

Expression Changes of Endothelin-1, Endothelin Receptor A and B in the Cochlea after Noise Exposure

Gang Min Hur¹, Ah-Ra Lyu², Wook Kyoung Han²,
Jin Woong Choi², Ki Sang Rha² and Yong Ho Park^{2,3}

¹Departments of Pharmacology, ²Otolaryngology-Head and Neck Surgery, ³Brain Research Institute,
Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

소음 노출 후 내이에서 Endothelin-1, Endothelin 수용체 A와 B의 발현양상 변화

허강민¹ · 류아라² · 한옥경² · 최진웅² · 나기상² · 박용호^{2,3}

충남대학교 의과대학 약리학교실, ¹ 이비인후과학교실, ² 뇌과학연구소³

Received March 5, 2013

Revised April 9, 2013

Accepted April 10, 2013

Address for correspondence

Yong Ho Park, MD

Department of Otolaryngology-Head
and Neck Surgery,

Chungnam National University

School of Medicine, 282 Munhwa-ro,
Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea

Tel +82-42-280-7697

Fax +82-42-253-4059

E-mail parkyh@cnu.ac.kr

Background and Objectives There are several evidences of reduced cochlea blood flow after noise exposure in the cochlea. However, the pathophysiology of blood flow change is still obscure, and endothelins, proteins that constrict blood vessels and play a key role in vascular homeostasis using its receptors may have importance in this respect. In this study, we investigated the expression changes of endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor A (ETAR) and B (ETBR) according to auditory threshold change after noise exposure.

Materials and Method Mice were exposed to different noise to generate transient (group 2) and permanent threshold shift (group 3), respectively. Auditory threshold shifts were evaluated with auditory brainstem response and expression changes of ET-1, ETAR and ETBR after noise exposure were evaluated by immunohistochemistry and real time RT-PCR.

Results After noise exposure, the increased ET-1, ETAR and ETBR immunoreactivities were observed in stria vascularis, spiral ligament and spiral ganglion neuron. ET-1 mRNA expressions increased after noise exposure in both group 2 and group 3 compared to those of the control group. At 2 weeks after noise exposure, however, the ET-1 mRNA expressions in group 3 increased compared to that of the control but decreased compared to that of group 2. On the other hand, ETAR mRNA expression increased at 2 weeks after noise exposure in both groups, just after noise exposure in group 2 and at 2 weeks after noise exposure in group 3.

Conclusion These results suggest that expression changes of ET-1, ETAR and ETBR might be associated with hearing threshold shift and recovery after noise exposure in the cochlea.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2013;56:278-85

Key Words Cochlea · Endothelin receptor · Endothelin-1 · Noise.

서론

일반적으로 소음에 의한 와우손상의 기전으로는 Corti기의 유모세포나 지지 구조물들의 기계적인 손상과 내이의 대사변화로 설명되고 있는데 이 중 내이의 대사변화는 와우내 이온 통로 파괴, 신경연접부의 피로, 혈관조나 유모세포의 대사성 피로 및 와우 혈류 변화 등에 기인하는 것으로 생각되고

있다.^{1,2)} 와우에서 혈관선조는 와우내 항상성 유지에 중요한 기능을 담당하는데 소음의 노출에 의해서는 Corti기의 손상 뿐 아니라 와우측벽의 혈관선조에서도 부종과 변성이 관찰되고 이러한 결과는 소음에 의한 일부 와우내 혈류의 변화와도 관계가 있을 것으로 생각되고 있다.^{3,4)}

Endothelin은 돼지의 대동맥 내피세포에서 처음으로 발견된 강력한 혈관수축물질의 하나로 혈관수축은 물론 체액량

이나 세포내 이온균형, 신경세포 기능조절에도 중요한 역할을 한다.⁵⁾ Endothelin은 1, 2, 3의 3가지 아형이 있으며 그 작용은 endothelin receptor A, B를 통하여 이루지는데 일반적으로 endothelin receptor A(ETAR)는 혈관의 평활근 세포내에 풍부하며 endothelin-1(ET-1)과 특이적으로 결합하여 혈관 수축을 유발하고 endothelin receptor B(ETBR)는 혈관내피세포에 풍부하며 nitric oxide 생성을 통하여 혈관 확장에 관계하는 것으로 알려져 있다.^{6,7)}

최근 연구에서 내이의 측벽과 나선신경절 등에서도 ET-1, ETAR, ETBR의 발현이 관찰되었으며 이러한 것들이 내이의 항상성 유지에 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 이에 저자들은 소음에 의한 청각 역치상승의 동물모델 내이에서 청력의 변화에 따른 ET-1, ETAR, 그리고 ETBR 발현 양상의 변화를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험군과 소음의 노출

청성뇌간반응에서 정상소견을 보이고 정상의 Preyer 반응을 보이는 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스 25마리를 사용하였다. 소음의 노출은 방음 처리된 박스형으로 만들어진 100×80×60 cm의 동물우리 속에 실험동물을 넣고 소음원은 Goldwave(ver5.09, Goldwave Inc., Newfoundland, Canada) 프로그램을 이용하여 증폭기(INTER-M R300 Plus power amplifier, Canford Audio PLC, Washington, UK)와 두 개의 스피커(ElectroVoice DH1A-WP, Sonic Electronix Inc., Valencia, CA, USA)를 연결하여 사용하였다. 소음의 정도는 음량수준계(sound level meter B&K type 2250, Brüel & Kjær, Naerum, Denmark), 음향조정기(sound calibrator B&K type 4231, Brüel & Kjær, Naerum, Denmark)와 응축확성기(condenser microphone B&K type 4189, Brüel & Kjær, Naerum, Denmark)로 측정하였다. 실험군은 각각 소음에 노출하지 않은 정상 대조군(group 1; 5마리)과 100 dB SPL, 1~12 kHz의 소음에 5분 노출시킨 군(group 2; 10마리) 및 120 dB SPL, 1~12 kHz의 소음에 8시간 노출시킨 군(group 3; 10마리)으로 분류하였다.

청성뇌간반응의 측정

모든 실험동물은 ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)의 혼합액으로 근육마취를 시행하고 방음실에서 TDT system-3(Tucker Davies Technologies, Gainseville, FL, USA)을 이용하여 측정하였다. 삽입형 ear tip(3.5 mm, Nicolet Biomedical, Inc., Madison, WI, USA)을 외이도에 위치시키고 전극은 활동

전극을 두정부에, 기준전극은 측정할 귀의 후외부에, 접지전극은 반대측 귀의 후외부에 위치하였다. 자극음은 100 μ s의 click과 1 ms의 rise-fall time을 갖는 4 ms tone burst로 주었으며, 청성뇌간반응의 측정은 파형을 얻기 위하여 1024 tone presentation을 평균하였고 click, 4, 8, 16 그리고 32 kHz에서 역치를 측정하였다. 역치의 근방에서 음의강도는 5 dB 간격으로 측정하였으며 청성뇌간반응의 역치는 제5파형이 나타나는 최소의 자극강도로 정의하였다. 대조군과 소음 노출군 모두에서 소음 노출 전에 청성뇌간반응을 측정하여 기준점으로 정하였으며 소음 노출에 따른 청성뇌간반응의 역치변화를 관찰하기 위하여 소음 노출 직후, 소음 노출 7일, 그리고 14일 후에 각각 측정하였다.

조직학적 관찰

조직의 준비

조직학적 관찰을 위하여 실험 동물은 마취 후 측두골을 채취하고 와우를 분리하여 pH 7.4의 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffered solution(PBS)로 1시간 동안 와우내 고정하였다.

유모세포의 손상여부를 확인하기 위하여 대조군과 소음 노출 2주 뒤에 각각 얻은 와우는 해부현미경하에서 기저 회전부에서 침단부까지 골와우각, 혈관조, Reissner막, 개막의 순서로 제거하여 와우 침단부부터 기저부까지 전체의 Corti 기관을 약 3~4분절로 분리하여 준비하였다.

ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 와우내 발현양상의 관찰을 위하여 분리된 와우는 고정 후 hydrochloric acid(Apex Engineering Products Co., Aurora, IL, USA)를 이용하여 약 30분간 탈회하였으며 처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 다음 4 μ m 두께로 절편을 만들었다.

유모세포의 손상확인

유모세포의 손상 확인을 위하여 분리된 조직은 pH 7.4인 PBS로 세정하고 0.3% Triton-X 100으로 처리하고 1차 항체 Myosin-VIIa(1 : 250, rabbit polyclonal Ab, Proteus BioSciences Inc., Ramona, CA, USA)으로 4℃에서 12시간 1차 반응 후 PBS로 세척한 뒤, 2차 항체 Alexa Fluor[®] 488(1 : 200, anti-rabbit IgG, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)로 30분 동안 반응시키고 fluorescein isothiocyanate(TRITC)로 표지된 phalloidin(1 : 100, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 수용성 마운트로 포매하여 형광현미경(BX50W/PH20, Olympus, Tokyo, Japan) 하에 관찰하였다.

ET-1, ETAR, ETBR 면역조직 화학염색

면역조직화학염색을 위하여 준비된 조직절편은 탈파라핀 과정을 거쳐 citrate buffer(pH 6.0) 용액에 담근 다음 4분 동안 microwave에 넣어 가열하였다. 0.05 M PBS로 세정한 후 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해서 1% H₂O₂에 15분간 상온에서 반응시키고, 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% normal goat serum(Vector, USA)으로 1시간 동안 상온에서 처리한 뒤 각각 1차 항체 ET-1(1 : 200, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), ETAR(1 : 200, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), ETBR(1 : 200, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)를 이용하여 4℃에서 12시간 반응시킨 후 biotinylated anti-rabbit Ig G와 horseradish peroxidase streptavidin(1 : 200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 이용하여 ABC 방법으로 염색을 시행하였으며 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다.

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction, real time RT-PCR)

대조군과 각각의 소음노출에 따른 ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 와우내 발현정도의 변화 관찰을 위하여 분리된 와우는 TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 mL에 갈아 한 시간 동안 4℃에서 shaker 위에서 반응시킨 후 200 μ L의 chloroform을 첨가하여 충분히 섞어준 후 13000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 약 450 μ L의 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol을 넣고 상온에서 5분 정도 흔들어 준 후 13000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하고 tube의 바닥에 얻어진 pellet에 80% DEPC ethanol을 1 mL 넣고 13000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 그 뒤 80% DEPC ethanol로 위의 과정을 한번 더 한 뒤 100% ethanol로 반복하여 세척을 하였고, RNA는 건조 후 DEPC를 처리하여 RNase 활성이 제거된 증류수 20 μ L로 용해시켰다. Total RNA 양을 정량하기 위하여 Nano drop(NanoDrop Technologies Llc., Wilmington, DE, USA)을 이용하였으며, 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 시료의 total RNA 양을 정량하였다.

cDNA는 2 μ g total RNA와 cDNA는 cDNA Synthesis kit(Roche, IN, USA)를 이용하여 합성하였다. RNA 2 μ g에 Oligo dT primer와 DEPC water로 총 13 μ L가 되게 만든 후 65℃에서 10분간 Pre-denature를 하고, 5x reaction buffer 4 μ L, dNTP 2 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L, RTase 0.5 μ L를 첨가한 후 50℃ 60분, 85℃ 5분 동안 역전사 반응을 유도하였다.

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction to detect ET-1, ETAR and ETBR

Primer name	Primer
Endothelin-1	Forward 5'-TTCCCGTGATCTTCTCTCTGCT-3'
	Reverse 5'-TCTGCTTGGCAGAAATCCA-3'
ETAR	Forward 5'-TTCACITTAAGCCGCAITTTGAA-3'
	Reverse 5'-AAGAATTCATGGTTGCCAGGT-3'
ETBR	Forward 5'-ATCGCTCTGTATTGGTGAGCA-3'
	Reverse 5'-AAGGACTGCTTTTCCTCAAACG-3'
GAPDH	Forward 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
	Reverse 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA T-3'

ET-1: endothelin-1, ETAR: endothelin receptor A, ETBR: endothelin receptor B, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

그 후 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위하여 SYBRgreen (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 제조사의 protocol에 따라 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 모든 실험은 세 차례 반복하였으며 ET-1, ETAR 그리고 ETBR mRNA의 상대적 정량은 comparative cycle of the threshold (CT) 방법을 이용하여 얻었다. 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용한 ET-1, ETAR 그리고 ETBR의 primer는 다음과 같다 (Table 1).

통계학적 검증

통계학적 검증은 SPSS(Version 12.0, Chicago, IL, USA)을 이용하여 소음 노출군에서 청성뇌간반응의 시간대별 차이와 대조군과 소음 노출 후 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응에서 ET-1, ETAR 그리고 ETBR의 발현정도 차이는 one way ANOVA를 사용하여 $p < 0.05$ 로 유의성을 검증하였다.

결 과

청성뇌간반응의 역치변화

소음 노출 전 실험동물의 기준청력은 유사하였으며 그룹별로 소음 노출 직후와 소음 노출 14일 후에 각각 청성뇌간반응의 역치변화를 측정하였다. 100 dB SPL, 1~12 kHz의 소음에 5분 노출시킨 group 2에서는 소음 노출 직후 click, 4, 8, 16과 32 kHz에서 측정한 청성뇌간반응의 역치 상승은 각각 26 ± 3.74 , 26 ± 5.48 , 68 ± 4.0 , 50 ± 8.94 와 24 ± 4.90 dB SPL이었으며, 소음 노출 14일 후에 측정한 청성뇌간반응의 역치 상승은 각각 4 ± 2.00 , 4 ± 4.90 , 12 ± 4.00 , 18 ± 4.00 과 8 ± 4.00 dB SPL로 소음 노출 1시간 후에 비하여 통계적으로 유의하게 청력 역치의 회복을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1).

120 dB SPL, 1~12 kHz의 광대역 소음에 8시간 노출시킨 group 3에서는 소음 노출 직후 click, 4, 8, 16과 32 kHz에서

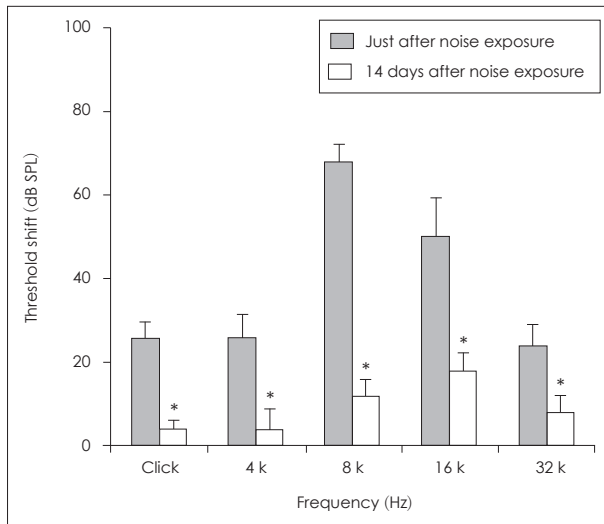


Fig. 1. ABR threshold shifts after noise exposure in group 2. ABR threshold shift is recovered at 14 days after noise exposure compared to just after noise exposure (* $p < 0.05$). ABR: auditory brainstem response.

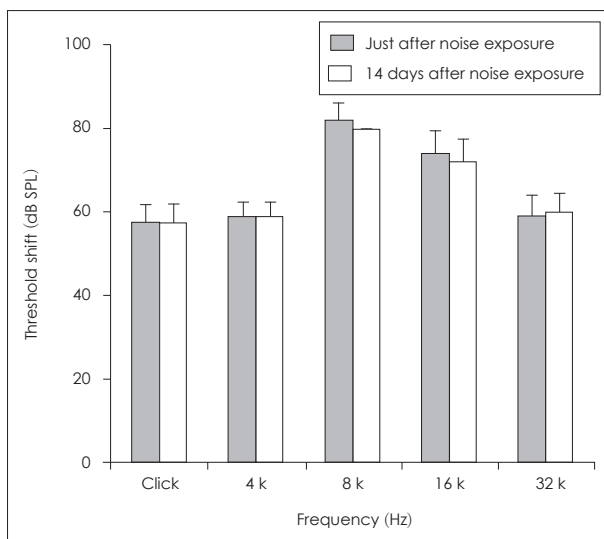


Fig. 2. ABR threshold shifts after noise exposure in group 3. ABR threshold shift is not recovered until 14 days after noise exposure compared to just after noise exposure. ABR: auditory brainstem response.

측정한 청성뇌간반응의 역치 상승은 각각 57.5 ± 4.18 , 59.0 ± 3.16 , 82.0 ± 4.08 , 74.0 ± 5.16 과 59.0 ± 4.92 dB SPL이었으며, 소음 노출 14일 후에 측정한 청성뇌간반응의 역치상승은 각각 57.5 ± 4.18 , 59.0 ± 3.16 , 80.0 ± 0 , 74.0 ± 5.16 과 60.0 ± 4.08 dB SPL로 소음 노출 직후와 비교하여 청성뇌간반응 역치의 회복을 보이지 않았다(Fig. 2).

유모세포의 손상확인

소음 노출 후 일시적 역치상승과 시간의 경과에 따라 청력 역치의 회복을 보인 group 2에서는 소음 노출 14일 후에 대

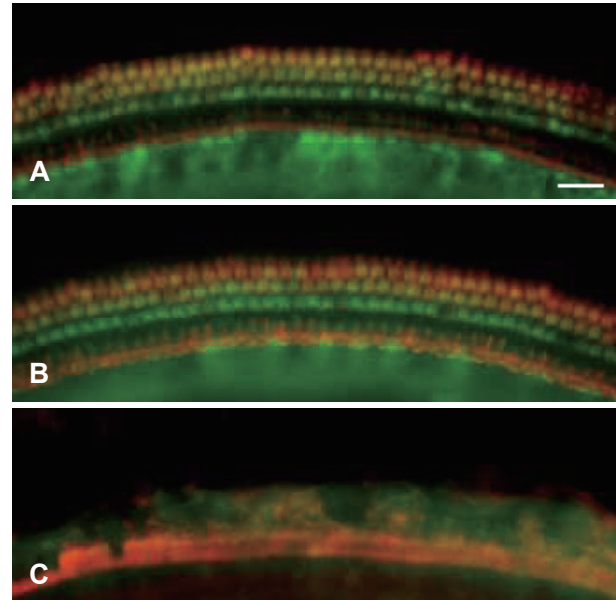


Fig. 3. Whole mount examinations of organ of Corti after noise exposure. Almost all loss of outer hair cells is presented in C. Control (A). 14 days after noise exposure in group 2 (B). 14 days after noise exposure in group 3 (C). Scale bar=30 μ m.

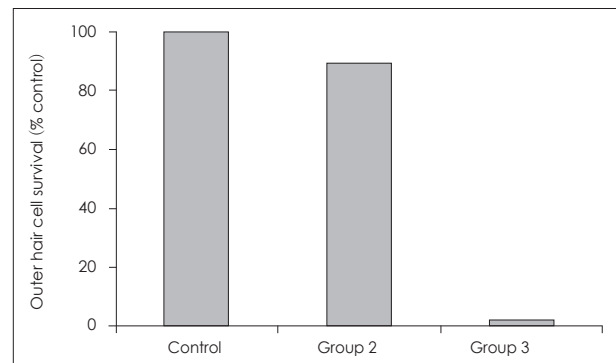


Fig. 4. Survival of outer hair cells after noise exposure. Almost all loss of outer hair cells is presented at 14 days after noise exposure in group 3.

조군에 비하여 일부 외유모세포의 손실을 관찰할 수 있었으나 그 정도가 미미하였고, 소음 노출 14일 후까지 청력역치의 회복을 보이지 않은 group 3에서는 광범위한 외유모세포의 손상을 관찰할 수 있었다(Figs. 3 and 4).

ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 면역조직화학염색

ET-1은 대조군에서 주로 와우 측벽의 혈관조와 나선인대, 그리고 나선신경절에서 주로 발현되었으며 소음 노출 이후 일시적 역치상승을 보인 group 2와 영구적 역치상승을 보인 group 3에서 주로 나선인대와 혈관조에서 대조군에 비하여 그 발현이 증가된 양상을 보였다(Fig. 5).

ETAR과 ETBR은 대조군에서 주로 와우 측벽의 혈관조

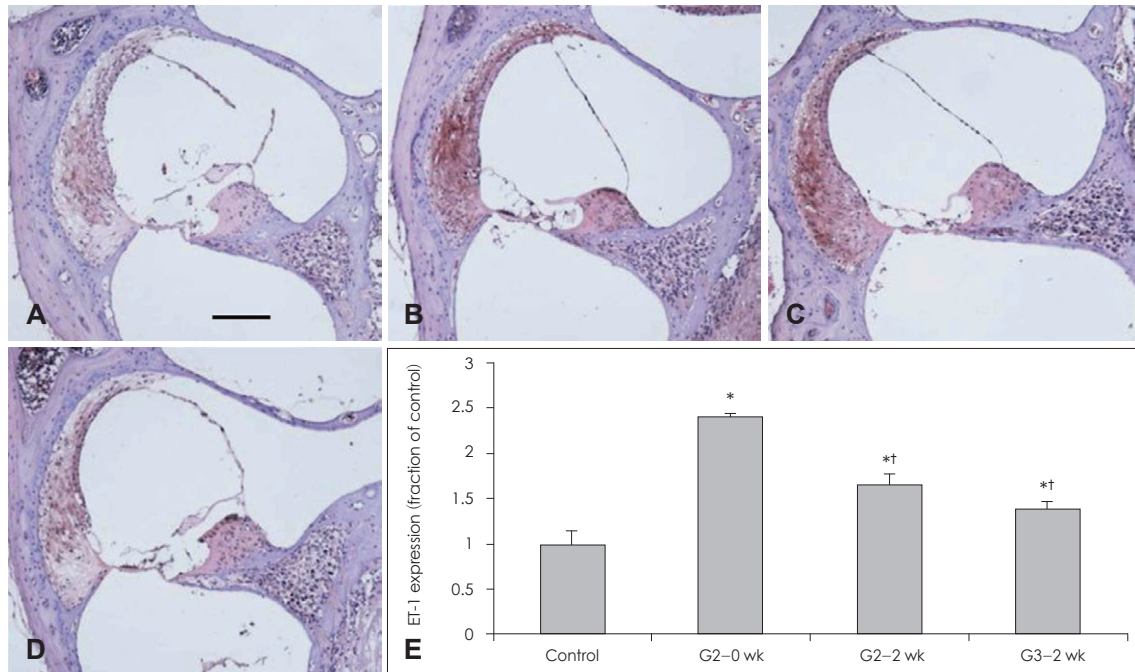


Fig. 5. Expression of ET-1 in the cochlea after noise exposure. Increased immunoreactivities are observed in stria vascularis and spiral ligament after noise exposure (B, C and D). ET-1 mRNA expression was increased in both group 2 and 3 after noise exposure (* $p < 0.05$ compared to control) but it decreased at 2 weeks after noise exposure in both group 2 and 3 (* $p < 0.05$ compared to G2-0 wk)(E). Control (A). Just after noise exposure in group 2 (B). 2 weeks after noise exposure in group 2 (C). 2 weeks after noise exposure in group 3 (D). ET-1 mRNA expression after noise exposure (E). G2: group 2, G3: group 3. Scale bar=250 μ m. ET-1: endothelin-1.

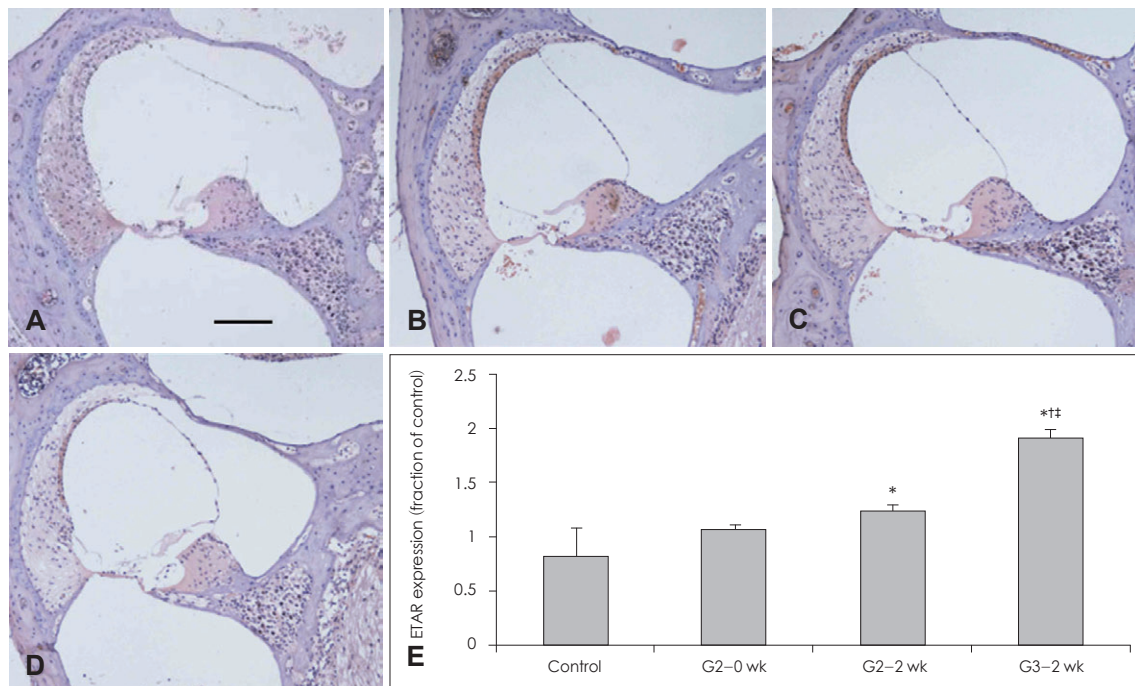


Fig. 6. Expression of ETAR in the cochlea after noise exposure. Increased immunoreactivities are observed in stria vascularis after noise exposure (B, C and D). ETAR mRNA expression is increased at 2 weeks after noise exposure in group 2 and group 3 (* $p < 0.05$ compared to control) and is higher at 2 weeks after noise exposure in group 3 (* $p < 0.05$ compared to G2-0 wk, † $p < 0.05$ compared to G2-2 wk)(E). Control (A). Just after noise exposure in group 2 (B). 2 weeks after noise exposure in group 2 (C). 2 weeks after noise exposure in group 3 (D). ETAR mRNA expression after noise exposure (E). G2: group 2, G3: group 3. Scale bar=250 μ m. ETAR: endothelin receptor A.

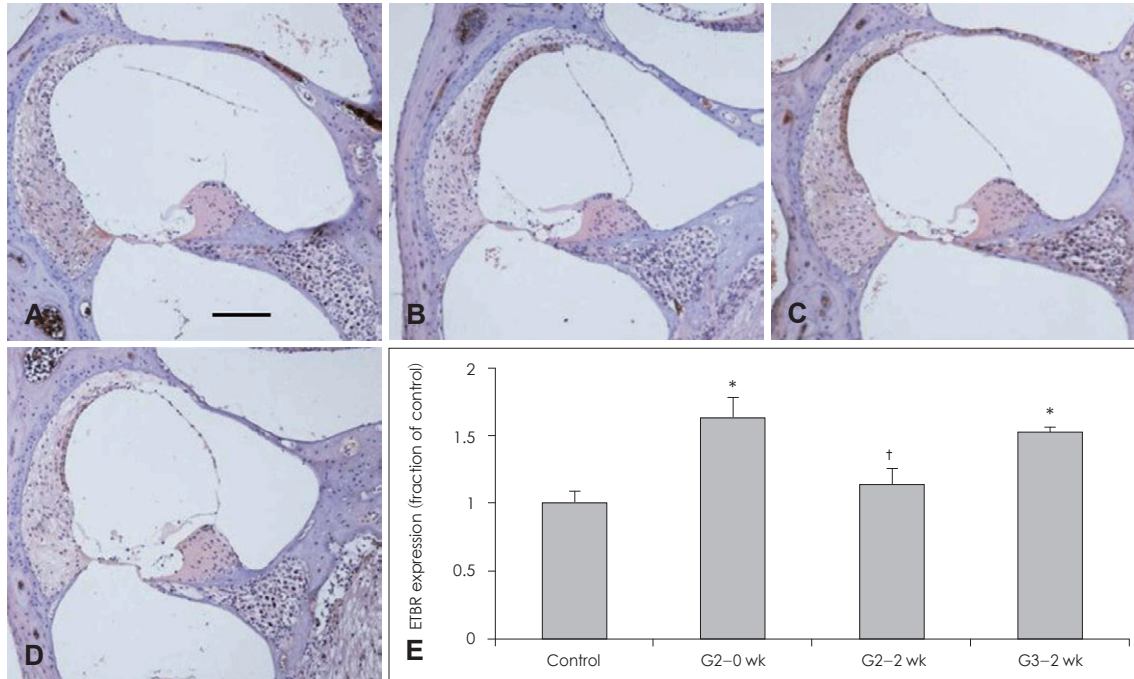


Fig. 7. Expression of ETBR in the cochlea after noise exposure. Increased immunoreactivities are observed in stria vascularis after noise exposure (B, C and D). ETBR mRNA expression is increased at just after noise exposure in group 2 and 2 weeks after noise exposure in group 3 (* $p < 0.05$ compared to control) but it decreased at 2 weeks after noise exposure in group 2 († $p < 0.05$ compared to G2-0 wk)(E). Control (A). Just after noise exposure in group 2 (B). 2 weeks after noise exposure in group 2 (C). 2 weeks after noise exposure in group 3 (D). ETBR mRNA expression after noise exposure (E). G2: group 2, G3: group 3. Scale bar=250 μ m. ETBR: endothelin receptor B.

와 나선인대, 그리고 나선신경절에서 발현되었으며 소음 노출 이후 혈관조에서 대조군에 비하여 그 발현이 증가된 양상을 보였다(Figs. 6 and 7).

가되어 있었다($p < 0.05$)(Fig. 7E).

고 찰

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

대조군과 소음 노출 후 역치상승을 보이는 실험군에서 각각 ET-1, ETAR 그리고 ETBR mRNA 발현의 정량적 분석을 위하여 시행한 역전사 중합효소 연쇄반응에서 ET-1 mRNA의 발현은 일시적 청력역치 상승을 보이는 group 2에서는 대조군에 비하여 소음 노출 이후 유의하게 증가되었으며 청력의 회복을 보이는 소음 노출 14일 후에는 그 발현 정도가 감소하는 양상을 보였다($p < 0.05$). 또한 영구적 청력역치 상승을 보이는 group 3에서는 대조군에 비하여 소음 노출 14일 이후에 유의하게 증가되어 있었으나 group 2의 소음 노출 직후에 비하여는 감소되어 있었다($p < 0.05$)(Fig. 5E).

ETAR mRNA의 발현은 group 2와 group 3에서 모두 소음 노출 14일 이후 유의하게 증가되어 있었으며 group 3에서 그 발현의 정도가 group 2에 비하여 증가되어 있었다($p < 0.05$)(Fig. 6E). ETBR mRNA의 발현은 group 2에서는 소음 노출 직후 유의하게 증가되었다가 청력의 회복을 보이는 소음 노출 14일 이후에는 감소되었고 group 3에서는 소음 노출 14일 이후에 증

소음의 노출은 와우의 기저막, 나선인대, 혈관조 등에서 혈관의 수축을 일으키고 이는 와우의 저산소증, 허혈, 산성화 등을 유발하며 활성산소(reactive oxygen species)의 생성을 유도하여 세포나 조직의 손상을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2,11)} 이와 관련하여 최근 소음 노출 이후에 와우내의 혈류변화와 활성산소 등에 대하여 다양하게 연구되고 있는데 Ohinata 등¹²⁾은 소음 노출 후에 와우내 자유 라디칼 생성이 증가하는 것을 관찰하여 활성산소의 생성과 와우의 혈류감소 사이의 연관성을 제시하였으며, 또한 Miller 등¹³⁾은 소음에 의한 와우손상의 동물실험 모델에서 8-iso-prostaglandin F가 내이의 혈류를 감소시키며 이것의 길항제를 이용하여 와우내 혈류감소를 억제할 수 있음을 보고하였다. 이와 같이 소음 노출 이후 와우내에 일부 혈관조절 인자들의 연관성이 제기되고 있지만¹⁴⁾ 이러한 일련의 과정에서 와우내 혈관수축 및 혈류변화의 기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다.

주로 혈관 내피세포에서 생성되는 endothelin은 강력한 혈관수축을 일으키는 물질로 주로 심혈관계 기관에서 그 작용

과 기전이 잘 알려져 있는데 약물에 반응하지 않는 고혈압이나 본태성 고혈압 환자, 폐동맥 고혈압 환자에서 ET-1이 증가되어 있으며 endothelin receptor의 선택적 길항제가 약물에 반응하지 않는 고혈압 환자나 폐동맥 고혈압 환자에서 혈압 강하에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.^{7,15)} 또한 endothelin은 심혈관계 기관 이외에도 기도 평활근 세포의 수축, 신장 사구체에서 전해질의 균형조절, 그리고 교감신경 말단에서 신경 전달물질의 조절에도 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾

내이에서는 endothelin이 와우내 혈관에 작용하는 역할에 대하여는 잘 알려져 있지 않으나 Franz 등¹⁷⁾은 ET-1을 쥐에 정맥주사 한 후 와우 정맥의 내경 감소를 관찰하였으며 Scherer 등¹⁸⁾이 ETAR의 길항제를 이용하여 와우측 나선동맥의 혈관 수축 정도에 차이가 있음을 실험적으로 관찰하였다. 또한 소음에 장기간 노출된 쥐의 혈청에서 endothelin 3이 증가되어 있었다는 연구와¹⁹⁾ 난청을 가지고 있는 환자에서 ET-1 유전자의 변이가 상대적으로 많이 관찰된다는 결과,²⁰⁾ 그리고 ETBR이 태생 후 청각의 발달에 역할을 한다는 연구가 있었으며²¹⁾ 난청을 보이는 Waardenburg 증후군의 동물모델에서 ETBR 유전자의 변이 관찰²²⁾ 등으로 미루어 보아 와우내 혈관 긴장도 조절 및 일련의 청각 항상성 유지과정에서도 endothelin과 그 수용체가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 실험적으로 소음 노출 후 일과성 및 영구적 청각 역치상승을 유도하고 청각 역치의 변화 및 회복에 따른 ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 발현 양상을 관찰하고자 하였다. 그 결과로 ET-1의 발현은 일과성 청각 역치상승의 모델인 group 2에서 소음 노출 직후 유의하게 증가되었으며 청각 역치가 회복된 소음 노출 2주 뒤에도 대조군에 비하여 증가되어 있었으나 소음 노출 직후에 비교해서는 감소되는 양상을 보였다. 또한 영구적 청각 역치상승 모델인 group 3에서는 소음 노출 2주 뒤에 대조군에 비하여 증가되었으나 group 2의 소음 노출 직후에 비하여는 감소되었다. 그리고 ETAR의 발현은 소음 노출 2주 뒤에 group 2와 group 3에서 대조군에 비하여 증가되어 있었고 특히 group 3에서 상대적으로 많이 증가되어 있었는데 이러한 결과는 소음 노출로 인하여 ET-1의 발현이 증가하고 ET-1과 ETAR이 작용하여 와우내 혈관의 수축을 유발하여 청각 역치의 상승에 관여하지 않았을까 생각되었다. ETBR의 발현은 group 2에서는 소음 노출 직후에 증가하였다가 2주 뒤에 감소되었고 group 3에서는 소음 노출 2주 뒤에 대조군에 비하여 증가되어 있었는데 이러한 결과는 자세한 작용기전을 알 수는 없으나 혈관 수축과 동시에 소음에 의한 와우내 조직손상의 보상 기전으로 혈관의 확장을 유도하기 위한 발현이 아닐까 생각되었고 이러한 발현변화가 청각 역치의 회복과 관계가 있지 않을까 생각되었다.

이와 같이 ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 작용기전을 이용하여 최근에 폐동맥 고혈압, 심부전, 뇌졸중, Alzheimer병 등 다양한 혈관질환에 endothelin 수용체의 길항제를 이용한 치료들이 시도되었고^{7,23-25)} 특히 청각에 대하여는 ET-1의 혈관 수축작용을 억제하는 Rho-kinase inhibitor와 cAMP modulator 등의 물질이 허혈성 혈관질환이나 돌발성 난청의 치료에 적용될 가능성이 제시되고 있다.¹⁸⁾

본 연구에서는 소음 노출 후 와우내 혈류변화를 직접적으로 측정하지는 못하였지만 소음 노출 후 일과성 청각 역치상승의 모델과 영구적 청각 역치상승의 모델에서 시간의 경과와 청각 역치회복에 따라 ET-1, ETAR, 그리고 ETBR의 발현양상 변화를 관찰하여 소음 노출에 의한 청각의 역치변동에 ET-1, ETAR과 ETBR의 발현변화가 관여하는 것으로 생각되며 이러한 변화는 와우내 항상성 유지 혹은 대사변화에 관여하지 않을까 생각되었다. 또한 이러한 변화의 결과로 그 기능을 억제 혹은 조절하는 물질을 이용하여 와우내 혈류장으로 인하여 발생할 수 있는 질환의 예방 혹은 치료적 가능성을 생각해 볼 수 있었다.

Acknowledgments

This work was supported by Chungnam National University School of Medicine Research Fund 2011.

REFERENCES

- 1) Lamm K, Arnold W. Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol Neurotol* 1996;1(3):148-60.
- 2) Fechter LD. Oxidative stress: a potential basis for potentiation of noise-induced hearing loss. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;19(3):543-6.
- 3) Quirk WS, Seidman MD. Cochlear vascular changes in response to loud noise. *Am J Otol* 1995;16(3):322-5.
- 4) Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4(3):339-52.
- 5) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332(6163):411-5.
- 6) Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46(3):325-415.
- 7) Ohkita M, Tawa M, Kitada K, Matsumura Y. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci* 2012;119(4):302-13.
- 8) Luo Y, Tang Y, Xia Q, Liu J. The expression of endothelin type A and B receptors in the lateral wall of the mouse cochlea. *Cell Mol Biol Lett* 2007;12(4):595-603.
- 9) Liu T, Long L, Tang T, Xia Q, Liu J, He G, et al. Expression and localization of endothelin-1 and its receptors in the spiral ganglion neurons of mouse. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(5):739-45.
- 10) Xu DY, Wu B, Li ZQ, Wang QP, Zhang Y, Xue F, et al. Expression of endothelin receptor subtypes in the spiral ganglion neurons of the guinea pig. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010;74(2):164-7.
- 11) Okamoto A, Hasegawa M, Tamura T, Homma T, Komatsuzaki A.

- Effects of frequency and intensity of sound on cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1992;112(1):59-64.
- 12) Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, Schacht J. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res* 2000;878(1-2):163-73.
 - 13) Miller JM, Brown JN, Schacht J. 8-iso-prostaglandin F(2alpha), a product of noise exposure, reduces inner ear blood flow. *Audiol Neurotol* 2003;8(4):207-21.
 - 14) Selivanova O, Heinrich UR, Brieger J, Feltens R, Mann W. Fast alterations of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and that of its receptors (Flt-1, Flk-1 and Neuropilin) in the cochlea of guinea pigs after moderate noise exposure. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264(2):121-8.
 - 15) Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary artery hypertension. *Life Sci* 2012;91(13-14):517-21.
 - 16) Hyndman KA, Pollock JS. Nitric oxide and the A and B of endothelin of sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013;22(1):26-31.
 - 17) Franz P, Aharinejad S, Miksovsky A, Schraufnagel DE, Larson EK, Marks SC Jr. Endothelin-1 causes luminal constrictions in rat cochlear veins. *Hear Res* 1997;112(1-2):33-43.
 - 18) Scherer EQ, Herzog M, Wangemann P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by rho-kinase-induced Ca(2+) sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. *Stroke* 2002;33(12):2965-71.
 - 19) Quirk WS, Coleman JK, Hanesworth JM, Harding JW, Wright JW. Noise-induced elevations of plasma endothelin (ET-3). *Hear Res* 1994;80(1):119-22.
 - 20) Uchida Y, Sugiura S, Nakashima T, Ando F, Shimokata H. Endothelin-1 gene polymorphism and hearing impairment in elderly Japanese. *Laryngoscope* 2009;119(5):938-43.
 - 21) Ida-Eto M, Ohgami N, Iida M, Yajima I, Kumasaka MY, Takaiwa K, et al. Partial requirement of endothelin receptor B in spiral ganglion neurons for postnatal development of hearing. *J Biol Chem* 2011;286(34):29621-6.
 - 22) Matsushima Y, Shinkai Y, Kobayashi Y, Sakamoto M, Kunieda T, Tachibana M. A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mamm Genome* 2002;13(1):30-5.
 - 23) Meyers KE, Sethna C. Endothelin antagonists in hypertension and kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2013;28(5):711-20.
 - 24) Kohan DE, Cleland JG, Rubin LJ, Theodorescu D, Barton M. Clinical trials with endothelin receptor antagonists: what went wrong and where can we improve? *Life Sci* 2012;91(13-14):528-39.
 - 25) Pacheco-Quinto J, Herdt A, Eckman CB, Eckman EA. Endothelin-converting enzymes and related metalloproteases in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013;33 Suppl 1:S101-10.