

# The Protective Effect of Epigallocatechin-3-Gallate Against Gentamicin Vestibular Ototoxicity in Type I Vestibular Hair Cell of Guinea Pig

Young-Ho Choi<sup>1</sup>, Sung-Su Lee<sup>1</sup>, Seok-Jin Moon<sup>1,2</sup>, Byung-Hyun Ahn<sup>1</sup>, Nam-Guk Kim<sup>3</sup>, Han-Seong Jeong<sup>4</sup>, Jong-Seong Park<sup>4</sup>, Hyong-Ho Cho<sup>1</sup>, and Yong-Beom Cho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju; and <sup>2</sup>ENTOP ENT Clinics, Gwangju; and <sup>3</sup>Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kwangju Christian Hospital, Gwangju; and <sup>4</sup>Department of Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

기니픽 제1형 전정유모세포에서 젠타마이신에 의해 유발되는 전정독성에 대한 Epigallocatechin-3-Gallate의 보호 효과

최영호<sup>1</sup> · 이성수<sup>1</sup> · 문석진<sup>1,2</sup> · 안병현<sup>1</sup> · 김남국<sup>3</sup> · 정한성<sup>4</sup> · 박종성<sup>4</sup> · 조형호<sup>1</sup> · 조용범<sup>1</sup>

전남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,<sup>1</sup> ENTOP 이비인후과,<sup>2</sup> 광주기독병원 이비인후-두경부외과,<sup>3</sup> 전남대학교 의과대학 생리학교실<sup>4</sup>

Received October 2, 2013  
 Revised November 6, 2013  
 Accepted November 7, 2013  
 Address for correspondence  
 Yong-Beom Cho, MD, PhD  
 Department of Otolaryngology-  
 Head and Neck Surgery,  
 Chonnam National University  
 Medical School,  
 42 Jebong-ro, Dong-gu,  
 Gwangju 501-757, Korea  
 Tel +82-62-220-6776  
 Fax +82-62-228-7743  
 E-mail choyb@chonnam.ac.kr

**Background and Objectives** Gentamicin (GM) is well known for its vestibulotoxicity. There have been many reports about vestibulotoxicity, however, its mechanism is still unclear. So far, it is known that GM affects the voltage-dependent  $K^+$  current and nitric oxide (NO) production. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the major component of green tea and is known to have anti-oxidative and anti-toxic effect. This study was undertaken to investigate the protective effect of EGCG against gentamicin on vestibular hair cell (VHC).

**Materials and Method** White guinea pigs (200–250 g) were rapidly decapitated and the temporal bones were immediately removed. Under a dissecting microscope, the crista ampullaris was obtained. The dissociated VHCs were transferred into a recording chamber mounted onto an inverted microscope. Whole-cell membrane currents and potentials were recorded using standard patch-clamp techniques. In addition, measurements of NO production were obtained using the NO-sensitive dye, 4,5-diamino-fluorescein diacetate (DAF-2DA).

**Results** Type I VHCs Voltage-dependent  $K^+$  current was activated from low depolarizing stimulation. As the stimulation increased, higher current was detected. Voltage-dependent  $K^+$  current in type I VHCs was decreased when GM (200  $\mu$ M) was administrated and GM effects of  $K^+$  current inhibition was significantly blocked by EGCG. Extracellular GM induced an increase in DAF-2DA fluorescence, which thus indicates NO production in VHCs. Also, the GM-induced NO production was inhibited by EGCG.

**Conclusion** GM inhibits voltage-dependent  $K^+$  current by releasing NO in isolated type I VHCs. EGCG blocks this inhibitory effects, suggesting a protective role on GM vestibulotoxicity.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2014;57(4):226-32

**Key Words** Epigallocatechin-3-gallate · Gentamicin · Vestibular hair cell · Vestibular toxicity.

## 서론

이독성 약물 중에서 가장 많이 알려진 아미노글리코사이드

(aminoglycoside)계 항생제는 1940년 스트렙토마이신(streptomycin)이 결핵 치료제로 사용된 이래로 가나마이신(kanamycin), 젠타마이신(gentamicin), 네오마이신(neomycin), 아미카

신(amikacin) 등의 여러 종류가 개발되어 사용되고 있다. 이 중에서 젠타마이신(gentamicin)은 와우 독성보다는 전정 독성을 가지고 있고 전정독성은 약 9~15%에서 발생하고<sup>1)</sup> 주로 감각유모세포를 침범하고 전정신경이나 전정핵의 변화는 유모세포의 손상에 의한 이차적인 것으로 알려져 있으며, 전정기관의 손상은 처음에 반고리관의 팽대부릉의 중앙부위에서 발생하고 제1형 전정유모세포가 제2형 전정유모세포보다 더 쉽게 손상을 받는다는 것으로 알려져 있고,<sup>2)</sup> 최근에는 젠타마이신의 이러한 전정 독성을 이용하여 중이강내의 주입을 통한 메니에르병(Meniere disease)의 치료에도 이용되고 있다.

아미노글리코사이드의 이독성에 대해서는 여러 기전이 제시되었는데 미토콘드리아 리보솜(mitochondria ribosome)에 작용하여 미토콘드리아의 단백질합성을 파괴시킨다는 보고가 있으며<sup>3)</sup> 아미노글리코사이드가 철과 결합 후 산화복합체를 형성하여 유리기(free radical) 생성을 촉진시켜 세포손상을 일으킨다는 연구도 있다.<sup>4)</sup> 그 외에도 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통한 세포흥분독성(excitotoxicity)이 주 기전이라는 주장도 있다.<sup>5,6)</sup> 이러한 여러 가지 가설 이외에도 최근 아미노글리코사이드가 glutamate receptor의 NMDA 아류형(subtype)에 길항제(antagonist)로 작용하고<sup>7)</sup> glutamate가 전정유모세포에서 산화질소 생성을 증가시킨다는 등의 많은 연구가 있다.

반면에 아미노글리코사이드의 전정독성에 대한 전기생리학적인 연구는 전정기관이 해부학적으로 접근이 어렵고 전정유모세포의 분리가 어려우며 크기가 작고 다루기가 어려워 많지 않은 실정이다. Chen과 Eatock<sup>8)</sup>가 산화질소(nitric oxide, NO)의 제공물질이 제1형 전정유모세포에서 포타슘 전류를 억제함을 보고했지만, 제1형 전정유모세포에서 젠타마이신의 효과에 대해서는 거의 보고된 바가 없다.

Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 녹차의 추출물 성분 중의 하나로 유리기 제거(free radical scavenging) 효과, 해독을 촉진시키는 효과 등이 있다고 알려져 있다.<sup>9)</sup> 산화질소는 여러 조직에서 신경전달물질의 역할을 하면서, 혈관긴장도를 조절하고 내림프와 이온의 항상성을 유지하는 데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 산화질소는 L-arginine으로부터 형성되고 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)를 생성하는 NO/cGMP 경로에 의하여 산화질소의 생리학적 역할이 이루어진다. 내이에서의 NO/cGMP 경로는 와우와 전정기에서 모두 보고되고 있으며, 와우에서의 산화질소는 와우 혈류량을 조절할 뿐 아니라, 유모세포와 구심성 신경 간에 작용하여 NMDA 수용체를 통한 신경 전달 물질로서의 역할을 하게 된다. 또한, 산화질소는 정상 상태에서 생리학적인 역할을 하는 것 외에, 병적인 상태에서 세포 독성을 일으키는 데 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 예로 이

독성 약물을 주입하나 내림프수종을 만들었을 때 산화질소의 양이 증가하여, 세포 파괴의 역할을 하는 것으로 보고되고 있는데 이러한 산화질소에 의한 세포 독성의 과정은 NMDA 수용체의 과자극에 의하거나, 산화질소의 증가로 인한 유리기의 증가로 peroxynitrite의 양이 증가하여 세포 파괴를 일으킨다고 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 기니픽의 전정유모세포를 분리하여 젠타마이신이 전압의존성 포타슘의 전류와 이독성의 원인이 된다고 알려진 산화질소의 생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보고 이러한 변화에 대해 EGCG가 젠타마이신에 의해 유발된 전정 유모세포에 대한 이독성에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 전정유모세포의 분리

200~250 g의 백색기니픽의 복강에 50 mg/kg의 sodium pentobarbital을 주사하여 마취시키고 양측의 측두골을 얻은 후 즉시 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS: 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.55 mM glucose, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136.9 mM NaCl, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.4 mM KCl, 5.0 mM [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)(HEPES)], 300 mOsm, pH 7.4) 내에서 와우 골포(bulla)를 제거하고 박리하여 팽대부릉(crista ampulla)을 채취한 후 0.25 mg/mL collagenase(type IV, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 약 20분간 처치하였다. 다시 효소가 없는 HBSS에 옮겨 micropipette으로 부드럽게 분리하여 제1형과 제2형으로 구별하였다.

### 용액의 조성 및 시약

포타슘 전류를 기록하고 산화질소의 imaging을 위한 세포 외 용액(단위; mM)은 3 KCl, 140 Choline-Cl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 30 Glucose, pH 7.4로 하였고, 세포내 용액(단위; mM)은 140 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 EGTA[ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid], 2 Mg-ATP이며 pH는 7.3으로 하였다.

세포에 대한 약물 투여는 중력을 이용한 관류장치를 이용하여 용기내 용액을 순환시켰고 본 실험에서 사용한 모든 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

### 이온전류의 기록

물리적 분리가 끝난 세포들을 역상 도립현미경(inverted microscope) 위의 용기에 옮기고 세포들이 바닥에 가라 앉은 후 Whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 포타슘 전류를 기

록하였다. 기록용 전극은 미세 유리 전극 제조기(Narishige, Tokyo, Japan)와 microforge(Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 저항이 3~5메가옴(MΩ)이 되도록 제작하였다. 막전압 고정과 전류의 측정은 Axopatch 200B patch clamp amplifier (Axon, Foster City, CA, USA)를 이용하여 Digidata 1200B (Axon, Foster City, CA, USA) interface를 통해 컴퓨터와 연결하였다. 막전압 조절과 실험결과 얻어진 포타슘 전류의 기록 및 자료 분석은 pClamp 7.0 software(Axon, Union City, CA, USA)를 사용하였으며, oscilloscope를 사용하여 전류의 변화를 동시에 관찰하였다.

### 산화질소의 측정

분리된 전정유모세포를 산화질소의 형광 표지자인 10 μM의 4,5-diamino-fluorescein diacetate(DAF-2DA)를 HBSS 용액에 첨가하여 50분 동안 암 실험실에서 배양하였다. 이 세포를 형광현미경으로 관찰하였고 현미경에 연결된 charge coupled device camera를 통해 얻은 영상을 분석하였다.

### 실험결과 분석

기록된 자료는 pClamp 7.0 및 Microcal Origin 4.1(Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) 프로그램으로 분석하였다. 실험측정치는 Student's t-test로 통계학적 분석을 시행하고  $p < 0.05$ 를 유의성의 기준으로 삼았으며, 평균 ± 표준오차(standard error)의 범위를 표시하였다.

## 결 과

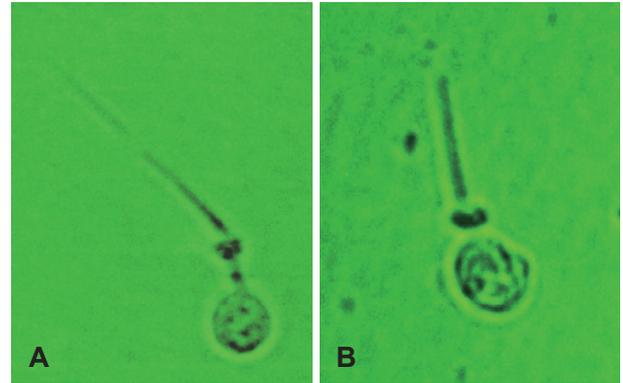
### 전정유모세포

일부 세포들은 전체적으로 길쭉한 호리병 모양을 하고 있으며 기저부위는 원모양을 하고 좁은 목부위가 존재하였다. 말단부위는 cuticular plate가 hair bundle이 부착되어 있었다(Fig. 1A). 이러한 세포들은 제1형 전정유모세포로 지름이 약 7.3~13.0 μm이며 길이는 약 14.8~22.5 μm였다. 제2형 전정유모세포는 목이 없는 약간 거친 원모양으로 역시 hair bundle을 가지고 있었다(Fig. 1B). 길이는 약 8~17.5 μm이며 지름은 약 7.3~13.8 μm였다. 전정유모세포 중에서 세포막이 매끄러우며 미세전극으로 접근하기 쉬운 제1형 전정유모세포를 대상으로 실험하였다.

### 포타슘 전류의 측정

#### 제1형 전정유모세포에서의 포타슘 전류

전정유모세포들의 막전압(membrane capacitance)은 평균



**Fig. 1.** Characteristics of isolated vestibular hair cells. Type I vestibular hair cell is flask shaped and has an elongated cell body consisting of a round basal portion and a neck of variable length ( $\times 200$ ) (A). Type II vestibular hair cell appears roughly round with a neck and the location of circular nucleus is in the center of the cell body ( $\times 200$ )(B).

9.8~14.2 pF였으며 비교적 적은 편이었다. 유지전압(holding potential)을 -70 mV로 고정하여 20 mV 간격으로 -120 mV에서 +20 mV까지 단계적으로 탈분극 자극을 매 10초마다 400 msec 동안 가했을 때, 전압의존성 전류가 관찰되었으며 +20 mV의 탈분극 전압에 대해  $3365 \pm 185$  pA(n=10)의 전류를 나타내었다(data not shown).

### 젠타마이신이 제1형 전정유모세포의 포타슘 전류에 미치는 영향

-120 mV에서 +20 mV까지의 탈분극 자극을 매 10초마다 준 후에 전정유모세포의 전압의존성 포타슘 전류를 기록하였고, 젠타마이신을 투여한 후 전압의존성 포타슘 전류를 기록하였다. 사용한 젠타마이신의 농도는 아미노글리코사이드 항생제의 이독성 연구에서 사용된 다양한 농도 중에서 Masuko 등<sup>10)</sup>의 연구에서 사용된 농도인 200 μM을 사용하였다. 젠타마이신을 투여한 후에는 전압의존성 포타슘 전류가 평균  $3365 \pm 185$  pA에서  $2791 \pm 169$  pA(n=10)로 감소하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

### 젠타마이신과 EGCG를 같이 투여할 경우 전정유모세포의 전압의존성 포타슘 전류

젠타마이신 200 μM과 EGCG 200 μM을 같이 투여했을 때는 전압의존성 포타슘 전류가 평균  $3411 \pm 176$  pA로 정상인 대조군과 의미있는 비슷한 반응을 나타내었다( $p > 0.05$ )(Fig. 3).

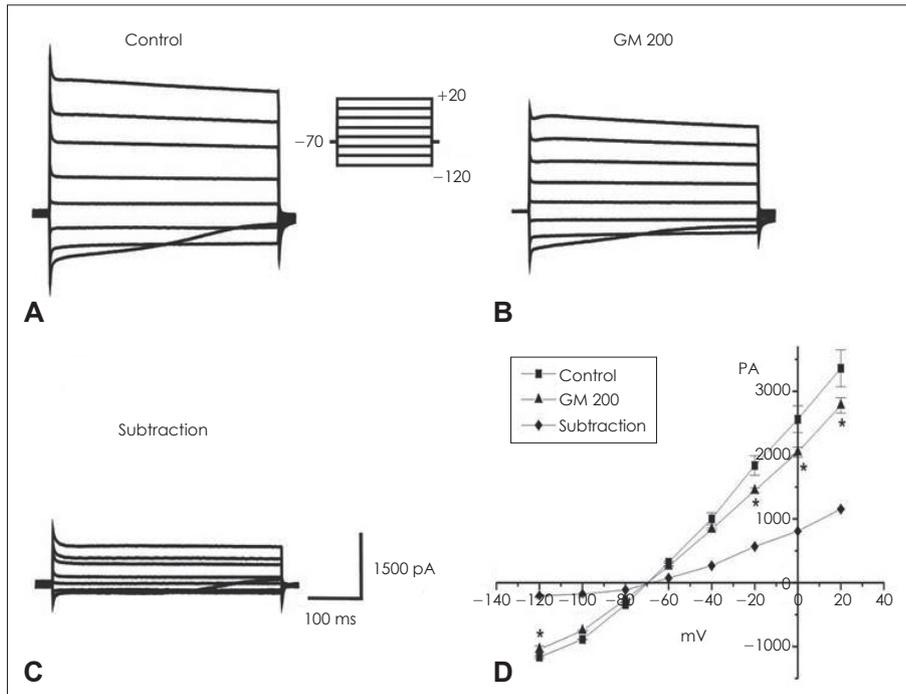
### 산화질소의 영상(Imaging)

젠타마이신 투여시 산화 질소의 형광 강도는 투여 직후 증가되었다가 시간이 흘러가면서 점점 약화되었다. EGCG 5 μM, 100 μM, 200 μM에 젠타마이신 1 mM을 같이 투여했을 때는

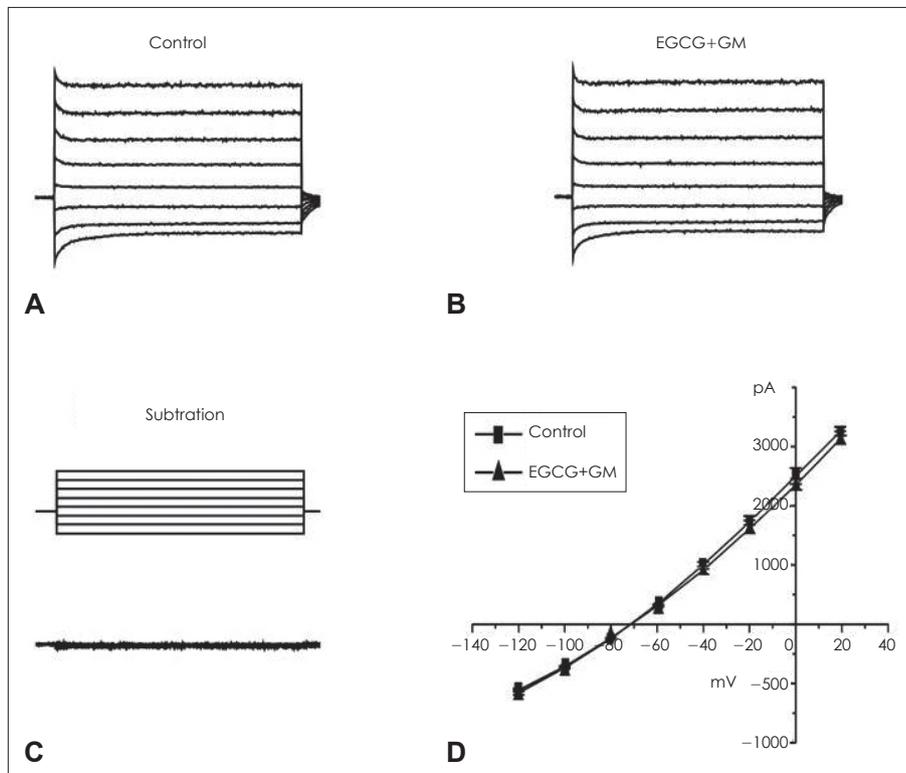
같은 시간대에 젠타마이신만 투여한 군에 비해 유의하게 산화 질소의 형광 강도가 더 감소하였다(Fig. 4). 또한 각각의 농도 군 간에도 유의한 차이를 보여 농도-의존성의 특성도 확인되었다(Fig. 5).

## 고찰

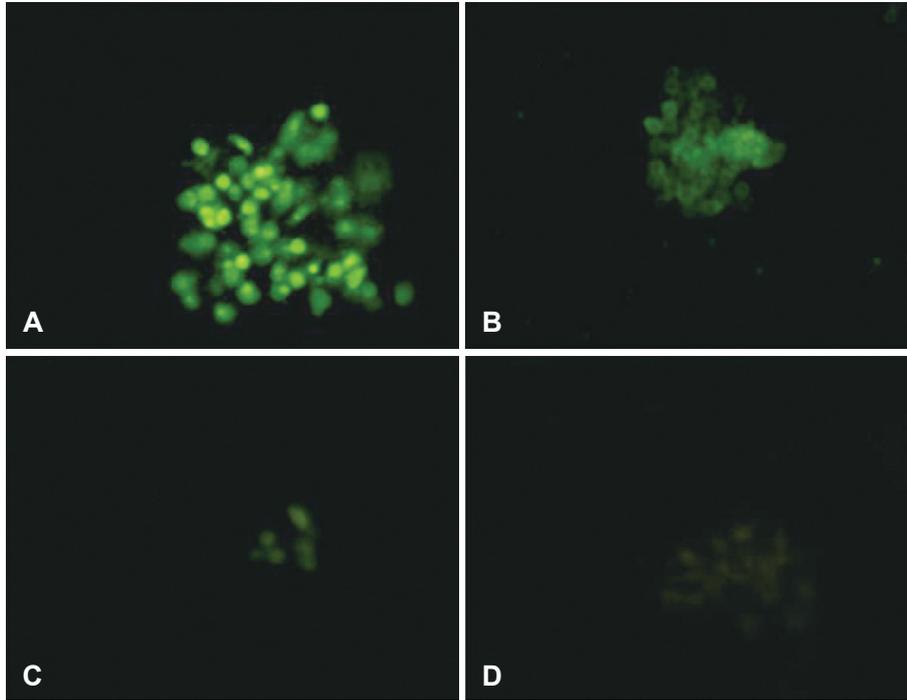
아미노글리코사이드(aminoglycoside)계 항생제의 종류에 따라 와우 또는 전정에 더 심한 독성을 나타내는데 가나마이신(kanamycin), 아미카신(amikacin) 등은 와우에 더 심한 독



**Fig. 2.** Current-voltage relationship for potassium currents after application of 200 μM gentamicin. Control currents (A), currents after application of 200 μM gentamicin (B), subtraction between currents of control and gentamicin application (C), current-voltage curve (asterisk indicates the portion of statistical significance.  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ , mean  $\pm$  SE)(D). GM: gentamicin, SE: standard error.



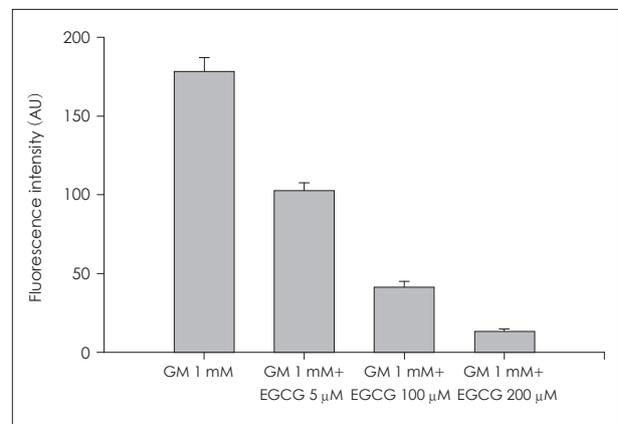
**Fig. 3.** Current-voltage relationship for potassium currents after application of 200 μM GM and EGCG. Control currents (A), currents after application of 200 μM gentamicin and EGCG (B), subtraction between currents of control and currents of gentamicin and EGCG application (C), current-voltage curve ( $n = 7$ , mean  $\pm$  SE,  $p > 0.05$ )(D). GM: gentamicin, EGCG: epigallocatechin-3-gallate, SE: standard error.



**Fig. 4.** Dark field fluorescent image of type I vestibular hair cell. Loaded with DAF-2DA after application of gentamicin 1 mM (A). After applying gentamicin 1 mM and EGCG 5 μM, the fluorescence intensity is decreased compared with gentamicin only (B). The fluorescence intensity is more decreased after applying gentamicin 1 mM and EGCG 100 μM (C). The fluorescence intensity is most weakly expressed with applying gentamicin 1 mM and EGCG 200 μM (D). DAF-2DA: 4,5-diamino-fluorescein diacetate, EGCG: epigallocatechin-3-gallate.

성을 초래하고 스트렙토마이신(streptomycin)과 젠타마이신(gentamicin)은 전정에 더 심한 독성을 초래하는 것으로 보고되고 있다.<sup>1,2)</sup> 이러한 스트렙토마이신과 젠타마이신의 특성을 이용하여 전정기 유모세포를 파괴하여 어지럼증을 치료하려는 시도가 있었다. Fowler<sup>11)</sup>는 스트렙토마이신을 근육주사하였으며 1957년 Schuknecht<sup>12)</sup> 및 Chung 등<sup>13)</sup>은 편측성 메니에르병의 치료에 스트렙토마이신을 중이강내에 주입하여 어지럼증의 치료에 이용하였지만 청력이 감소되는 결과를 초래하였다. 한편, 젠타마이신(gentamicin)은 와우독성보다는 전정독성을 가지고 있고 전정독성은 약 9~15%에서 발생하고<sup>1)</sup> 주로 감각유모세포를 침범하고 전정신경이나 전정핵의 변화는 유모세포 손상의 이차적인 것으로 알려져 있으며, 전정기관의 손상은 처음에 반고리관의 팽대부릉 중상부위에서 발생하고 제1형 전정유모세포가 제2형 전정유모세포보다 더 쉽게 손상 받는다고 알려져 있다.<sup>2)</sup> 따라서 중이강내 주입을 통한 메니에르병(Meniere disease) 치료에도 이용되고 있으며 젠타마이신의 중이강내 주입은 90% 이상의 환자에서 어지럼증의 조절이 가능하였으며 비교적 낮은 비율의 청력감소가 보고되고 있으며<sup>14)</sup> 국내에서도 조절되지 않는 메니에르병 환자에서 젠타마이신 중이강내 주입의 효과가 보고된 바 있다.<sup>15)</sup>

내이는 해부학적으로 복잡하고 아주 미세한 구조물로 되어 있기 때문에 내이 유모세포에 대한 형태학적 또는 전기 생리학적인 연구에 어려움이 있었으며, 1953년 처음으로 Katsuki와 Covell<sup>16)</sup>이 코르티기관의 물리적인 분리를 성공한 이래 이전의 많은 연구들이 포유류의 와우 유모세포들에 대한 것이었



**Fig. 5.** Comparison of the fluorescence intensity demonstrating that the intensity is markedly decreased after applying EGCG in dose dependent manner (n=15). AU: Arbitrary unit, GM: gentamicin, EGCG: epigallocatechin-3-gallate.

다. 상대적으로 전정기관은 단단한 골조직으로 둘러싸여 있고 분리하기가 어려우며 크기가 와우세포보다 4~5배 작기 때문에 전정유모세포에 대해서는 많은 연구 보고가 없었는데 Wersall<sup>17)</sup>은 기니픽의 전정유모세포를 분리하고 그 모양에 따라 제1형과 제2형으로 분류하였다. 아미노글리코사이드계 항생제에 의한 전정독성은 팽대부릉정의 중간 부분에서 먼저 일어나며 제1형 전정유모세포가 제2형 전정유모세포보다 먼저 손상을 받는다는 연구보고가 있으며,<sup>2)</sup> 본 연구에서는 제1형 전정유모세포를 이용하여 실험하였다.

아미노글리코사이드의 전정독성의 기전에 대해 여러 가설들이 알려져 있지만<sup>3-7)</sup> 이 중에 많은 연구자들이 세포흥분독성

(excitotoxicity)에 대한 연구 보고를 하고 있다.<sup>6,7)</sup> Basile 등<sup>6)</sup>은 아미노글리코사이드가 NMDA 수용체에 길항제로 작용을 하고 Takumida와 Anniko<sup>18)</sup>는 아미노글리코사이드에 의해 생성된 산화질소가 전정세포 내에서 전정독성을 유발시키는 것이 보였다. Nitrous oxide systems(NOS)에 의해 생산되는 산화질소는 신경전달을 조절하고 혈관의 긴장도를 조절하는 중요한 역할을 하며 다른 기관에서와 마찬가지로 내이의 와우와 전정기관에서 산화질소는 혈류를 조절하는 역할을 한다. NOS type I은 신경에, NOS type III는 혈관의 내피세포에 항상 존재하는 구조적인 NOS로 생리작용을 조절하지만 NOS type II는 다른 특별한 자극이 있을 때만 생성되며 일단 생성되면 많은 양의 산화 질소가 만들어지고 세포에 독성을 나타내게 된다. Takumida와 Anniko<sup>19)</sup>는 병적인 상태에서 구조적인 형태의 NOS(type I, III)로부터 만들어지는 산화질소는 초기의 이독성에 관여하고, NOS II에 의해 만들어지는 산화질소는 후기의 이독성의 원인이 된다고 생각하였다.

EGCG는 epicatechin(EC), epicatechin 3-gallate(EGC), gallicocatechin 3-gallate(GCG) 등과 함께 녹차의 주요 성분 중의 하나로 약성종양의 성장과 전이를 억제하며<sup>20)</sup> 발암 물질의 발현 억제에 효과가 있으며<sup>21)</sup> 허혈성 뇌손상에 보호 효과가 있고 심혈관 질환의 위험성은 낮추는 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 효과의 기전은 정확히는 밝혀져 있지 않지만 EGCG의 항산화 효과와 많은 연관이 있을 것으로 생각하고 있다. Nagai 등<sup>22)</sup>은 rat의 뇌에서 EGCG가 산화질소에 의한 신경손상을 억제하는 것을 밝혔으며 Nakagawa와 Yokozawa<sup>9)</sup>는 EGCG가 직접 nitric oxide synthase를 억제할 뿐 아니라 nitric oxide, peroxynitrite를 제거(scavenging)하는 것을 증명하였다. 본 연구에서는 아미노글리코사이드의 전정 독성이 산화질소와 깊은 관련이 있고 EGCG가 강력한 항산화 효과가 있다고 알려져 있어 아미노글리코사이드의 전정독성에 미치는 EGCG의 영향에 대해 알아보았다.

아미노글리코사이드의 전정독성에 대한 전기생리학적 연구는 전정기관이 해부학적으로 접근이 어렵고 전정유모세포의 분리가 어려우며 크기가 작고 다루기가 어렵기 때문에 많지 않은 실정이다. 본 연구에서 포타슘 전류를 측정하는 전기생리학적 기법을 이용하여 젠타마이신을 투여했을 때 전압의존성 포타슘 전류가 유의있게 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 Chen과 Eatock<sup>8)</sup>이 발표한 산화질소 생성물에 의해 포타슘 전류가 억제되는 것과 결과가 일치하였다. 이러한 젠타마이신에 의한 포타슘 전류의 억제효과는 EGCG를 투여하였을 때는 차단되었다. 또한 전정유모세포내의 산화질소 농도를 형광 현미경을 이용하여 측정하였을 때 Takumida와 Anniko<sup>19)</sup>의 연구결과처럼 젠타마이신은 전정유모세포에서 산화

질소의 생성을 증가시켰고 EGCG를 같이 투여하였을 때는 산화질소의 생성이 유의있게 감소하는 것으로 보아 EGCG가 산화질소의 생성을 직접적으로 차단하는 것으로 사료된다. 이것은 Takumida와 Anniko<sup>23)</sup>가 NOS의 억제제인 N-nitro-L-arginine methylester(L-NAME)가 젠타마이신에 의한 이독성을 차단한 실험결과와 일치하였다. 젠타마이신에 의한 전정독성은 산화 질소와 밀접한 연관이 있고 이러한 산화질소의 생성이 EGCG에 의해 직접 차단될 뿐 아니라 산화질소와 연관되어 생성되는 산소유리기(free oxygen radical)를 EGCG가 제거하기 때문에 EGCG가 젠타마이신에 의한 전정독성을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

요컨대, 본 연구에서는 젠타마이신 항생제가 기니픽 제1형 전정유모세포에 나타내는 독성에 대한 EGCG의 보호효과를 알아보았다. 전압고정법을 이용한 whole-cell configuration patch clamp와 산화질소 영상을 이용하여 젠타마이신은 제1형 전정유모세포에서 전압의존성 포타슘 전류를 감소시켰으며 이것은 EGCG에 의해 차단됨을 확인하였다. 또한, 젠타마이신은 산화질소의 생성을 증가시켰으며 그 효과도 EGCG에 의해 억제된다는 것을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과로 젠타마이신에 의한 전정독성 효과는 EGCG에 의해 억제될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents: the aminoglycosides. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division;1996. p.1103-21.
- 2) Hess K. Vestibulotoxic drugs and other causes of acquired bilateral peripheral vestibulopathy. In: Baloh RW, Halmagyi GH, editors. Disorders of the Vestibular System. New York: Oxford University Press;1996. p.360-73.
- 3) Hutchin T, Cortopassi G. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(11):2517-20.
- 4) Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? Otolaryngol Head Neck Surg 1998;118(5):674-7.
- 5) Segal JA, Skolnick P. Polyamine-like actions of aminoglycosides and aminoglycoside derivatives at NMDA receptors. Eur J Pharmacol 1998;347(2-3):311-7.
- 6) Basile AS, Brichta AM, Harris BD, Morse D, Coling D, Skolnick P. Dizocilpine attenuates streptomycin-induced vestibulotoxicity in rats. Neurosci Lett 1999;265(2):71-4.
- 7) Basile AS, Huang JM, Xie C, Webster D, Berlin C, Skolnick P. N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. Nat Med 1996;2(12):1338-43.
- 8) Chen JW, Eatock RA. Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. J Neurophysiol 2000;84(1):139-51.
- 9) Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. Food Chem Toxicol 2002;40(12):1745-50.
- 10) Masuko T, Kuno T, Kashiwagi K, Kusama T, Williams K, Igarashi K. Stimulatory and inhibitory properties of aminoglycoside antibiotics at N-methyl-D-aspartate receptors. J Pharmacol Exp Ther 1999;

- 290(3):1026-33.
- 11) Fowler EP Jr. Streptomycin treatment of vertigo. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1948;52:293-301.
  - 12) Schuknecht HF. Ablation therapy in the management of Menière's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 1957;132:1-42.
  - 13) Chung WK, Lee WS, Moon SW, Hong JP, Eum JH. Streptomycin perfusion through the round window in Meniere's disease. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 1998;41(6):725-9.
  - 14) Gawęcki W, Szyfter W, Łączkowska-Przybylska J, Szyfter-Harris J. [The long-term results of treatment of Ménière's disease with intratympanic injections of gentamicin]. *Otolaryngol Pol* 2012;66(1):20-6.
  - 15) Rah YC, Kim BJ, Song JJ, Kwang HS, Kim JS, Koo JW. Treatment of Meniere's disease and intratympanic gentamicin injection. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2009;52(12):949-55.
  - 16) Katsuki Y, Covell WP. The organ of Corti by phase contrast microscopy. *Laryngoscope* 1953;63(1):1-17.
  - 17) Wersall J. Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig; a light and electron microscopic investigation. *Acta Otolaryngol Suppl* 1956;126:1-85.
  - 18) Takumida M, Anniko M. Nitric oxide in the inner ear. *Curr Opin Neurol* 2002;15(1):11-5.
  - 19) Takumida M, Anniko M. Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following gentamicin exposure in vitro. *Acta Otolaryngol* 2001;121(3):346-50.
  - 20) Braicu C, Gherman CD, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2013;13(1):632-7.
  - 21) Choi SJ, Choung YH. Preventive effect of green tea extracts on the inhibition of connexin expression induced by carcinogen H2O2. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2008;51(4):355-62.
  - 22) Nagai K, Jiang MH, Hada J, Nagata T, Yajima Y, Yamamoto S, et al. (-)-Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as an anti-oxidant. *Brain Res* 2002;956(2):319-22.
  - 23) Takumida M, Anniko M. Brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2002;122(1):10-5.