5. Immunohistochemical staining for TNF-α in spiral ganglion and organ of corti of noise-exposed mouse cochlea. Until 3 hours after noise exposure, the expression pattern became gradually stronger in the spiral ganglion and persisted until 7 days after exposure (Immunohistochemistry, ×200). TNF-α: tumor necrosis factor-alpha.

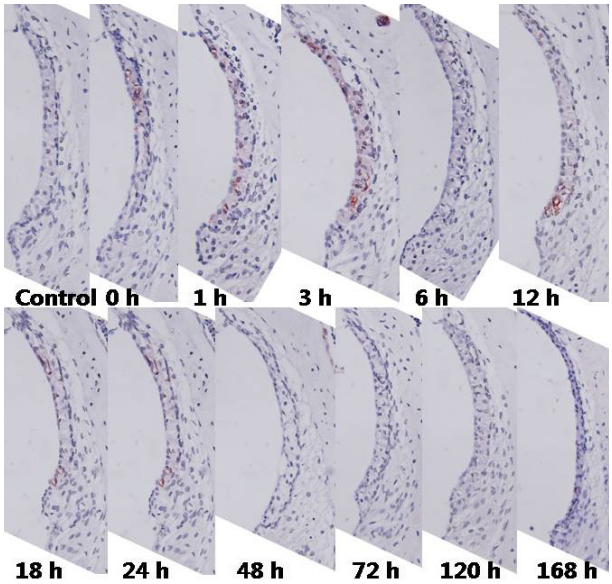

Fig. 6. Time-dependent expression of IL-6 in stria vascularis of mouse cochlea, basal turn. from 1 hour to 24 hours, there showed weak immunoreactivity in the stria vascularis. After 24 hours, no immunoreactivity was found (Immunohistochemistry, ×200). IL-6: interleukin-6.

았다. 노출 후 7일째에 혈관조의 위축이 관찰되었다. 코르티기관, 나선인대 또는 와우신경절에서는 소음 노출 후 IL-6가 염색되지 않았다(Fig. 6). IL-1β의 면역염색양상은 IL-6와 유사하였으며 코르티기관이나 나선신경절에서는 관찰되지 않았고 3시간 후부터 24시간까지 혈관조에서만 염색되었으며 48시간 이후에는 관찰되지 않았다(data not shown).

고 찰

소음에 의한 와우 손상은 과도한 음압을 가진 소음으로 인해 와우 내부의 유모세포나 지지세포들에 기계적인 손상이 직접 가해지거나 세포 내에서 일어나는 다양한 생화학적 반응의 결과로 알려져 있다.[5] 현재까지 알려진 소음성 난청의 가장 대표적인 기전은 기계적인 손상으로 인한 지주세포(pilar cell)의 박리, 외유모세포 부동모의 비틀림과 파괴 및 그로 인한 외유모세포의 소실 등이 있다.

실제 임상에서 경험하게 되는 소음성 난청은 대부분 폭발음과 같은 순간적인 소음보다는 지속적인 소음에 수 년간 노출된 후 발생하는 경우가 많으며 이 경우 발생기전 또한 직접적인 기계적 손상보다는 와우내에서 수 년에 걸쳐 일어나는 미세한 생화학적 변화가 원인일 가능성이 더 높을 것으로 생각된다. 따라서 최근에는 기계적인 손상보다는 세포내의 생화학적 변화가 세포파괴 및 청력손실의 주된 원인이라는 가설하에 이러한 가설을 뒷받침하는 연구결과들이 보고되고 있다. 그 중 가장 대표적으로 연구되고 있는 기전이 활발한 에너지 대사 후 발생하는 산화 스트레스(oxida-

tive stress)에 관한 것들이다.[6,7] 와우는 대사활동이 매우 활발한 기관으로 상당량의 에너지를 필요로 하는 기관으로 알려져 있다.[8] 에너지의 주된 공급처는 혈관조이며 이곳에 있는 변연세포, 중간세포, 기저세포 등 세 종류의 세포에는 다수의 미토콘드리아가 존재한다. 미토콘드리아 내부의 전자전달계에서 대부분의 에너지 대사가 일어나며 동시에 대사산물인 활성산소기가 많이 만들어진다. 정상적인 조건에서는 전체 산소 중 약 98% 가량이 에너지 대사에 사용되고 1~2%만이 과산화 음이온(superoxide anion)이나 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)로 변환되지만 과도한 소음에 노출되면 와우 내의 대사속도가 빨라져 활성산소기의 생성이 증가되며 동시에 소음노출로 인해 와우 혈류가 감소하면 코르티 기관에 허혈이 발생하여 사용할 수 있는 산소가 부족해지고 과산화 음이온의 생성이 증가된다.[9] 또한 소음 노출 후 재관류로 인해 혈류가 증가할 경우 미토콘드리아의 산소사용이 다시 증가되어 활성산소기의 발생이 더욱 증가된다. 소음 노출 후 와우 내에서 활성산소기가 증가한다는 여러 보고들이 있으며[6,10] 소음 노출 후 활성산소기의 활성도는 수일간 지속되며 이는 소음 노출 후에도 지속되는 세포사멸의 원인으로 추측되고 있다.[11] 또 다른 기전은 와우 내의 혈액 순환의 변동인데 와우의 혈액순환계는 전신혈액 순환계의 영향을 상당히 받고는 있으나 자체적인 혈액순환 조절기전 또한 가지고 있다. 소음에 의한 와우혈류의 변화는 소음의 종류에 따라 다양하며 아주 강한 소음의 경우 혈류의 변화가 일어나기 전에 기계적인 손상이 먼저 일어나게 된다. 지속적인 노출의 경우 초기에는 혈류량이 증가하나 나중에는 혈류량이 감소한다고 알려져 있다.[7,12]

영구적 역치변동을 초래한 와우에서 c-FOS, EGR-1, NUR77/TR3 등 전사인자의 유전자와 PC3/BTG2, LIF, IP10 등 싸이토카인의 유전자가 일시적 역치변동보다 더 많이 발현된다는 사실이 처음 보고되면서 소음성 난청의 분자생물학적 기전에 새로운 개념이 도입되었다.[13] 그 후 소음 노출 후 와우 조직 내에서 염증성 싸이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 mRNA가 상향 조절되고 와우의 나선인대와 혈관조 및 와우신경절에서 IL-6의 발현이 증가되는 것이 알려졌고 소음 노출 후 IL-6의 수용체 항체를 투여하면 청력감소가 예방된다고 보고되었다.[3,14] 이러한 결과들은 소음 노출 후 와우내에서 염증반응이 발생하며 염증반응 또한 소음성 난청을 초래하는 중요한 기전으로 생각된다.[15]

염증성 싸이토카인의 한 종류인 TNF-α는 염증반응의 강력한 매개체로서 림프구, 비만세포, 혈관내피세포, 심근세포, 지방조직, 섬유아세포 및 신경조직 등 여러 조직에서 만들어지며 주로 대식세포(macrophage)에서 만들어진다고 알려져 있다.[1] 와우에서의 발현 또한 알려져 있으며 외상에 대한 일반적인 반응으로 증가하는 IL-1β와는 달리 염증반응의 강도를 증폭시켜 와우 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 자가면역성 내이질환, 돌발성 난청, 중이염이나 이경화증 및 세균성 뇌막염과 관련된 감각신경성 난청 등에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[2,16] 이 외에도 진동유발성 난청과 Cisplatin에 의해 초래되는 와우세포의 손상 및 노인성 난청의 발생에도 중심적인 역할을 한다고 알려져 있으며 와우내로 염증세포의 유주를 증가시키며 혈관조의 혈관내피세포 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[17,18] TNF-α는 세포막에 있는 TNF-α 수용체를 거쳐 세포내로 들어가게 되며 세포 내에서 NF-kappaB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 및 MAPK(mitogen-activated protein kinases)경로 중 JNK(c-Jun N-terminal kinases)군을 활성화시켜 세모사멸신호를 유도하며 염증반응으로 인해 와우내에서 증가될 경우 혈관유주성 증가, 염증세포의 침투 유도, 세포독성 등을 초래한다고 알려져 있다.[16]

Keithley 등[17]은 TNF-α를 와우에 주입한 후 염증세포가 고실계(scala tympani)에 유주되는 것을 관찰하여 직접 주입한 TNF-α로 인한 유모세포 손상을 보고하였고 Fugioka 등[3]은 염증성 사이토카인들이 소음노출 직후(TNF-α)와 3시간 이내에 와우에서 증가하며(IL-1β, IL-6) IL-6의 경우 나선인대의 제 3형과 4형의 섬유세포에서 발현된다고 보고하였으나 TNF-α의 발현부위에 대한 언급은 없었다.

본 연구에서 저자들은 강력한 싸이토카인의 한 종류인 TNF-α가 소음에 의해 손상된 와우에서 증가됨을 확인하였고 와우 내 발현부위 또한 확인하였는데, 이는 소음 노출 후 염증반응이 발생한다는 기존의 보고와 일치할 뿐 아니라 발현부위를 확인했다는 점에서 의미가 있다고 할 수 있다.

Aminpour 등[19]은 폐렴구균을 이용해 유발시킨 세균성 뇌막염 모델에서 TNF-α 항체를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교하였는데, TNF-α 항체를 처리하지 않은 군에서 유모세포뿐 아니라 나선신경절, 나선인대, 혈관조 등 와우 내 거의 전 조직에서 세포손상이 심하게 일어남을 관찰하여 TNF-α가 와우 전 조직에 손상을 입히고 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 초기 손상이 너무 큰 영구적 역치 변동모델이어서 소음노출 후 수 시간 이내에 유모세포가 대부분 손상되어 정상구조를 관찰하기 힘들어 유모세포에서 TNF-α의 발현은 확인할 수 없었고 나선신경절과 혈관조에서 발현되는 것을 확인할 수 있었으며 이 부위에서 증가되는 T-

NF-α가 나선신경절의 경우 유모세포 하부의 신경접합부, 혈관조의 경우 내림프액을 통해 유모세포 손상에 영향을 미치며 에너지대사와도 연관이 있을 것이라 생각된다. 분명한 것은 소음 노출 이후에 청각은 영구적으로 손상되었고 유모세포 숫자는 감소하였으며 TNF-α가 나선신경절에서 발현되었다는 점으로 TNF-α의 발현이 유모세포에 어떤 영향을 미쳤는지는 확실하지 않으나 발현양상으로 보아 주된 작용점은 나선신경절과 혈관조일 것으로 생각된다.

TNF-α는 소음 노출 직후부터 증가하고 7일 이상 지속적으로 발현되어 소음 노출 후 발생하는 와우 손상에 관여함을 확인할 수 있었다. TNF-α는 소음 노출 직후부터 와우축과 Rosenthal's canal 내부에서 신경조직에서 진하게 염색되었으며 신경세포핵보다는 신경섬유에 더욱 진하게 염색되었다(Fig. 5). 원심성 또는 구심성 신경이 소음성 난청의 발생에 어떤 영향을 미치는지는 잘 알려져 있지 않으나 소음 노출 후 신경섬유에서 TNF-α가 증가되는 것으로 보아 소음에 의해 신경섬유에서도 염증반응이 일어나는 것을 알 수 있었으며 소음 노출 후 나선신경절의 신경세포 손상에 TNF-α가 관여하고 있음을 유추할 수 있었다. 유모세포의 손상과 신경조직에서 생긴 염증반응과의 관계는 명확하지 않으며 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 청각의 경우 초기 수 일 이내 역치변동이 일어난 후 회복되지 않는 양상을 보였고 이는 TNF-α가 와우 손상 중 초기손상에 관여함을 시사하는 소견이라 생각된다. RT-PCR에서 TNF-α는 18시간 이후부터 발현이 줄어들다가 48시간에 다시 증가하는 것을 볼 수 있었는데 이러한 발현 증가는 유모세포 손상이나 청각저하와는 직접적인 관련이 없었을 것으로 보인다.

Acknowledgments

This paper was supported by Wonkwang University in 2010.

REFERENCES

1) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000;118(2):503-8.
2) Adams JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: a technical note. Otol Neurotol 2002;23(3):316-22.
3) Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. J Neurosci Res 2006;83(4):575-83.
4) Tornabene SV, Sato K, Pham L, Billings P, Keithley EM. Immune cell recruitment following acoustic trauma. Hear Res 2006;222(1-2):115-24.
5) Henderson D, Hu B, Bielefeld E. Pattern and mechanisms of noise-induced cochlear pathology. In: Schacht J, Popper AN, Fay RR, editors. Auditory trauma, protection, and repair. 1st ed. New York: Springer;2008. p.195-217.
6) Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. Audiol Neurootol 1999;4(5):229-36.
7) Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. Eur Arch Otorhinolaryngol 1995;252(8):504-8.
8) Thalmann R, Miyoshi T, Kusakari J, Ise I. Normal and abnormal energy metabolism of the inner ear. Otolaryngol Clin North Am 1975;8(2):313-33.
9) Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979;59(3):527-605.
10) Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. Ear Hear 2006;27(1):1-19.
11) Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. Hear Res 2002;166(1-2):62-71.
12) Lamm K, Arnold W. The effect of blood flow promoting drugs on cochlear blood flow, perilymphatic pO(2) and auditory function in the normal and noise-damaged hypoxic and ischemic guinea pig inner ear. Hear Res 2000;141(1-2):199-219.
13) Cho Y, Gong TW, Kanicki A, Altschuler RA, Lomax MI. Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea. Brain Res Mol Brain Res 2004;130(1-2):134-48.
14) Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Shibata S, Yamashita D, et al. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. Neurosci Res 2010;66(4):345-52.
15) Miyao M, Firestein GS, Keithley EM. Acoustic trauma augments the cochlear immune response to antigen. Laryngoscope 2008;118(10):1801-8.
16) Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. Laryngoscope 2002;112(9):1627-34.
17) Keithley EM, Wang X, Barkdull GC. Tumor necrosis factor alpha can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. Otol Neurotol 2008;29(6):854-9.
18) So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E, et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. J Assoc Res Otolaryngol 2007;8(3):338-55.
19) Aminpour S, Tinling SP, Brodie HA. Role of tumor necrosis factor-alpha in sensorineural hearing loss after bacterial meningitis. Otol Neurotol 2005;26(4):602-9.