Otology
online © ML Comm
Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:526-31 / pISSN 2092-5859 / eISSN 2092-6529
http://dx.doi.org/10.3342/kjorl-hns.2011.54.8.526

The Effect of Ginkgo Biloba on the Survival of Spiral Ganglion Neurons in Rats

Il-Woo Lee, Hyun-Min Park, Kyong-Myong Chon, Sung-Hwan Park, Seung-Kuk Shin and Eui-Kyung Goh

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

은행잎 추출물이 난청을 유발시킨 백서 와우 나선신경절세포에 미치는 영향

이일우 · 박현민 · 전경명 · 박성환 · 신승국 · 고의경

부산대학교 의학전문대학원 이비인후과학교실

Background and Objectives Ginkgo biloba extract (GBE) enhances cell survival in various organs. GBE protects nerve cells in the central nervous system and is clinically applied in Parkinson's and Alzheimer's disease. GBE can protect ototoxicity caused by cisplantin and gentamycin through rescue of hair cells in Organ of Corti and is accepted as one of the therapeutic agents for sudden deafness and tinnitus. The experimental study on GBE for the inner ear is confined to the hair cells, not to the spiral ganglion neurons (SGNs) which is the stimulated part by the electrode of cochlear implant. The aim of this study is to elucidate the effect of GBE on the survival of SGNs after hair cell loss in rats.

Materials and Method Ten Sprague-Dawley rats aged 50 days (P50) were deafened with kanamycin sulfate. GBE (EGb 761) was injected into the right cochlea and artificial perilymph was injected into the left side. The number and size of SGNs were compared after immunohistochemical statin in both groups. The expression of pJun, which is well-known as a proapoptotic transcription factor in the cochlea, was also compared.

Results The number of SGNs was significantly larger in the GBE group than the control. The expression of pJun activity was significantly decreased in GBE group than the control. The size of SGNs in both groups was similar.

Conclusion These results suggest that GBE can protect SGNs death by inhibiting the pJun-C-jun N-terminal kinase pathway. GBE might be a potential drug for the patients with total deafness before or after cochlear implantation surgery for better hearing results.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:526-31

Key Words Ginkgo biloba extract · Spiral ganglion neurons · pJun · C-jun N-terminal kinase(JNK).

Received April 16, 2011
Revised July 12, 2011
Accepted July 12, 2011
Address for correspondence
Eui-Kyung Goh, MD, PhD
Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery,
Pusan National University School of Medicine,
179 Gudeok-ro, Seo-gu,
Busan 602-739, Korea
Tel +82-51-240-7332
Fax +82-51-246-8668
E-mail gohek@pusan.ac.kr

서 론

은행잎 추출물(ginkgo biloba extract, GBE)은 flavonoid glycoside와 terpenoids를 함유하고 있고, 이들은 세포에 대한 보호작용이 있어 각종 신경질환과 이명, 돌발성 난청 등의 이비인후과 질환의 치료에 많이 사용되고 있다.[1] Flavonoid는 식물에 광범위하게 분포하여 인체의 항알레르기, 항바이러스, 항암작용 등 세포의 생존에 중요한 역할을 하며, 과일이나 채소, 차 잎 등에 함유되어 있다.[2]

GBE가 신경세포의 생존을 증가시키는 기전은 확실하게 알려져 있지 않으나, 세포 보호에 가장 중요한 작용기전인 항산화작용(antioxidant effect)에 의한 것으로 보고되고 있다. Cisplantin에 의한 이독성을 GBE 투여로 보호할 수 있고,[3] GBE가 Parkinson 병 및 노인성 치매의 예방 및 치료효과를

 Copyright © 2011 Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery

나타내는데 이 때의 작용기전이 항산화작용이라고 알려져 있다.[4] 흰쥐의 복강내로 주입된 GBE는 안구의 망막신경절세포의 세포생존을 촉진시키는데,[11,12] GBE의 세포고사(apoptosis) 억제효과는 caspase-3 경로를 억제함으로써 일어난다.[5]

그러나 GBE가 난청이나 이명 등의 이비인후과 질환의 치료에 미치는 영향에 대해서 와우내 혈류개선을 향상시켜 도움이 된다는 의견이 많지만, 대규모의 객관적 연구를 통해 그 치료 효과가 확실히 증명된 사실은 없다.[6] 또한 GBE는 생쥐의 태아줄기세포(embryonic stem cell)에서 세포고사 기전에 핵심적인 물질인 c-jun N-terminal kinase(JNK) pathway를 활성화 함으로서 세포괴사를 유도한다는 연구도 있어[7] 실제 GBE가 와우내에서 신경세포의 생존에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직 실험적으로 확실히 밝혀진 바가 없다.

인공와우이식술에서 이식된 전극(electrode)에 의해 자극되는 부위는 와우내의 나선신경절세포(spiral ganglion neurons, SGNs)이다. 따라서 인공와우 이식 후 SGNs의 생존은 이식의 성공에 직접적인 영향을 미친다.[8] 또한 소음 및 약물에 의한 와우내 유모세포의 손상으로 야기되는 난청에서 난청발생 후 점진적으로 일어나는 이차적인 SGNs의 세포고사를 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다. SGNs의 세포고사 초기에는 생존촉진인자(prosurvival transcription factor)인 pCREB(phospho-cAMP response element binding protein)이 감소하여 세포고사가 일어나지만, 후기에는 세포고사촉진인자(proapoptotic factor)인 cJun-JNK pathway의 활성으로 세포고사가 생긴다.[9]

본 연구의 목적은 신경세포의 생존을 촉진시킨다고 알려져 있는[4] GBE가 SGNs의 생존에 미치는 영향을 알아보고, 이때 GBE가 SGNs의 세포고사 후기에 작용하는 cJun-JNK pathway를 통한 것인지 확인하여, GBE가 유모세포 손상 후 발생하는 SGNs의 이차적인 세포고사를 예방할 수 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

난청유발

Kanamycin sulfate로 난청을 유발시킨 cJun에 의한 SCNs의 괴사가 시작되는 시기인 생후 50일 된 250~300 g의 Sprague-Dawley 흰쥐 10마리를 대상으로 하였다. 난청 유발을 위하여 난청발생이 가장 잘 유발되는 생후 8일(P8)부터 생후 16일(P16)까지 kanamycin sulfate 400 mg/kg을 매일 복강 내로 주사하였다. 유발된 난청의 검증방법으로, 적출된 와우의 Corti 기관을 Myosin 6항체로 염색하여 기저부에서 유모세포가 완전 파괴된 것을 확인하였다.

GBE 투여

난청이 유발된 흰쥐의 우측 귀를 대상군으로 하여, 생후 50일(P50)에 우측 귀의 와우내로 은행잎 추출물인 EGb 761(Tanamin®)을 주입하였다. 좌측 귀는 대조군으로 사용하여 인공림프액(artificial perilymph)을 같은 방법으로 주입하였다. 난청유발시 시간에 따른 SGNs의 점진적인 괴사를 확인하였으며, 정상청력에서의 SGNs와 구분이 가능하여 정상대조군을 설정하지 않고 동일개체에서 약물투여군과 대조군을 나눠 비교하였다. 구체적인 실험방법을 요약하면, 백서의 복강 내에 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(4 mg/kg)의 9 : 1 혼합액을 주사하여 마취를 유도하고, 이개 후부를 절개하여 bulla를 노출시키고 안면신경 상방에서 bulla를 drilling하여 개구부를 만들어 중이강으로 접근한 후 등골동맥 상방에서 와우개창술(cochleostomy)을 시행하였다(Fig. 1).

Alzet mini-osmotic pump Model 2002를 이용하여 한 개의 punp에 들어가는 최대 용량인 GBE 0.2 cc를 2주간에 걸쳐 주입하였다. 2주 후 와우조직을 채취하기 전 4% paraformaldehyde(PFA)액으로 심장 관류시키고, 와우와 전정을 포함한 조직을 채취하였다. 채취한 와우는 4% PFA액에 다시 6시간 고정시키고 EDTA액으로 1주일간 탈석회 시켰다. 탈석회 후 와우내의 연부조직 고정을 위해 10%와 30% sucrose액을 낮은 농도에서부터 높은 농도 순서로 순차적으로 2.5시간에 걸쳐 스며들게 하고 다음날에 Optmal Cutting Temperature(OCT®)액으로 냉동절편을 만들어 Cryostat(CM 1510S-3, Leica, Wetzglar, Germany)로 7 μm 간격으로 잘라 면역형광 염색 전까지 영하 80도에 냉동보관하였다.

면역형광염색

영하 80도 냉동보관된 슬라이드를 영하 20도로 옮겨 1일 보관하고 다시 슬라이드를 실온에서 건조시킨 후 phosphate buffer solution(PBS) 용액에 5분간 세척하고 0.2% Triton X-100 용액을 투과시켜 20분간 실온에 방치하였다. PBS에 5분간 세척한 후 blocking buffer 용액에 1시간 동안 실온 방치 후 다시 PBS 용액에 5분간 세척하였다. 사용된 1차 항체는 세포질 염색을 위해 monoclonal anti-neurofilament 200 (NF-200, Sigma®, St. Louise, MO, USA)을 1 : 200으로 희석하였고, 핵 염색은 Hoechst(Sigma®), Jun 활성도는 Phsopho-c-Jun(Ser 73)(Cell Signaling Technology®, Beverly, MA, USA)을 1 : 100으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로 NF 200은 PE-anti-mouse IgG(Dako Cytomation, Denmark)를 1 : 20으로, c-Jun은 FITC-anti-rabbit IgG(Dako

Cytomation, Denmark)를 1 : 20으로 희석하여 사용하였다. 면역형광염색 후 형광현미경(BE/DM-IRB, Leica, Wetzglar, Germany)으로 SGNs의 수, 크기 및 pJun의 발현정도를 관찰하였다.

Parameters

GBE가 SGNs의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실험군과 대조군 각각에서 SGNs의 수, 세포의 크기, 그리고 phospho Jun의 발현정도를 측정하여 비교하였다.

세포의 수는 와우의 정중앙 종축단면(mid-modiolar section)의 기저부에서 동일한 단면적의 Rosenthal canal을 각각 2개씩 선택하여 총 20개의 Rosenthal canal 내의 세포 수를 계수하여 대조군과 비교하였다. Image J 프로그램을 이용하여 핵과 세포질이 분명하게 염색된 세포를 프로그램상에서 "Measure" 기능을 이용하여 점으로 찍어 자동계수하여 측정하였다.

세포의 크기는 Image J 프로그램을 이용하여 세포의 장축과 단축의 길이를 재고 이를 평균하여 비교하였다.

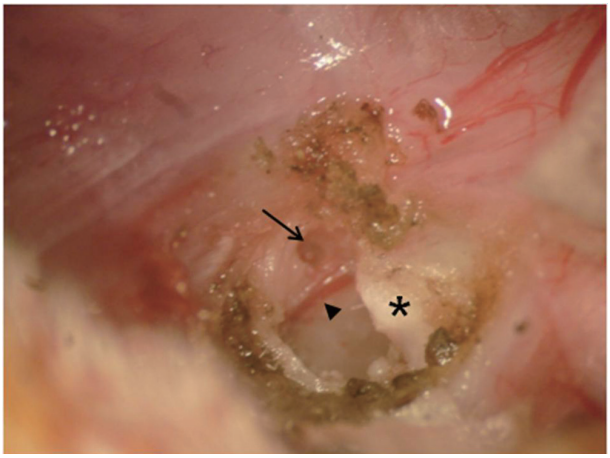

Fig. 1. Photography of surgical field after cochleostomy. Bulla (asterisk) was opened and the stapedial artery (arrowhead) was identified before the cochleostomy (arrow).

Phospho Jun 발현은 Image J 프로그램을 이용하여 gray scale에서 핵내의 발현정도(nuclear IF)에서 세포질내의 발현정도(cytoplasmic IF)의 차이를 측정하였다.

t-test로 통계학적 검증을 하였다.

결 과

세포의 수

GBE 군의 SGNs의 수는 Rosenthal canal 당 평균 79.1±8.8개였고, 대조군은 65.6±9.3개로 GBE 첨가군이 통계학적으로 의의 있게 많았다(Figs. 2 and 3).

세포의 크기

GBE 군의 SGNs의 세포크기는 평균 41.3±3.1, 대조군은 40.2±3.2로 GBE 군에서 세포크기가 조금 컸지만 통계학적 의의는 없었다(Fig. 4).

phospho Jun의 발현정도

pJun의 발현은 GBE 군에서 36.7±15.7, 대조군에서 49.4±21.1로 통계학적으로 의의 있게 GBE 군에서의 발현정도가

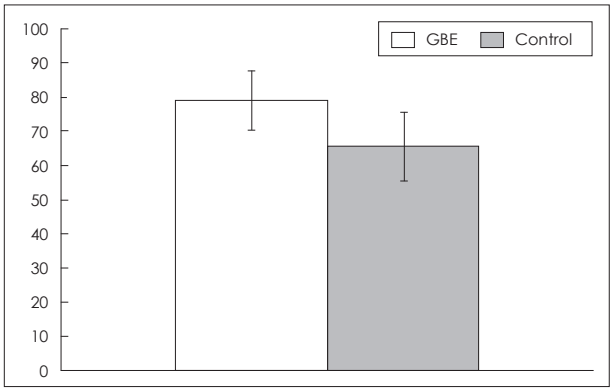

Fig. 3. Comparison of cell number in GBE injected and the control group. The number was statistically different in both groups (p<0.05). GBE: ginkgo biloba extract.

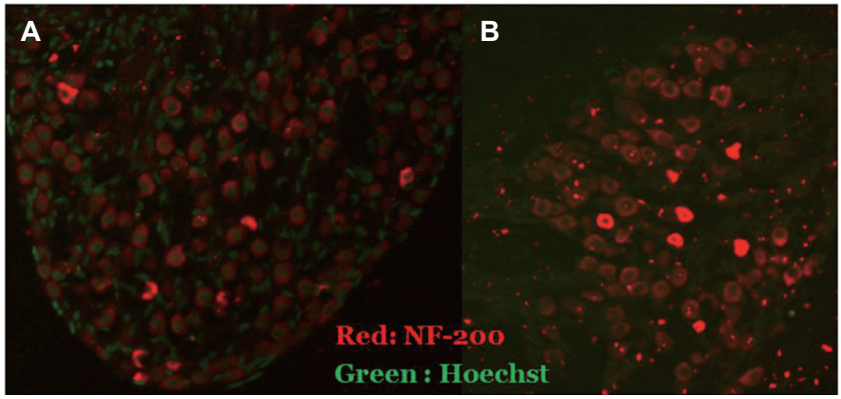

Fig. 2. Immunofluorescent image of GBE injected (A) and control (B) cochleae. The number of cell is more in GBE injected than the control. Red: NF-200, Green: hoechst. GBE: ginkgo biloba extract.

낮았다(Figs. 5 and 6).

고 찰

GBE는 세포의 괴사를 억제하여 손상된 각종 세포의 재생에 유용한 물질로 알려져 있다. GBE의 대표적 물질인 EGb 761®은 doxorubicin에 의해 야기된 백서 심근세포의 세포손상을 회복시키며,[10] 당뇨성 백내장 환자의 높은 혈당에 의해 유도된 수정체 세포손상을 예방하고,[11] 담배 연기 추출물에 의한 폐포 내막세포의 세포손상을 보호하며,[12] 망막신경절 세포의 caspase-3 의존성 세포괴사를 억제하는 효과를 가진다.[5] 특히 Parkinson병, Alzheimer병과 같은 질환에서는 신경세포 보호작용으로 인한 치료효과가 인정되고 있다.[4,12] EGb 761®은 schwann 세포의 신경재생도 촉진하여 말초신경의 기능도 개선한다고 알려져 있다.[12]

GBE가 세포재생을 촉진하는 기전은 세포의 종류에 따라 다르다. 가장 주된 기전은 세포 내 과량의 자유기(free radical)를 제거하는 것으로 관상동맥 우회술을 시행하는 환자에서 EGb 761®을 전처치할 경우 자유기에 의한 손상을 예방할 수 있다.[13] 또한 혈소판 촉진인자와 길항작용을 하여 혈소판 응집이 줄어들고 혈류가 증가하며 prostacycline와 nitric oxide의 분비가 일어난다.[13] EGb 761®의 bilabalide는 glutamate에 의해 유도되는 신경세포고사에 보호작용을 한다. 또한 노화과정에서의 산화에 의한 apoptosis를 억제한다.[14]

GBE는 이러한 항산화작용 및 신경세포 보호작용이 알려져 이비인후과 영역에서도 돌발성 난청 환자의 치료제 중 하나로 사용되고 있다.

GBE는 전신투여시 gentamycin, cisplantin에 의한 와우독성을 예방한다.[3,15] Cisplantin은 와우내 항산화계의 고갈을 일으키고 지방 과산화효소를 증가시켜 와우독성을 유발하며 GBE는 이들을 억제하여 apoptosis를 예방한다.

Burschka 등[16]은 106명의 이명과 현훈을 동반하지 않는 75 dB 미만의 일측성 돌발성 난청환자에서 EGb 761® 120 mg을 하루 2회 경구투여하여 높은 청력회복을 보고하였다. Reisser와 Weidauer[1]는 76명의 환자에서 EGb 761이 청력회복과 이명 소실을 촉진시킨다고 보고하였다.

돌발성 난청에서 이러한 연구들의 단점은 난청치료를 위하여 GBE를 단독으로 사용한 것이 아니라 다른 치료와 병행하여 치료한 결과라는 점이다. 따라서 현재까지 GBE 단독사용에 의한 치료효과를 분석한 논문은 없으며, 오히려 이명의 치료에 GBE는 효과가 없다는 다수의 논문[6,17]이 있어, 실제로 GBE가 내이에 어떠한 작용을 미치는지는 아직 밝혀지지 않고 있다고 할 수 있다.

GBE에 의한 신경절 세포의 변화에 관한 연구는 망막신경

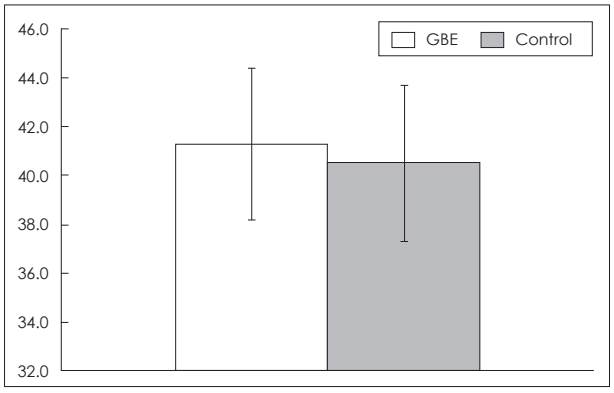

Fig. 4. Comparison of cell size in GBE injected and the control group. The size was statistically not different in both groups (p>0.05). GBE: ginkgo biloba extract.

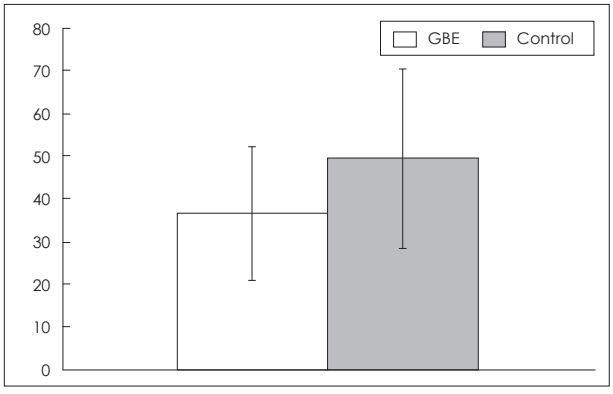

Fig. 6. Comparison of pJun expression in GBE injected and the control group. The value of expression was statistically lower in GBE injected group than in the control (p<0.05). GBE: ginkgo biloba extract.

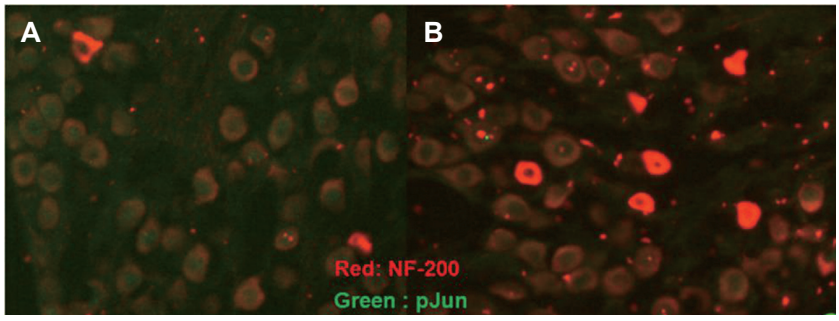

Fig. 5. pJun expression of GBE injected (A) and control (B) cochleae. Red: NF-200, Green: pJun. GBE: ginkgo biloba extract.

절세포(retinal ganglion neuron, RGNs)[5]에 관한 것이 대부분이다. 이들 실험에서 GBE는 여러가지 원인에 의한 RGNs 의 세포괴사를 억제하는데, 안신경 손상후 RGNs의 괴사를 억제하여 형태학적, 기능적으로 RGNs를 보호한다.

와우내의 SGNs는 유모세포로부터의 자극이 있을 때 생존하는 세포이며, 내이성 난청에서 유모세포의 손상에 의한 이러한 자극이 없어지면 세포괴사가 일어나게 된다.

임상적으로 유모세포의 파괴는 소음, 약물, 노화 등의 원인으로 일어난다.[18] 70 dB 이상의 고도 감각신경성 난청의 가장 효과적인 치료방법은 와우이식술인데, 이식된 인공와우가 달팽이관 내에서 자극하는 부위가 SGNs이다. 난청발생 기간이 증가함에 따라 SGNs도 점진적으로 그 수가 줄어들게 되며 남아 있는 SGNs의 수는 와우이식 후의 청력개선 정도와 밀접하게 연관되어 있다.[8] SGNs의 괴사과정은 초기에는 생존촉진인자(prosurvival)의 감소, 후기에는 괴사촉진인자(proapoptotic)에 의해 일어난다. 괴사가 일어나는 기간은 개체별로 다르며, 사람의 경우 수십 년에 걸쳐 일어나는 것으로 알려져 있다.[18,19] 괴사 과정에서 세포의 크기도 감소하게 되는데 본 연구에서는 크기가 대조군보다 작기는 했으나 통계적인 의의는 보이지 않았다. 백서 SGN의 괴사가 일어나는 시간경과 중 P50 시점에서 세포의 크기변화는 미세한 것으로 추정하였다.

본 연구는 유모세포 손상에 의해 야기되는 와우 나선신경절 세포의 괴사과정에 GBE가 미치는 영향을 세포의 수, 세포의 크기 변화를 통하여 조사하였다. 특히 나선신경절 세포의 괴사 과정 중 후기에 작용하는 phospho Jun의 활성을 측정하여 GBE가 Jun 활성화 과정을 억제할 수 있는지를 p-Jun의 발현정도를 분석하여 알아보았다.

c-Jun은 세포괴사를 촉진하는(proapoptotic) 전사조절인자(transcription factor)로 JNK에 의해 인산화되어 SGNs의 세포괴사 과정 후기에 작용한다. 이러한 Jun 인산화와 JNK 활성화는 유모세포 파괴 후에 2차적, 점진적으로 일어나는 SGNs의 괴사과정에서 관찰된다.[9] 따라서 JNK 활성화를 억제하는 물질은 Jun 인산화에 의한 SGNs의 세포괴사를 억제하게 되는데 현재까지 JNK를 억제하는 물질로 SP600125, I-JIP(CEP 11004) 등[20]이 실험적으로 입증되어 있으나 실제 임상에서는 사용되고 있지 않다.

GBE는 이명과 난청에 대한 효과에 대해 논란이 있기는 하지만, 각종 신경질환에 비교적 안정적으로 사용되어 온 물질이다. 본 연구에서 GBE는 와우내로 직접 주입했을 경우 유모세포 소실 후 괴사되어 가는 SGNs에 작용하여 괴사과정을 지연시키는 것을 알 수 있었다. 또한 이때 pJun의 발현이 GBE 군에서 감소하는 것을 관찰하였으며, 이는 GBE에 의한 SGNs 생존촉진의 기전은 SGNs의 괴사과정 후기에 중요한 괴사촉진인자인 JNK를 억제함으로써 이루어진다고 추정할 수 있다.

본 연구를 통하여 SGNs의 생존에 GBE가 세포괴사를 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 GBE가 현재 활발히 연구되고 있는 난청예방 및 치료를 위한 와우내 약물로 더 연구가 필요함을 시사한다.

REFERENCES

1) Reisser CH, Weidauer H. Ginkgo biloba extract EGb 761 or pentoxifylline for the treatment of sudden deafness: a randomized, reference-controlled, double-blind study. Acta Otolaryngol 2001;121(5):579-84.
2) Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, et al. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. Neurotox Res 2003;5(6):425-32.
3) Huang X, Whitworth CA, Rybak LP. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. Otol Neurotol 2007;28(6):828-33.
4) Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. Annu Rev Med 2006;57:513-33.
5) Cheung ZH, Leung MC, Yip HK, Wu W, Siu FK, So KF. A neuroprotective herbal mixture inhibits caspase-3-independent apoptosis in retinal ganglion cells. Cell Mol Neurobiol 2008;28(1):137-55.
6) Hilton M, Stuart E. Ginkgo biloba for tinnitus. Cochrane Database Syst Rev 2004;(2):CD003852.
7) Hsuuw YD, Kuo TF, Lee KH, Liu YC, Huang YT, Lai CY, et al. Ginkgolide B induces apoptosis via activation of JNK and p21-activated protein kinase 2 in mouse embryonic stem cells. Ann N Y Acad Sci 2009;1171:501-8.
8) Fayad J, Linthicum FH Jr, Otto SR, Galey FR, House WF. Cochlear implants: histopathologic findings related to performance in 16 human temporal bones. Ann Otol Rhinol Laryngol 1991;100(10):807-11.
9) Alam SA, Robinson BK, Huang J, Green SH. Prosurvival and proapoptotic intracellular signaling in rat spiral ganglion neurons in vivo after the loss of hair cells. J Comp Neurol 2007;503(6):832-52.
10) Liu TJ, Yeh YC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, Lee HW, et al. Ginkgo biloba extract 761 reduces doxorubicin-induced apoptotic damage in rat hearts and neonatal cardiomyocytes. Cardiovasc Res 2008;80(2):227-35.
11) Wu ZM, Yin XX, Ji L, Gao YY, Pan YM, Lu Q, et al. Ginkgo biloba extract prevents against apoptosis induced by high glucose in human lens epithelial cells. Acta Pharmacol Sin 2008;29(9):1042-50.
12) Hsu CL, Wu YL, Tang GJ, Lee TS, Kou YR. Ginkgo biloba extract confers protection from cigarette smoke extract-induced apoptosis in human lung endothelial cells: role of heme oxygenase-1. Pulm Pharmacol Ther 2009;22(4):286-96.
13) Dubey AK, Shankar PR, Upadhyaya D, Deshpande VY. Ginkgo biloba--an appraisal. Kathmandu Univ Med J (KUMJ) 2004;2(3):225-9.
14) Schindowski K, Leutner S, Kressmann S, Eckert A, Müller WE. Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761). J Neural Transm 2001;108(8-9):969-78.
15) Jung HW, Chang SO, Kim CS, Rhee CS, Lim DH. Effects of Ginkgo biloba extract on the cochlear damage induced by local gentamicin installation in guinea pigs. J Korean Med Sci 1998;13(5):525-8.
16) Burschka MA, Hassan HA, Reineke T, van Bebber L, Caird DM, Mösges R. Effect of treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 (oral) on unilateral idiopathic sudden hearing loss in a prospective randomized double-blind study of 106 outpatients. Eur Arch Otorhinolaryngol 2001;258(5):213-9.
17) DeBisschop M. Ginkgo ineffective for tinnitus. J Fam Pract 2003;52(10):766, 769.
18) Nadol JB Jr, Young YS, Glynn RJ. Survival of spiral ganglion cells in

profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation. Ann Otol Rhinol Laryngol 1989;98(6):411-6.
19) Nadol JB Jr. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. Otolaryngol Head Neck Surg 1997;117(3 Pt 1):220-8.
20) Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Omori K, Yamaguchi M, Takashiba S. C-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, blocks interleukin (IL)-6-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production: cyclosporine A partially mimics this inhibitory effect. Transplantation 2003;76(9):1380-2.