



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

이학 석사학위 논문

*in vitro*와 *in vivo*에서
방사선에 의해 유도되는 청각
세포사멸에 대한 녹차추출
Epicatechin의 보호효과

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

편정희

방사선에 의해 유도되는 청각
세포사멸에 대한 녹차추출
Epicatechin의 보호효과

지도교수 김 철 호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2009년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의생명과학과/분자의학전공

편 정 회

편정희의 이학석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 김철호 인

심사위원 박기현 인

심사위원 김현준 인

아주대학교 대학원

2008년 12월 22일

*in vitro*와 *in vivo*에서 방사선에 의해 유도되는 청각세포사멸에 대한 녹차추출 Epicatechin의 보호효과

방사선은 현재 암 치료용으로 널리 사용되고 있으며 특히 두경부암의 경우 생명을 유지시키는데 중요한 장기와 구조물이 복잡하게 위치하고 있어 종양 발생으로 인한 중대한 기능 손실과 외모의 변형이 문제시 되고 있다. 그러나 방사선치료는 인해 정상 조직이나 기관의 모양과 기능은 정상 상태로 유지시키면서 악성 종양조직은 선택적으로 파괴시켜 널리 사용되고 있다. 그러나 불행히도 두경부암에서 방사선을 조사하면 청력이 손실된다고 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서는 방사선에 의해 유도되는 청력손실에 따른 녹차추출 Epicatechin(EC)의 효과에 대해 확인하고자 하였다.

먼저 청각와우세포인 HEI-OC1 세포로 세포 생존율을 측정하였으며 annexin-V와 PI로 이중염색을 시행한 뒤 FACS를 시행하여 세포 고사율을 확인하였으며, 미토콘드리아 막 투과성의 변화와 활성산소의 변화를 측정하였다. 또한 TUNEL assay와 투과 전자 현미경을 사용하여 세포고사를 현미경하에서 관찰하였다. 또한 기전을 확인하기 위하여 Western blot을 시행하였으며, caspase 3 활성도도 측정하였다. 생체 실험으로는 지브라피쉬(zebrafish)를 이용하여 방사선에 의한 청각기관의 변화를 보기 위해 지브라피쉬 신경소구(neuromast)의 변화와 그에 따른 EC의 효과를 확인하였으며, 이를 주사 전자 현미경하에서도 관찰하였다. 또한 백서를 이용하여 뇌간유발전이 청력검사를 시행하여 방사선에 의한 청력의 손실과 EC의 효과를 객관적 기능검사로 확인하였다. 세포 생존율을 측정한 결과 방사선의 양이 증가할수록 세포 생존율이 감소하였으며 20Gy의 방사선에 EC를 농도별로 처리한 결과 EC의 농도와 비례하여 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. FACS를 시행한 결과 방사선만 처리한 군에서는

세포 고사율이 증가한 반면 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 세포 고사율이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미토콘드리아 막 투과성과 활성산소의 변화를 측정 한 결과에서도 방사선을 처리한 군에서는 증가하였다가 EC를 함께 처리한 군에서는 감소한 것을 확인하였다. TUNEL assay에서는 방사선을 처리한 군에서는 DNA가 손상되어 FITC가 염색된 것을 많이 관찰할 수 있었으며 EC를 함께 처리한 군에서는 FITC가 염색된 부분이 많이 감소하여 DNA손상이 보호된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 방사선에 의한 시간에 따른 세포의 기전을 Western blot을 통하여 분석하였다. p53과 MAPK pathway인 p38, ERK, JNK를 확인하였으며, 15분에 시행한 실험에서 가장 강한 발현을 보였으며, 이 결과를 토대로 방사선에 따른 EC의 변화의 기전을 확인하였다. 결과상 EC는 p38의 발현을 약간 감소시켰으나, 주된 변화는 JNK의 변화가 가장 두드러져 JNK pathway를 통한 청각보호작용이 일어나는 것으로 판단되었다. 또한 caspase 3 활성도를 측정하여 세포의 고사를 확인하였다. 방사선에 의해 caspase 3의 활성도가 증가하였으며 EC와 함께 처리한 군에서는 caspase 3의 활성도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 생체 실험인 지브라피쉬를 통하여 방사선에 의해 신경소구가 작아지고 변형되는 것을 Yo pro-1 염색을 통하여 형광현미경하에서 관찰하였으며, EC에 의해 보호되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과 방사선을 조사한 군에서는 kinocilium이 잘려져 있는 반면 EC를 함께 처리한 군에서는 방사선에 의해 손상 받은 kinocilium이 보호되는 것을 확인하였다. 또한 백서를 이용하여 뇌간유발전이 청력검사를 시행한 결과 방사선만 처리한 군에서는 청각역치가 증가되는 것을 확인할 수 있었는데 EC를 함께 처리한 군에서는 청각역치가 정상보다는 높았지만, 방사선처리군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있어 방사선에 의해 손상된 청각세포가 EC에 의해 기능적으로 보호된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 HEI-OC1에서 EC가 방사선에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 낮추고, 미토콘드리아 막 투과성을 소실을 억제하여 산화스트레스로 인한 세포의 손상을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 EC에 의한 항산화 작용에 따른 세포 보호 기전의 구체적인 기전 분석과 동

물실험을 통하여 조직학적인 변화가 필요하며, 이러한 연구결과를 토대로 방사선에 의한 청각기능을 보호할 수 있는 치료약물 개발에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이라 생각한다.

핵심어: 에피카테킨, 방사선, 청각와우세포주, 이독성, 세포 자멸사, 활성산소

차 례

국문요약	i
차례	iv
그림 차례	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
A. 실험재료	5
1. 세포주 및 세포배양	5
2. 동물 실험 모델	5
3. 방사선 조사	6
B. 실험 방법	7
1. 세포 생존율 측정 (MTT assay)	7
2. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 분석	7
3. 미토콘드리아 막 투과성 (Mitochondria membrane permeability, MMP)의 변화 측정	8
4. 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)의 변화 측정	9
5. TUNEL assay	9
6. Western blot 분석	10
7. 형광 현미경을 이용한 지브라피쉬의 신경소구 관찰	10
8. 주사 전자 현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 이용한 지브라피쉬의 신경소구 관찰	11
9. 백서의 뇌간유발전이(ABR) 청력측정	11
10. 통계학적 분석	12
III. 결과	13
A. 방사선 조사 후 HEI-OC1세포 생존률에 의한 Epicatechin(EC)의 효과	13

B. 방사선 조사 후 HEI-OC1 세포사멸에 의한 EC의 효과	13
C. 방사선에 의한 미토콘드리아 막 투과성의 변화에 따른 EC의 효과	14
D. 방사선에 의한 활성산소의 변화에 따른 EC의 효과	14
E. TUNEL assay	15
F. Western blot	15
G. 지브라피쉬 신경소구의 변화	16
H. 주사 전자 현미경을 통한 지브라피쉬의 신경소구 변화 분석	16
I. 백서의 뇌간유발전이(ABR) 청력측정결과	17
IV. 고찰	18
V. 결론	23
참고문헌	34
ABSTRACT	42

그림 차례

Fig. 1. The structure of EC	24
Fig. 2. Effect of EC on viability HEI-OC1 cells after treatment with radiation.	25
Fig. 3. Flow cytometry using annexin V-FITC and propidium iodide(PI). 26	
Fig. 4. Inhibition of MMP in radiation-treated HEI-OC1 by EC.	27
Fig. 5. The effect of EC on radiation induced intracellular ROS	28
Fig. 6. Transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) Assay	29
Fig. 7. Western blot analysis	30
Fig. 8. Quantitative measurement of zebrafish neuromast	31
Fig. 9. Examination of Scanning electron microscope(SEM)	32
Fig. 10. Measurement of thresholds of Auditory Brainstem Responses ...	33

I. 서 론

두경부암은 전체 악성종양의 약 5%를 점유하고 있으나 (Charles, *et al.*, 1990) 생명을 유지시키는데 중요한 장기와 구조물이 복잡하게 위치하고 있으므로 종양발생으로 인한 중대한 기능 손실과 외모의 변형으로 초래되는 여러 가지 문제를 생각할 때 생리적 기능이나 외모의 유지와 더불어 악성종양의 완전 퇴치는 오늘날 두경부암 환자를 치료하는 여러 분야의 관련 임상 의사들에게는 중요한 사안이 아닐 수 없다. (Rubin, 1983) 악성 종양이 완치되었다 하더라도 사회활동이 곤란할 정도의 외모가 되거나 살아가기에 필수적인 생리적 기능이 소실된다면 이상적인 치료라고 생각할 수 없다. 그러므로 근래에 와서 정상조직이나 기관의 모양과 기능은 정상 상태로 유지시키면서 악성 종양조직은 선택적으로 파괴시키는 방사선치료의 역할이 두경부 암에서는 특히 중요하게 취급되고 있다. (Meyers, *et al.* 1989) (Sei one Shin, *et al.* 1990) 그러나 외부 방사선 치료만으로 중요 장기가 밀집되어 있는 두경부암을 치료할 때 정상 조직의 정확한 치료가 기술적으로 불가능한 경우가 많아서 이에 따른 부작용이 문제시 되고 있다. 이러한 부작용으로 시신경장애, (Mihakea, *et al.* 2008) 구강건조증, (Guinand, *et al.* 2007, Chambers, *et al.* 2007) 구내염 (Borques, *et al.* 2006, Redding. 2005) 부종, (Pattersom, *et al.* 2007) 갑상선 기능저하 (Ulger, *et al.* 2007) 등이 있으며, 특히 난청은 뇌 혹은 두경부암 환자의 방사선 치료의 부작용으로 흔히 나타나고 있다. (Hua C, *et al.* 2008) 두경부암 환자는 부분적으로 혹은 전체적으로 높은 방사선을 받았으며 이러한 방사선에 의해 내이, 중이, 외이의 손상이 증가되는 것을 보고하였다. (Borsanyi, *et al.* 1962) Mencher는 방사선이 성인에서의 난청에 중요한 요인이라고 보고하였으며, (Mencher, *et al.* 1995) 비인강암 환자 중 방사선을 받은 환자에서 난청의 비율이 50%이상으로 높게 나타났다고 보고하였다. (Low, *et al.* 1998) Borsanyi 등은 비인강암으로 방사선 치료를 받은 모든 환자에서 난청이 발생함을 보고하였고, 중이염에 의한 전음성 난청 이외에도 일부에서는 감각신경성 난청이 있어 혈관조의 일시적인 혈관염에 의한 것이라고 추

측하였다. (Low, *et al.* 2006) Leach, (Leach. 1965) Moretti (Moretti, *et al.* 1976) 등이 방사선 치료 후 감각신경성 난청이 일어남을 보고하여 정기적인 청력 검사를 통한 청력의 추적이 필요함을 강조하였다. Grau 등은 비인강암 환자 22명에서 cohort연구를 하여 4,000 Hz에서 골도 청력의 저하를 보고하였다. (Gran, *et al.* 1991) 그들은 이 연구에서 방사선 조사량과 청력 소실의 정도가 유의한 상관 관계가 있다고 하였고 특히 50Gy 이상의 방사선을 받은 환자들에게 난청의 발생 확률이 유의하게 높았다고 보고하였다. 동물실험에서 방사선은 즉각적인 와우의 청각유모세포의 죽음을 유발하였다. Keleman은 백서의 측두골에 100 - 3000 rad의 방사선을 조사하였으며, (Keleman, 1963) Gamble은 6000 rad의 방사선을 조사한 기니픽의 내이에서 통계적으로 유의하게 염증반응이 수반되었으며 와우혈관조의 초기 변화가 있다고 하였다. (Gamble, *et al.* 1968) 사람의 경우 Schneck와 Karmody는 매년 5,220 rad의 방사선을 받은 청력손실 환자들에게서 기저막, 나선형 인대와 혈관줄무늬의 손상이 있다고 보고하였다. (Schucknecht, *et al.* 1966) Bohne 등은 친칠라에 40-90Gy의 방사선을 다분할(fractionated) 조사하고 2년간 추적한 실험에서 가장 두드러진 병리조직학적 변화로 Cortigi의 감각세포 및 지지세포 그리고 와우 신경섬유의 손상을 보고하였고, 외유모세포의 손상이 내유모세포보다 심하나 각 회전간의 감수성의 차이는 없으며 또한 손상의 정도는 방사선 조사량과 비례한다고 하였다. (Bohne. *et al.* 1985)

차잎[*Theae Folium* : *Thea sinensis*, (Theaceae)]은 오래전부터 전 세계적으로 많이 음용되는 음료수의 하나로, 발효정도에 따라 다양한 종류의 차가 많이 알려져 있다. (Katiyar, *et al.* 2001) 즉, 100% 발효된 차를 홍차 (Black Tea)라고 하며, 비 발효차를 녹차(Green Tea), 그리고 약 50% 정도 발효된 차를 우롱차라 하여 시판되고 있다. 이 중에서도 녹차는 최근에 기호음료 이외에도 차를 식품에 첨가하여 기능성 음식으로 많이 개발되고 있는 추세이다. (Huang, *et al.* 1992) Green tea의 학명은 *Canellia sinensis*이며, catechin, caffeine, amino acids, vitamins 등 다양한 생리활성 성분이 함유되어 있다. 그 중 차엽에 존재하는 catechin성분은 다양한 기전을 통해 심혈관을 보호하고, 항산화 활성 및 DNA 손

상 억제 효과가 있으며, 고혈압을 방지하고 항생효과가 있는 것으로 알려져 있다. 녹차의 주요 생리활성기능을 갖는 성분으로 Tannin 성분과 alkaloid 및 flavonoid 성분 등이 있다. (Babu, 2008. Sriram, *et al.* 2008.) 특히, Tannin 성분의 catechin은 polyphenolic 성분으로 Epigallocatechin-3- gallate(EGCG) (40-60%), Epigallocatechin(EGC) (10-20%), Epicatechin gallate(EGC) (10-20%), Epicatechin(EC) (4-6%), Catechin(2-4%)이 있다. (Graham. 1992) EGCG는 신경세포의 산화적 독성과 흥분독성을 억제하며, (Kim, *et al.* 2004) 피부 광 손상 억제효과도 있다. Seo 등은 인간 피부섬유아세포에서 자외선 B가 유발하는 다양한 피부손상 중, 유리산소라디칼이 관여하는 반응에 EGCG가 치료 및 예방적인 효과가 있다고 보고하였으며, (Seo , Il SS, *et al.* 2001) Kim 등은 EGCG가 자외선에 의해 유도되는 피부의 손상을 미토콘드리아 막 투과성(Mitochondria membrane permeability, MMP)과 전사조절인자를 통한 항산화 효과로 보호된다고 보고하였다. (Kim, 2000) 또한 EGCG가 도파민계 신경독성에서 효과가 있으며, Shin 등은 쥐 해마의 기관형적 절편배양에서 EGCG가 신경독성을 보호한다고 보고하였으며, (Shin, 2006) Kim 등은 pc12 세포에서 EGCG가 베타아밀로이드펩티드의 독성에 의해 유도되는 신경세포 손상을 보호한다고 보고하였다. (Kim, 2004) 또한 You 등은 Abeta-42에 의한 신경세포 독성에서 Protein kinase C를 통한 EGCG의 보호에 대해 보고하였으며, (You, 2008) Oh 등은 MPTP파킨슨 모델에서 EGCG가 신경세포의 손실을 보호한다고 보고하였다. (Oh, 2002) 이렇듯 EGCG에 관한 보고는 많으나 EC가 비교적 불활성화 되어 있으며 마이너 성분이므로 EC에 대한 항산화 효과에 대한 보고는 거의 되어있지 않은 실정이다. 그러나 Kim 등은 EC가 항암제인 Cisplatin에 의한 이독성 난청에 대해 청각와우세포주인 HEI-OC1 세포와 생체 지브라피쉬에서 미토콘드리아 막 투과성을 억제하고 활성산소를 억제함으로써 보호되는 효과가 있으며, 화학치료제의 효과에 대한 감화작용은 있지 않은 것으로 보고하였다. (Kim, *et al.* 2008)

따라서 본 연구에서는 방사선에 의한 청각와우세포의 손상과 EC에 의한 보호효

과를 청각와우세포주인 HEI-OC1 세포를 통하여 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 확인하였으며, 활성산소를 측정하여 방사선에 의해 증가하는 활성산소가 EC에 의해 얼마나 줄어드는지 확인하였다. 또한 FACS를 통하여 세포의 고사율을 측정하였으며, TUNEL assay와 미토콘드리아 막 투과성을 통한 세포내에서의 핵의 변화를 현미경하에서 관찰하였다. 또한 이러한 기전을 확인하기 위해 Western blot과 caspase 3 assay를 시행하였으며, 동물실험으로 지브라피쉬의 신경소구를 형광 발현하여 관찰하고, 주사 전자 현미경으로 확대하여 관찰하였으며, 백서에서 뇌간유발전이 청력검사(Auditory brainstem responses, ABR)를 통하여 청력의 변화를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

A. 실험재료

1. 세포주 및 세포배양

마우스 와우기관의 organ of Corti에서 유래된 청각와우세포주인 HEI-OC1은 미국 House Ear Institute(LA, CA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 세포배양은 Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM, GIBCO)에 항생제 첨가 없이 10% Fetal bovine serum(FBS, PAA)을 첨가하여, CO₂ 세포배양기(33°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 계대 배양하였으며, 배양용기에 60~70% 찼을 때, 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 동물 실험 모델

지브라피쉬 (*Danio rerio*) wild type을 적정 생육온도인 28.5°C의 수온을 유지한 어항에서 사육하며, 먹이는 건조된 집진벌레를 사용하였다. 지브라피쉬의 산란과 수정은 빛에 의해 유도되므로 낮 14시간, 밤 10시간의 명암을 유지하였다. 전날 오후에 암, 수 한 쌍씩 전용 인공부화기에 함께 넣어준 후 수집된 수정란을 알을 100mm 배양용기에 embryo media (1mM MgSO₄, 120μM KH₂PO₄, 74μM NaHPO₄, 1mM CaCl₂, 500μM KCl, 15μM NaCl, and 500μM NaHCO₃)에 넣고 유지하였다. 실험에는 수정 후, 4일째 되는 물고기를 사용하였다.

백서는 동일한 조건에서 사육된 체중 200g 내외의 Sprague Dawley계 6마리를 사용하였으며, 실험 목적에 따라 방사선 조사군과 정상대조군으로 나누었다. 방사선 조사군에서는 다시 EC 처리군과 무 처리군으로 나누었다. 각 군에는 2마리씩 배정하였다.

3. 방사선 조사

세포와 지브라피쉬에 대한 방사선 조사를 위하여 실험에 적절한 배양접시에 배양하고 2일 동안 안정화 시킨 후 방사선을 조사하였다. 방사선 조사장치는 6MV 선형가속기를 사용하였고 실온에서 20Gy의 방사선을 단일 조사하였다.

백서에 대한 방사선 조사를 위하여 투명한 플라스틱으로 만든 동물고정기를 제작하였다. 동물고정기는 25×5×6cm의 크기로 제작하였고, 각 면마다 구멍을 뚫어서 밀폐되지 않도록 하였다. 방사선 조사는 세포실험과 동일한 6MV 선형가속기를 사용하였고 실온에서 30Gy의 방사선을 단일 조사하였다.

B. 실험 방법

1. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정을 위해 HEI-OC1 세포를 96 well 세포배양판에 5×10^3 cells/100 μ l를 well 당 100 μ l씩 분주하여 48시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하였다. 4시간 후, 방사선을 처리하였고, 24시간을 CO₂ 세포배양기에서 배양한 후, PBS에 녹인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 용액 (5mg/ml) 40 μ l/well을 첨가하여 4시간 동안 CO₂ 세포배양기에서 배양하고 well에 있는 용액을 제거하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Amnesco) 용액 100 μ l/well을 넣어 30분 동안 용해시킨 후 분광광도계(ELISA reader, BIO RAD)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 아무것도 처리하지 않은 군과 방사선을 세기별로 조사한 군, EC(Epicatechin, Sigma)를 농도별로 처리한 군, EC를 처리한 후 4시간 후에 방사선을 조사한 군으로 나누었다.

2. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 분석

MTT assay를 통해 본 세포사가 세포 고사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 FACS analysis를 시행하였다. HEI-OC1 세포를 6 well 세포 배양판에 1×10^5 cells/ml를 well 당 1ml씩 분주하여 48시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시켰다. 48시간 후 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하고 EC를 처리하였다. 이때 실험은 4가지 조건으로 나누었으며, MTT assay의 결과를 토대로 방사선 세기량과 EC의 농도를 정하였다. 첫 번째 조건은 아무것도 처리하지 않은 대조군으로, 두 번째 조건은 EC 200 μ M 처리한 실험군으로, 세 번째 조건은 방사선 20Gy 처리한 실험군으로, 네 번째 조건은 EC 200 μ M을 처리한 후 방사선 20Gy를 처리한 실험군으로 나누었다. EC를 처리하고 4시간 후, 방사선을 조사하였으며, 방사선 조사 후 24시간 동안 CO₂ 세포 배양기에서 배양하

였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well의 상등액을 각 FACS tube에 수거한 후 각 well에 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO)를 500 μ l씩 넣어 well의 모든 세포를 떼어낸 후 1500rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 침전된 cell pellet에 1 \times Annexin V Binding Buffer 100 μ l를 넣어주고, Annexin V-FITC와 Propidium Iodide staining solution을 각 5 μ l씩 넣고 15분 동안 반응시킨 후, 1 \times binding Buffer 400 μ l를 더 넣는다. 그 후, Flow Cytometry를 이용하여 각 군에서 세포 고사의 정도를 분석하였다.

3. 미토콘드리아 막 투과성 (Mitochondria membrane permeability, MMP) 의 변화 측정

HEI-OC1 세포를 6 well 세포 배양판에 1×10^5 cell/ml를 well 당 1ml씩 분주하여 48시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시켰다. 48시간 후 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하고 EC를 처리하였다. 실험의 조건은 앞의 실험의 네 가지 조건과 동일하게 하였다. 방사선 조사 24시간 후, 각 well의 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 well에 남아있는 혈청을 제거하였다. 그 후 각 well에 PBS에 넣은 lipophilic cationic probe, 5V,6,6V-tetrachloro-1, 1V, 3,3V-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1;Molecular Probes Inc.)을 well 당 2ml씩 넣어준 후 햇빛이 보이지 않게 해서 33 $^{\circ}$ C 세포배양기 안에 넣어둔 후 20분 동안 반응시킨 후 다시 PBS로 2번 세척하였다. 그 후, PBS로 세포표면이 덮일 정도로 채운 후 형광현미경을 관찰하였다. 형광현미경 관찰 파장은 527nm(녹색)과 590nm(적색)파장으로 하였다. 미토콘드리아 막 투과성은 정상세포에서는 미토콘드리아가 주로 적색 파장일 때 발현이 되며, 미토콘드리아가 손상을 입었을 때, 녹색파장에서 발현이 된다. 이러한 적색 파장과 녹색 파장의 반응 신호를 정량적으로 분석하였다. 앞의 방법과 동일하게 처리한 후, JC-1을 DMEM 배지에 5mg/ml로 넣어 well 당 2ml씩 넣어준 후, 20분간 반응시킨 후, 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 그 후, 0.25% trypsin-EDTA(GIBCO)를 300 μ l씩 넣어 세포를 떼어냈다. 세포에 PBS를 300 μ l 더 넣고 FACS tube에 수

거하여 Flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

4. 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)의 변화 측정

HEI-OC1 세포를 6 well 세포 배양판에 1×10^5 cells/ml를 well 당 1ml씩 분주하여 48시간 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시켰다. 48시간 후 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하고 EC를 처리하였다. 실험의 조건은 앞의 실험의 네 가지 조건과 동일하게 하였다. 방사선 조사 24시간 후, 각 well의 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 well에 남아있는 혈청을 제거하였다. 그 후 각 well에 PBS에 넣은 10 μ M의 DCFDA(5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydro fluoresceindiacetate)를 well 당 2ml씩 넣어준 후 햇빛이 보이지 않게 해서 33 $^{\circ}$ C 세포배양기 안에 넣어둔 후 다시 PBS로 2번 세척하였다. 그 후, 0.25% trypsin-EDTA(GIBCO)를 300 μ l씩 넣어 세포를 떼어냈다. 세포를 PBS를 300 μ l 더 넣고 FACS tube에 수거하여 Flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

5. TUNEL assay

6 well 세포 배양판에 cover slip을 깔고 그 위에 HEI-OC1 세포를 1×10^5 cells/ml로 well 당 1ml씩 분주하여 48시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시켰다. 48시간 후 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하고 EC를 처리하였다. 실험의 조건은 앞의 네 가지 조건과 동일하게 하였다. 방사선 조사 24시간 후, 각 well의 배지를 제거한 후 PBS로 2번 세척한 후, 4% paraformaldehyde 1ml을 넣고 실온에서 1시간동안 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 2번 세척한 후, H₂O₂를 well 당 1ml씩 넣고, 10분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 세포를 PBS로 2번 세척한 후 PBS에 넣은 0.1% Triton X - 100을 1ml 넣고 얼음 위에서 2분 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 2번 세척한 후 well 안에 있는 Cover slip을 stain box에 옮겼다. 옮긴 cover slip에 Enzyme solution과 Label solution(9:1)이 섞인 용액을 well당 50 μ l씩 넣고 33 $^{\circ}$ C 세포배양기에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후, PBS로 2번 세척한 후 20 μ g/ml

의 DAPI를 20 μ l씩 넣었다. 다시 PBS로 2번 세척한 후, 멸균된 증류수에 살짝 넣었다가 빼고 PBS에 70%로 희석한 mountin solution을 cover slip이 덮일 만큼만 넣었다. 염색된 슬라이드를 confocal 현미경으로 관찰하였다.

6. Western blot 분석

HEI-OC1 세포를 60mm 세포 배양판에 3×10^5 cells/ml로 well 당 1ml씩 분주하여 48 시간동안 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시켰다. 48시간 후 혈청이 제거되고 glucose의 함량이 낮은 배지로 교체하고 EC를 처리하였다. 실험의 조건은 앞의 실험의 네 가지 조건과 동일하게 하였다. 방사선 조사 24시간 후, 각 well의 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 well에 남아있는 혈청을 제거하였다. 세포에 RIPA buffer와 7 \times phosphatase inhibitor, 10 \times protease inhibitor를 섞은 것을 well 당 50 μ l씩 넣고 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 측정된 단백질에 5 \times sample buffer를 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하였다. 가열한 단백질을 12%와 10%의 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 PVDF membrane에 transfer하였다. Transfer한 membrane을 TBS-T에 녹인 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 non-specific binding site를 억제 시킨 후, 관찰하고자 하는 단백질들의 항체를 붙이고 단백질들의 발현양상을 보기 위해 Enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham)로 반응시켜 관찰하였다. phospho-p53, phospho-p38, phospho-JNK, phospho-ERK, caspase 3, α -tubulin, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase 등의 항체들은 모두 Cell signaling사에서 구입하였다.

7. 형광 현미경을 이용한 지브라피쉬의 신경소구 관찰

지브라피쉬 (Danio rerio) wild type의 수정란이 4일째 될 때, 6 well에 Embryo media 2ml에 처리할 약물을 넣고, 각 그룹 당 5마리 씩 넣고 1시간 동

안 28.5°C를 유지하고 있는 배양기에서 약물을 반응시켰다. 반응 후, embryo media로 3번 세척한 후, 깨끗한 embryo media에서 3시간 동안 두었다. 3시간 후, 2 μ M의 Yo-Pro-1(molecular probes, Oregon U.S.A)을 embryo media에 넣고 빛이 차단된 곳에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 시킨 후, 다시 깨끗한 embryo media로 3번 씻어준 후, 8 μ g/ml의 MS222(3-aminobenzoic acid ethyl ester, methanesulfonate salt, Sigma Chemical CO, St Louis, U.S.A) 마취약으로 마취한 후 형광현미경을 사용하여 지브라피쉬에서 청각기능을 하는 신경소구의 형광 발현을 관찰하였다.

8. 주사 전자 현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 이용한 지브라피쉬의 신경소구 관찰

지브라피쉬 (Danio rerio) wild type의 수정란이 4일째 될 때, PBS에 녹인 2.5% glutaraldehyde에 넣고 4°C에서 24시간 동안 고정하였다. 고정된 배아를 증류수로 5분씩 3번 세척하여 고정액을 제거하였다. 고정액이 제거된 배아를 25%, 50%, 75%, 80%, 95%, 100%의 순서로 에탄올에 각 10분씩 2번 세척하여 탈수하였다. 탈수된 배아를 에탄올에 용해한 glutaraldehyde를 25%, 50%, 75%, 100%의 순서로 각 10분씩 2번 세척하여 에탄올에서 glutaraldehyde로 치환하였다. 치환된 배아를 critical point dryer(CPD)기계를 사용하여 건조하였으며, 건조한 배아를 Baltec MED010 evaporator를 사용하여 백금으로 코팅한 후, 주사전자현미경(JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

9. 백서의 뇌간유발전이 청력측정

백서를 zoletil과 rompun을 1:1비율로 혼합한 마취약으로 마취한 후, 뇌간유발전이 청력검사를 실시하였다. 뇌간유발전이 청력검사는 흰 쥐를 어둡고 전기적으로 차단된 특수 제작된 방음 실에 똑바로 누운 자세로 눕혀서 실험하였다. 자극음은 초당 13회의 교대상 클릭음을 75dB HL의 강도부터 단계별로 5dB씩

낮추며 측정하였다. 청력역치는 과형 I 을 기준으로 정상적인 과형 I 이 추정되는 강도를 청력 역치로 정하였고, 클릭음의 주파수 필터는 100 - 3000 Hz로 조절하였고, 총 자극음의 횟수는 1,024회로 하였다. EC를 투여한 군과 EC를 투여하지 않은 대조군으로 나누었으며, 아무것도 처리하지 않은 군에서 뇌간유발전이 청력검사를 시행한 후 EC 2mM과 대조군에는 DMSO를 투여하였으며, 이 때 약물은 26gauge의 바늘로 흰 쥐의 고막 안쪽에 투여하였다. 약물투여 1일 후에 30Gy의 방사선을 단일조사 하였으며, 방사선 조사 후 1일, 3일, 7일 총 3번 뇌간유발전이 청력측정을 하였다.

10. 통계학적 분석

각 EC 처리에 따른 MTT Assay와 FACS, ROS 결과의 분석은 Student's t-test를 이용하였다.

Ⅲ. 결 과

A. 방사선 조사 후 HEI-OC1세포 생존율에 의한 Epicatechin(EC)의 효과

방사선에 의한 청각와우세포의 손상을 조사하기 위하여 청각와우세포주인 HEI-OC1 세포에 다양한 세기로 방사선에 노출하고 24시간 후 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 방사선 양 8Gy에서는 대조군의 91% 생존률을, 12Gy에서는 73%, 18Gy에서는 61%, 24Gy에서는 54%, 36Gy에서는 40%의 생존률을 보였다. 기존 데이터에서 약 60%의 생존률을 보인 20Gy를 적정한 양으로 잡고 EC의 효과를 동일한 방법인 MTT assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. 방사선 조사 4시간 전에 혈청이 제거된 배지로 교체하고 방사선 조사 1시간 전에 EC를 처리한 후 20Gy의 방사선에 노출하였다. 20Gy의 방사선만 노출되었을 때 세포 생존률은 대조군의 70%의 생존률을 보였지만, 10 μ M의 EC처리군에서는 90%의 생존률을, 40 μ M의 EC처리군에서는 대조군과 거의 비슷한 생존률을, 200 μ M의 EC처리군에서는 대조군보다 더 좋은 효과를 보였으며, EC의 자체 독성은 관찰되지 않았다. 이 결과로 방사선에 의한 세기에 의존적으로 HEI-OC1세포가 죽는 것을 확인하였으며, EC는 방사선에 의한 세포의 죽음으로부터 청각유모세포를 보호한다는 것을 알 수 있었다.

B. 방사선 조사 후 HEI-OC1 세포사멸에 의한 EC의 효과

앞서 시행한 MTT assay의 결과를 통해 방사선의 세기는 20Gy, EC의 농도는 200 μ M을 실험적정 농도로 정하였다. 세포의 사멸을 확인하기 위해 HEI-OC1 세포에 방사선 조사 4시간 전에 혈청이 제거된 배지로 교체하고 방사선 조사 1시간 전에 EC를 200 μ M을 처리한 후 방사선 20Gy에 노출하고 24시간 후, FACS를 시행하여 세포 사멸을 알아보았다. Annexin V와 PI 염색을 통해 방사선에 의한 자멸사한 세포의 비율을 알아보고, EC에 의한 자멸사한 세포의 비

율이 감소되는 것을 확인하고자 하였다. 자멸사한 세포의 비율은 그래프에서 늦게 자멸사한 세포인 오른쪽 윗부분과 초기 자멸사한 세포인 오른쪽 아랫부분의 비율을 더하였다. 대조군에서는 자멸사한 세포의 비율이 4.14%였으며, 20Gy의 방사선에만 노출된 세포는 23.84%로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 11.6%로 감소하는 것을 확인하였으며 이를 통해 EC가 방사선에 의한 세포 자멸사를 보호한다는 것을 확인하였다. EC만 단독으로 처리한 군에서는 자멸사한 세포의 비율이 6.28%로 대조군과 거의 비슷하여 세포 독성이 거의 없는 것을 확인하였다.

C. 방사선에 의한 미토콘드리아 막 투과성의 변화에 따른 EC의 효과

미토콘드리아 막 투과성을 FACS로 측정된 결과 JC-1의 발현이 대조군과 비교하였을 때 방사선을 받은 군에서 140% 더 높은 비율을 나타냈으며 EC만 처리한 군과 EC와 방사선을 함께 처리한 군에서는 대조군과 유사한 정도의 발현을 나타냈다. 미토콘드리아 막 투과성이 감소되면 JC-1의 발현이 높아지므로 방사선에 의해 높아진 JC-1의 발현이 EC에 의해 보호된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 형광현미경으로 관찰한 결과 대조군에서는 형광발현이 녹색이 주로 발현이 되고 적색의 형광발현은 거의 볼 수 없었으며, 방사선을 조사한 세포에서는 녹색의 형광발현보다 적색의 형광이 더 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. EC를 처리한 군에서는 대조군 보다는 녹색의 형광발현이 더 많이 되었지만, 방사선을 조사한 군에 비해서는 적색의 형광 발현이 감소한 것으로 보아 EC에 의해 미토콘드리아 막 투과성이 증가하여 JC-1이 감소한다는 것을 확인할 수 있었다.

D. 방사선에 의한 활성산소의 변화에 따른 EC의 효과

세포 내 활성산소 양의 변화를 살펴보기 위하여 H₂DCFDA라는 형광 probe를 사용하여 세포 내 활성산소의 양을 측정하였다. 대조군에 비해 방사선에

노출한 세포에서는 활성산소의 양이 170%정도로 나타났으며, 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 대조군에 비해 130%로 나타났다. 이를 통하여 방사선에 노출이 되면 활성산소의 양이 증가하며, EC에 의해 활성산소의 양이 감소한다는 것을 확인하였다. EC만 단독으로 처리한 군에서의 활성산소의 양은 대조군과 거의 차이가 없었다.

E. TUNEL assay

앞의 실험들로 방사선에 의해 세포사가 유도되는 현상이 나타난 것을 확인하였다. 이를 통해 세포사멸의 가장 큰 외형적 특징을 보기 위해, 4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 핵을 염색하여 세포 자멸사가 진행될 때 나타나는 nuclear fragmentation과 다양한 형태의 자멸사한 세포의 형태를 살펴 보았다. EC의 용매인 아세톤과 증류수 (1:1비율)의 혼합액을 처리한 대조군에서는 자멸사한 세포의 형태를 관찰할 수 없었던 반면 방사선에 노출된 세포에서는 자멸사한 세포의 형태가 많이 관찰되었다. 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 자멸사한 세포의 형태가 관찰되긴 하였지만, 방사선만 단독으로 처리한 군에 비해 자멸사한 세포의 형태가 많이 줄었음을 확인하였다. 이 결과를 통하여 방사선에 노출된 세포에서는 세포사멸의 전형적인 특징인 nuclear fragmentation과 다양한 형태의 자멸사한 세포의 형태가 형성된 것을 확인할 수 있었으며, EC에 의해 어느 정도 보호된다는 것을 알 수 있었다. EC만 단독으로 처리한 군에서는 자멸사한 세포의 형태가 거의 관찰되지 않았다.

F. Western blot

앞의 실험들로 방사선에 의한 세포의 사멸과 이를 통한 EC의 보호를 확인하였다. 이러한 세포의 사멸과 EC의 보호효과에 대한 기전을 확인하기 위해 western blot을 실시하였다. 먼저 방사선을 조사한 후 시간에 따른 변화를 보고자 하였다. 방사선을 조사한 후 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간, 24시간째 단백질을 모아 p53의 발현을 확인한 결과 15분에서 강한 발현을 보이고

시간이 지남에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway인 p38, ERK도 15분에서 강한 발현을 보이고 시간이 지남에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다. c-Jun NH2 terminal kinase (JNK)의 경우 10분부터 30분까지 강한 발현을 보이다 시간이 지남에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 방사선 조사 후 15분 후에 단백질을 추출하여 방사선에 의한 EC의 기전을 확인하였다. p53과 ERK는 방사선조사에 의해 증가된 발현이 EC처리에 의해 크게 변화가 없었으나, p38의 경우에는 방사선치료시 증가된 발현이 EC처리에 의해 발현이 약간 감소되는 소견을 보였고, JNK는 EC처리 후 발현이 현격하게 감소되는 것으로 확인되어 JNK pathway가 주된 기전임을 확인할 수 있었다.

G. 지브라피쉬 신경소구의 변화

방사선과 EC에 의한 신경소구의 변화를 살펴보기 위해 생체실험으로 수정 된지 4일째 되는 지브라피쉬의 신경소구를 Yo-pro1으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 방사선 20Gy만 단독으로 처리한 군에서는 대조군에 비하여 신경소구가 쪼개져서 보였으며, 정상군에 비해 크기도 더 작았다. 반면에 EC 200 μ M과 방사선을 함께 처리한 군에서는 신경소구의 크기와 모양이 대조군과 거의 비슷하였다. 이를 통하여 방사선에 의해 손상되는 지브라피쉬의 신경소구가 EC에 의해 보호된다는 것을 확인하였다.

H. 주사전자현미경을 통한 지브라피쉬의 신경소구 변화 분석

앞의 실험에서 Yo-pro1의 염색으로 통하여 지브라피쉬 신경소구의 변화를 형광현미경으로 관찰하였다. 주사전자 현미경으로 stereocilia와 kinocilium의 변화를 확인하였다. 방사선 20Gy만 단독으로 처리한 군에서는 대조군과 비교하였을 때 kinocilium의 상단이 잘려져 나간 것 같은 손상소견이 많이 관찰되었다.

방사선만 단독으로 처리한 군과 비교하였을 때 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 sterelcilia와 kinocilium의 손상이 보호되는 것을 확인할 수 있었다. EC만 단독으로 처리한 군에서는 대조군과 비슷하였으며 stereocilia와 kinocilium의 손상은 거의 관찰되지 않았다.

I. 백서의 뇌간유발전이 청력측정

앞의 세포실험과 지브라피쉬를 이용한 동물실험을 통하여 방사선에 의해 유발되는 청각세포의 죽음을 EC가 보호한다는 것을 확인하였다. 앞의 결과를 토대로 백서에 방사선과 EC를 처리한 후 백서에서의 청각세포의 변화를 확인하고자 하였다. 백서에 아무것도 처리하지 않은 상태에서 뇌간유발전이 청력측정을 시행한 결과 75dB부터 15~20dB까지 반응하였으며, 방사선만 처리한 군에서는 75dB부터 60~70dB로 청력 역치가 증가하였다. 또한 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 75dB부터 30~40dB로 대조군과 유사한 반응을 보였으며, EC와 DMSO만 처리한 군에서도 75dB부터 20~30dB까지 반응하였으며, EC와 DMSO에 의한 독성은 거의 없는 것을 확인하였다.

IV. 고찰

최근 약물, 소음, 스트레스 환경은 시간의 경과에 따라 회복 불가능한 청각손상을 유발하여 심각한 사회문제로 인식되고 있다. 우리나라의 경우 청각장애인으로 등록되어 있는 난청환자는 2005년 6월 기준으로 약 15만 명으로 전체 인구의 0.3%를 차지하고 있으며 양측 청각이 완전히 소실될 경우 맥브라이드식 장애평가상 노동력 상실률 100%에 해당되어 정상적인 경제활동이 불가능하게 되고 이로 인한 사회경제적 손실은 막대하다. 또한 청각세포와 같은 특수 세포는 한번 손상을 받으면 재생이나 회복이 불가능하기 때문에 감각신경성 난청은 현재까지 특별한 치료법이 없는 상황이며 치료에 있어 무엇보다도 예방이 중요하다. 청각손상의 원인은 약물독성 뿐만 아니라 소음에 의한 소음성난청이 있다. (Hwakins, *et al.* 2005) 또한 aminoglycoside계의 항생제와 cisplatin과 같은 항암제 등에 의해 발생하는 이독성 난청, 과도한 소음에 노출될 경우 발생하는 소음성 난청과 노화와 관련된 퇴행성 변화에 의하여 발생하는 노인성 난청 등이 주된 원인이었으나 최근 암에 대한 방사선치료에 의한 후유증이 또 하나의 중요한 원인이 되고 있다.

청각 세포주에서 γ 방사선의 노출이 증가할수록 세포사멸이 일어난다고 보고하고 있으며, (Low, *et al.* 2006) 방사선에 의한 신경독성이 있음이 보고되었다. 또한 송사리의 알에 방사선을 조사하면 모든 알이 살아있지만 뇌세포가 사멸한다는 것이 관찰되었다. (Yasuda, *et al.* 2006) Cisplatin과 gentamicin은 이독성이 있다고 알려져 있으며, OC-k3 세포에서 활성산소의 생성을 증가시켜 농도가 증가할수록 세포사멸이 일어난다고 보고하였으며, (Bertolaso, *et al.* 2001) 청각유모세포주인 HEI-OC1 세포에서도 유사한 결과를 보였다. (Kalinec, *et al.* 1999) 또한, gentamicin을 처리한 후 33°C 세포 배양기에서 24시간 처리한 결과 caspase 3 활성도의 증가와 세포사멸이 유발된다는 것이 보고되었다. (Low, *et al.* 2008) 그러나 방사선에 의한 청각손상에 대한 연구가 많이 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 청각손상에 대한 세포내에서의 연구와 동물실험을 통

하여 방사선에 의한 세포사멸을 알아보고 나아가서는 그 기전을 분석하고자 하였다.

활성산소는 세포의 기능 유지에 매우 중요한 역할을 하는 물질이지만 과량이 존재할 경우에는 세포 단백질, 지질 및 DNA 등을 손상시켜 세포 자멸사를 유도한다. 본 연구에서는 HEI-OC1 세포에서 방사선 조사 후, 활성산소의 생성을 알아보고자 X-ray 방사선을 20Gy 단일조사한 후 24시간 후에 활성산소를 측정하였다. DCFDA는 많은 세포의 활성산소를 측정하는데 효과적인 방법으로 본 실험에서도 세포에 DCFDA를 처리하는 방법으로 활성산소를 측정하였다. (Ogawa, *et al.* 2003) 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 방사선을 조사한 세포에서는 활성산소의 양이 증가한 것을 확인할 수 있었으며 이를 통하여 방사선에 의해 활성산소의 양이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 또한 TUNEL 실험의 결과 대조군에서는 사멸된 세포가 거의 보이지 않은 것에 비해 방사선을 처리한 군에서는 사멸된 세포가 많이 보이는 것으로 보아 방사선에 의해 세포가 손상된다는 것을 알 수 있었다. Annexin-V와 FITC 실험에서도 대조군에 비해 방사선을 처리한 군이 세포의 사멸이 더 많이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 동물실험의 결과 방사선을 조사한 군에서 지브라피쉬의 신경소구가 대조군에서와 다르게 쪼개져 보이는 것을 형광현미경하에서 관찰할 수 있었으며, 이를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 kinocilium과 stereocilia가 잘려져 있는 것을 관찰하였다. 이를 통하여 방사선에 의해 지브라피쉬의 kinocilium과 stereocilia에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

녹차는 동백나무 차 잎에서 추출한 것으로 Tannin 성분의 catechin의 함량에 의해 Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin gallate (ECG), Epicatechin (EC), Catechin으로 나뉜다.

Kim 등은 cisplatin에 의한 이독성이 EC에 의해 보호된다고 보고하였다. (Kim, *et al.* 2008) 또한 γ -radiation에 의해 유도되는 DNA의 손상을 EC가 보호한다고 보고되어 있으며 (Cherupally *et al.* 2008), oxLDL에 의한 신경세포의 사멸에 대해 EC가 보호한다고 보고되어 있다. (Hagen *et al.* 2001) 그러나 EC에 대한 연

구는 많이 진행되지 않은 상태이며, 방사선에 따른 이독성에 대한 EC의 보호효과에 대한 연구는 되어있지 않다. 이에 본 논문에서는 HEI-OC1 세포와 동물실험으로 지브라피쉬와 백서에서 방사선에 의해 사멸되는 청각세포에서의 EC의 효과를 확인하였다. 먼저 MTT assay를 시행한 결과 방사선에 의해 손상되는 세포가 EC의 농도가 증가할수록 보호되고 있음을 확인할 수 있었다. MTT assay를 시행한 결과 80 μ M부터 대조군과 유사한 결과를 보였으나, 다른 실험 결과에 의해 적정 농도를 200 μ M로 정하여 실험을 진행하였다. DCFDA를 이용하여 활성산소를 측정된 결과 방사선에 의해 증가한 활성소가 EC에 의해 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 미토콘드리아 막 투과성 측정에서는 JC-1으로 염색하여 FACS로 미토콘드리아의 막전위를 측정하였다. 미토콘드리아가 활성산소에 노출되면 미토콘드리아 내막의 막 단백질들이 투과 전이 구멍(Mitochondria permeability transition pore, PTP)을 형성하게 되며, 그 결과 산화적 인산화 장애를 받게 되어 활발한 세포대사를 의미하는 미토콘드리아 막 투과성이 감소된다. (Bernardi, *et al.* 1994) 미토콘드리아 막 투과성이 감소되면 ATP를 합성할 수 없고 세포 내 Ca^{2+} 의 증가가 일어나게 된다. 증가된 세포 내 칼슘은 미토콘드리아 속에 남아 생물 에너지 기능장애를 일으키게 되고, 활성산소를 생성시키는 효소들을 활성화 시킨다. (Benardi. 1999) 미토콘드리아 막 투과성이 감소하면 JC-1의 형광발현도가 증가하며, 본 실험결과에서 대조군과 비교하였을 때 방사선을 조사한 군에서는 JC-1의 형광발현도가 1.5배 이상 증가하였으며, 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 대조군과 유사한 발현정도를 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 세포의 기전을 확인하여 western blot을 한 결과 방사선에 의해 p53과 MAPK pathway가 방사선 처리 15분 후에 발현되다가 시간이 지남에 따라 발현이 감소한다는 것을 확인하였다. 본 결과를 토대로 EC처리 후 방사선 15분 쯤에 western blot을 시행한 결과 다른 기전에는 큰 변화가 없었으며 JNK의 발현만 감소하는 것을 확인할 수 있었다. ERK와 JNK와 같은 MAPK 기전은 세포의 생존, 복원, 분화, 사멸과 연관이 있다. (Kong, *et al.* 2000, Yuan *et al.* 2000) Ionizing 방사선에 의한 세포손상에 의해 stress-activated protein

kinase 혹은 c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signalling pathway가 활성화되며, JNK는 c-Jun의 NH₂-terminal부분이 인산화 되면서 산화 스트레스 손상에 따른 세포사멸을 조절한다. (Marcel, *et al.* 2000) 이러한 JNK는 방사선에 의해 유도되는 청각세포의 손상을 보호하는데 관여할 것이라고 보고 되어있다. (Low, 2006) 또한 신경세포에서 flavonoid가 ox-LDL에 의해 유도되는 세포의 사멸이 JNK 기전에 의해 보호된다고 보고하였다. (Hagen, *et al.* 2001) 본 연구에서는 JNK가 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서 감소한 것으로 보아 방사선에 의한 세포의 손상에 대한 EC의 보호가 JNK를 감소시킴으로 보호된다고 추측하였다. 동물실험에서 지브라피쉬의 신경소구에 형광을 붙여 관찰한 결과 대조군에 비해 방사선을 받은 군에서 신경소구가 죽진 않지만, 쪼개지는 현상을 관찰할 수 있었다. 그러나 방사선과 EC를 함께 처리한 군에서는 대조군과 유사한 형태로 보호 된다는 것을 확인할 수 있었다. Kim 등의 연구결과에서는 cisplatin에 의한 이독성에 의해 신경소구의 형광 발현이 현저하게 줄어든 것과는 다른 결과를 보인다는 것을 확인하였다. 이를 고정액에 고정하여 주사 전자 현미경으로 확인한 결과 Kim 등의 논문에서는 cisplatin에 의해 신경소구의 모양이 변하거나 그 부분이 아예 소실된 것과 다르게 방사선을 조사받은 신경소구에서는 아예 사라지거나 모양이 변형되지는 않았지만, kinocilium이 잘려진 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 형광현미경 하에서 신경소구의 모양이 아예 소실되어 관찰이 거의 불가능했던 cisplatin 처리 후의 손상과는 달리 대조군과는 다르지만 관찰할 수 있었던 것이 완전히 손상되어 소실된 것이 아니라 kinocilium만 잘려나가서 일 것 이라고 생각하며, 또한 EC가 이러한 손실들을 보호한다는 것을 확인할 수 있었다.

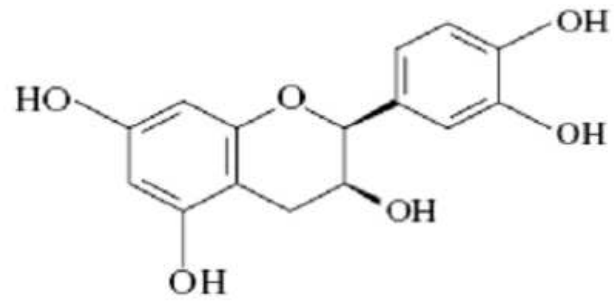
따라서 청각유모세포주인 HEI-OC1에서 EC가 방사선에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 낮추고, 미토콘드리아 막 투과성의 소실을 억제하여 산화스트레스로 인한 세포의 손상을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 EC에 의한 항산화 작용에 따른 세포 보호 기전의 구체적인 분석과 동물실험을 통하여 조직학적인 변화의 분석이 필요하며, 이러한 연구결과를 토대로 방사선에 의한 청각기능을

보호할 수 있는 치료약물 개발에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이라 생각한다.

v. 결 론

두경부암 환자의 치료방법 중 하나인 방사선은 청각세포의 사멸을 유발한다. 이에 따라 청각유모세포주인 HEI-OC1에서 방사선의 양이 증가할수록 세포가 사멸된다는 것을 알 수 있었으며, 20Gy의 방사선에 EC를 농도별로 처리한 결과 농도에 비례하여 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. FACS를 시행하여 세포 고사율을 확인한 결과 방사선에 의해 세포 고사율이 증가하며 EC에 의해 감소되는 것을 확인하였으며, ROS와 MMP를 측정된 결과 방사선의 의해 그 양이 증가하였다가 EC에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 또한 TUNEL assay를 시행한 결과 방사선을 조사한 군에서 세포 손상에 따른 형광발현을 확인하였으며 EC에 의해 세포의 손상이 보호되는 것을 확인하였다. western blot을 시행한 결과 p53과 MAPK pathway인 p38, ERK, JNK가 방사선 조사 후 강한 발현을 보이는 것을 확인하였으며, 주로 JNK가 EC에 의해 발현이 감소하는 것으로 보아 JNK pathway가 관여하는 것으로 판단되었다. 생체 실험으로 zebrafish의 신경소구를 관찰한 결과 방사선에 의해 발현이 감소하며 EC에 의해 보호되는 것을 확인하였으며, 주사전자현미경에서 관찰한 결과 방사선에 의해 잘려나간 kinocilium이 EC에 의해 보호되는 것을 확인하였다. 또한 백서에서는 뇌간유발전이 청력측정의 결과 방사선에 의한 청력 손실이 EC에 의해 보호되는 것을 확인하였다.

이와 같은 연구결과를 종합해 볼 때 방사선에 의한 청각세포의 손상을 EC가 해부학적 뿐만 아니라 기능적으로도 보호한다는 것을 알 수 있었다.



(+)-Epicatechin (EC)

Fig 1. The structure of epicatechin

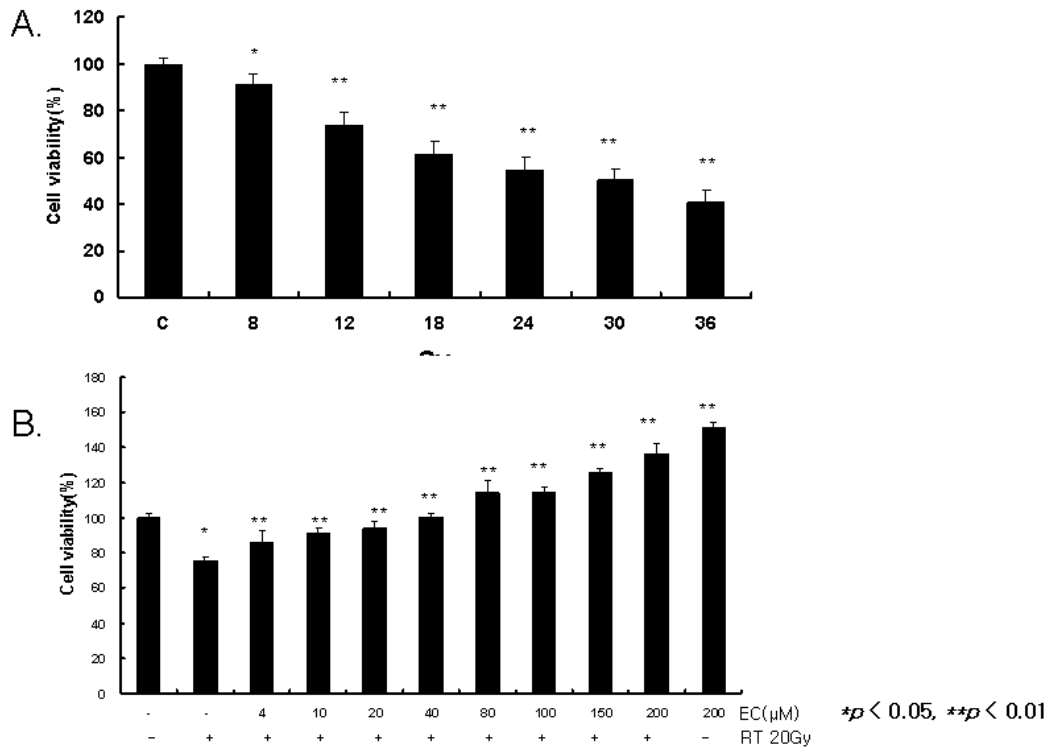


Fig2. Effect of epicatechin on viability HEI-OC1 cells after treatment with radiation. Cell were pre-treated with various concentrations of EC for 4hr, and followed by the addition of 20Gy radiation for 24hr. Cell viability was measured by MTT assay.

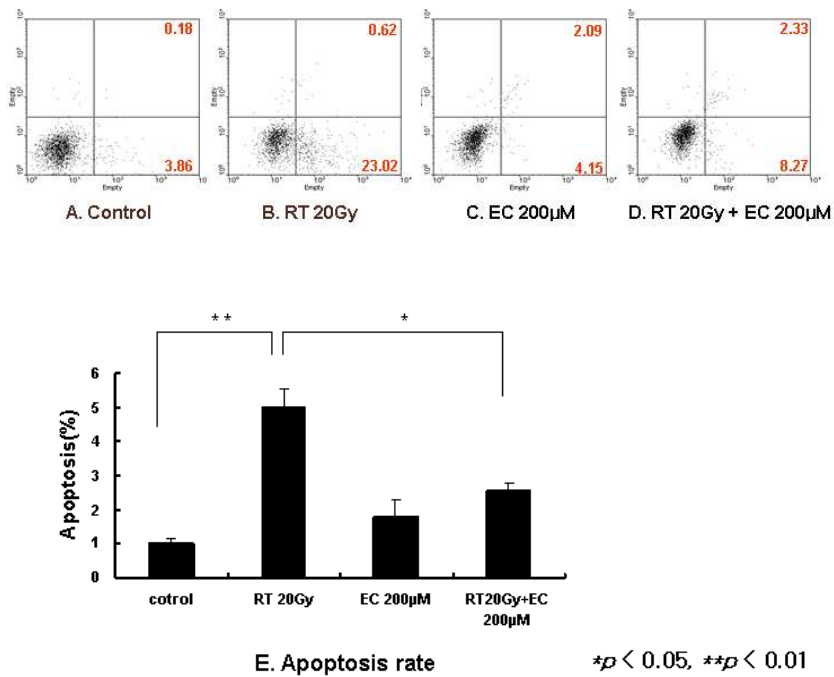


Fig 3. Apoptosis was analyzed by flow cytometry using annexin V-FITC, propidium iodide (PI), and represented by the percentage of apoptic cell compared to the control. EC inhibited the apoptosis induced by treatment with radiation. (A) control. (B) Cells were treated with radiation 20Gy. Radiation-induced percentage of apoptosis. (C) Treatment of EC. (D) cells were treated with radiation and EC. EC were protective against radiation-induced apoptosis. (E) The measure was percentage of apoptosis. The results were normalized in relation to testing with control, which was given an arbitrary value (relative percentage of apoptosis) of 100.

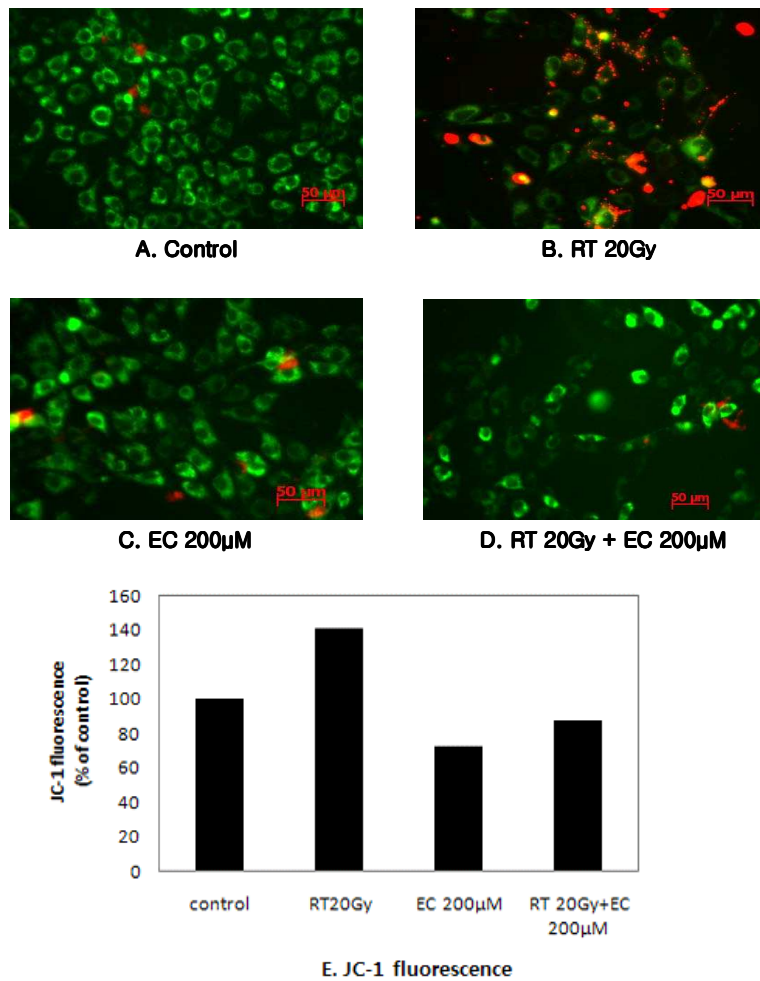


Fig 4. Inhibition of MMP in radiation-treated HEI-OC1 by EC. Cells were treated with radiation and EC and stained with JC-1 to visualize under fluorescent microscope. (A) cell in media alone. (B) Cells treated with radiation 20Gy. MMP was reduced by radiation, leading to an increase of green fluorescence. (C) Cell treated EC 200µM. (D) Cells treated with radiation and EC. EC inhibited the change of MMP and morphological aberrant features of cells induced by treatment with radiation. (E) MMP change was objectively measured using flow cytometry FACScan.

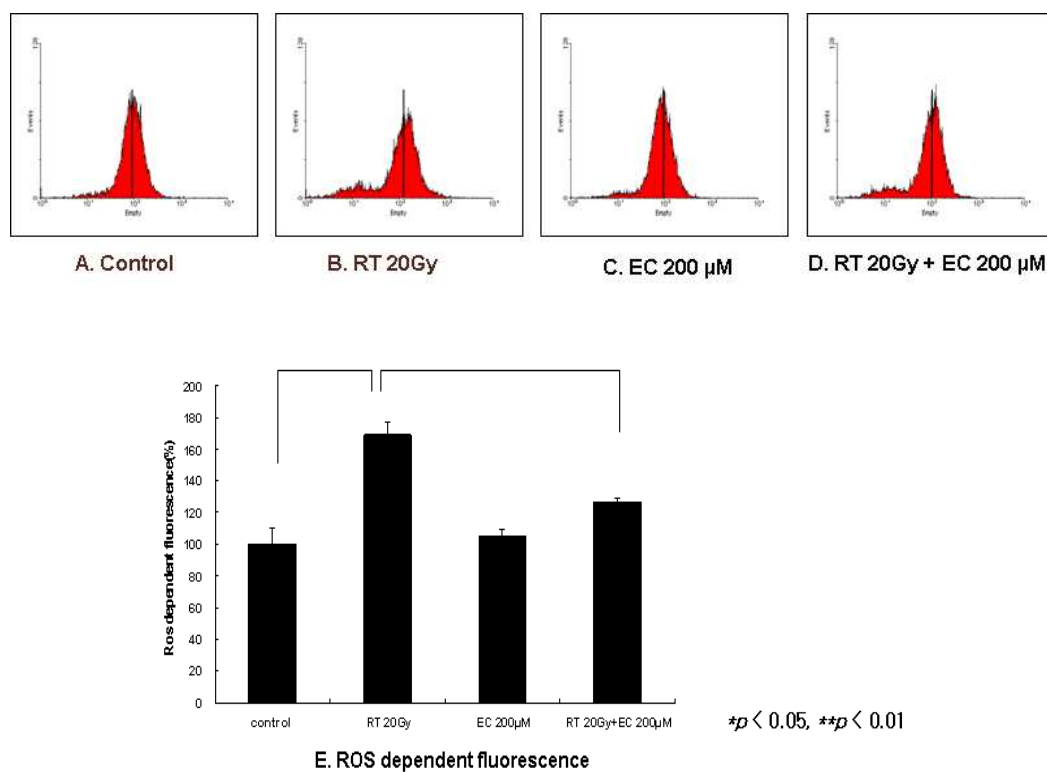


Fig 5. EC reduces intracellular ROS generated by radiation. HEI-OC1 cells were radiation 20Gy in the presence or absence of EC 200μM. DCF fluorescence intensity was measured at 24hr post-radiation in the presence or absence of EC 200μM. Cells were treated with radiation or EC for 24hr. Then, the level of intracellular ROS was monitored by FACScan flow cytometer with a peroxidesensitive fluorescent probe, DCFDA (A) Control. (B) RT 20Gy. (C) EC 200μM. (D) RT 20Gy + EC 200μM (E) Treatment of radiation significantly increased the generation of intracellular ROS. EC significantly inhibited the intracellular ROS generation reduced by radiation. The results (mean±SD) were normalized in relation to control, which was given an arbitrary value (relative DCF fluorescence intensity) of 100.

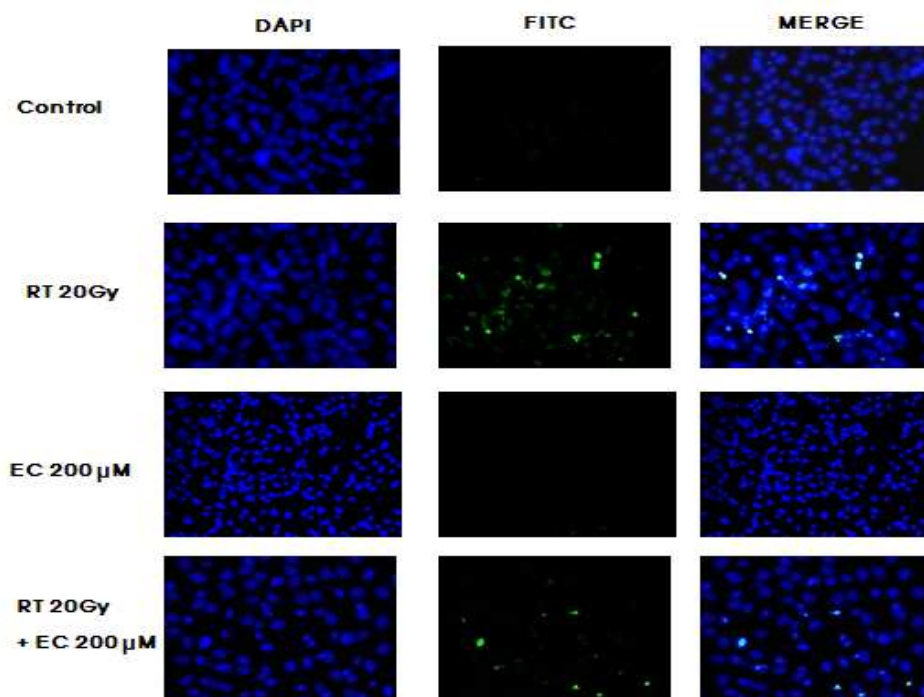


Fig 6. Protective effect of EC against radiation in HEI-OC1 cells were treated with media only. 20Gy radiation alone and co-treatment with radiation 20Gy and EC 200μM. In Hoechst 33258 staining, radiation-induced nuclear condensation, DNA fragmentation and perinuclear apoptotic body of HEI-OC1.

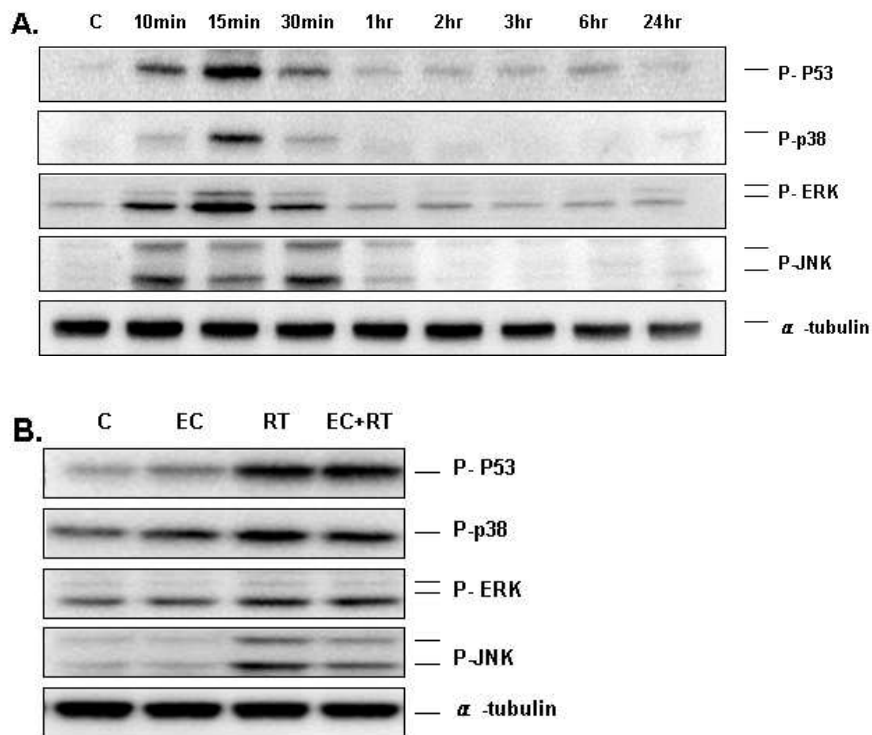


Fig 7. Western blot showing p53 and MAPK pathway. (A) Phosphorylation of p53 and MAPK was increased dramatically at 15min post-irradiation for radiation 20Gy (B) Treatment of radiation-induced p53 and MAPK expression. Co-treatment radiation and EC reduced the p53 and MAPK expression.

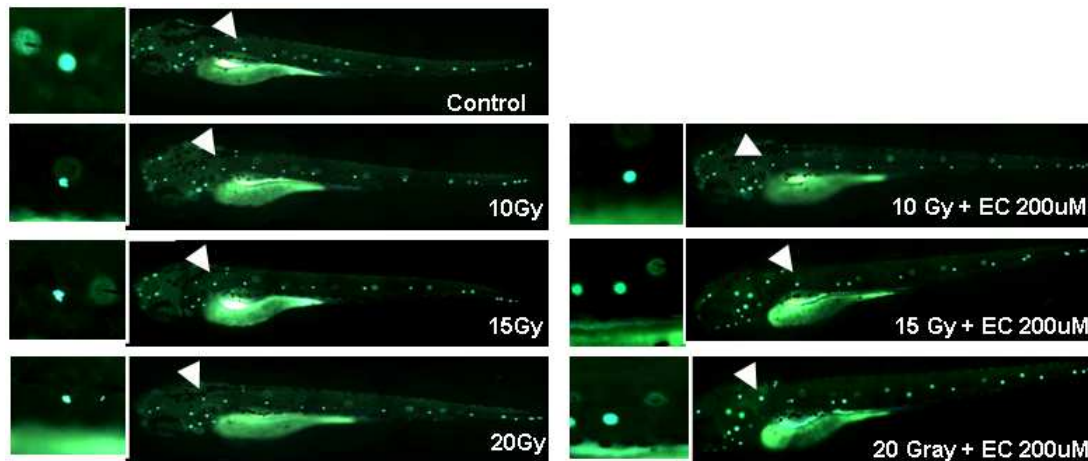


Fig 8. Quantitative zebrafish hair cell assay. 4dpf zebrafish were treated with radiation 20Gy or radiation 20Gy and EC 200 μ M for 24hr. The fish then stained with Yo-pro 1. Neuromasts stereotypically located on the body were stained as white dots. Dose-dependent effects of radiation-induced stereocilia death of hair cells of the neuromast. EC protective against radiation-induced stereocilia death.

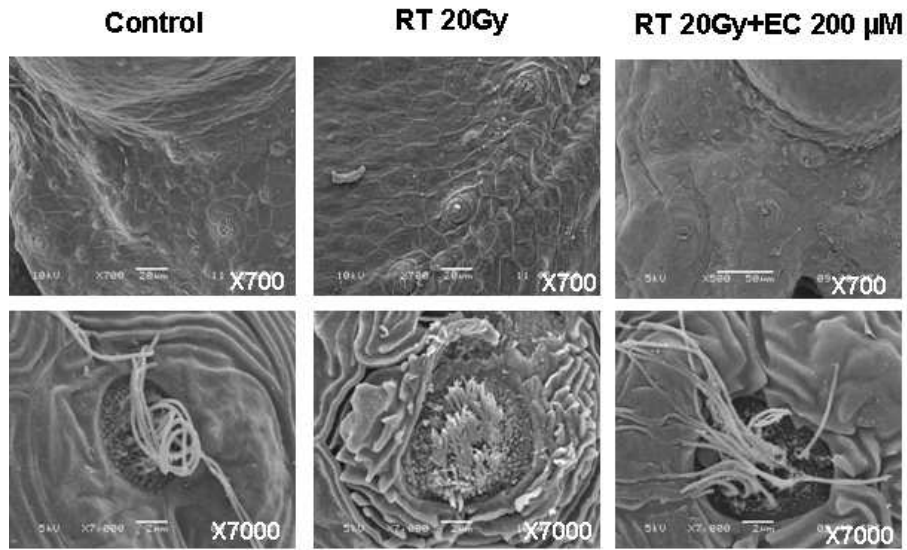


Fig 9. Scanning electron microscopy (SEM) of control (A), radiation 20Gy (B), radiation and EC (C) hair cell. (A) Kinocilium and stereocilia from each hair cell are clearly visible in these section. (B) An exposure to radiation 20Gy resulted in severe morphological damages to kinocilium such as loss or fusion of kinocilium. (C) Treatment of EC provided nearly complete protection against radiation-induced loss of kinocilium and stereocilia in the neuromasts.

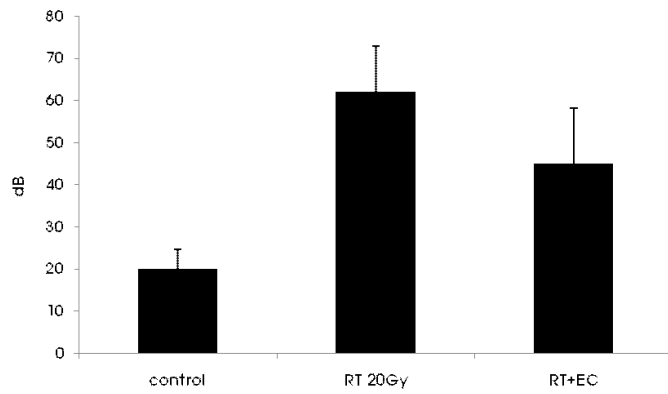


Fig 10. Measuring thresholds of Auditory Brainstem Responses. Mean ABR thresholds for radiation 20Gy and co-treatment radiation plus EC.

참 고 문 헌

1. Babu PV, Liu D: Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem* 15(18): 1840-1850, 2008
2. Basu A, Lucas EA: Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutr Rev* 65(8 Pt 1): 361-375, 2007
3. Bernardi P: Mitochondria in muscle cell death. *Ital J Neurol Sci* 20(6): 509-517, 1999
4. Bertolaso L, Martini A, Bindini D, Lanzoni I, Parmeggiani A, Vitali C, Kalinec G, Kalinec F, Calinec F, Capitani S, Previati M: Apoptosis in the OC-k3 immortalized cell line treated with different agents. *Audiology* 40: 327-335, 2001
5. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeffer DR: Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26(5): 509-517, 1994
6. Bohne BA, Marks JE, Glasgow GP: Delayed effects of ionizing radiation on the ear. *Laryngoscope* 95: 818 - 828, 1985
7. Borges L, Rea KL, Chen JN, Wei P, Kaufman S, Scully S, Pretorius JK, Farrell CL: A protective role for keratinocyte growth factor in a murine model of chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66(1): 254-262, 2006

8. Borsanyi SJ, Blanchard CL: Ionizing radiation and the ear. *JAMA* 181: 958-961, 1962
9. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R: Beneficial effects of green tea - a review. *J Am coll Nutr* 25(2): 79-99, 2006
10. Chamber MS, Weber RS, Garden AS: Radiation-induced xerostomia. *Head Neck* 29(1): 58-63, 2007
11. Charles M, and Haskell M: Cancer treatment. 3rd ed. W. B. Saunders Co, Philadelphia, pp.373, 1990
12. Cherupally Krishnan Krishnan Nair, Veena Prakash Salvi: Protection of DNA from gamma-radiation induced strand breaks by Epicatechin. *Mutat Res.* 31;650(1):48-54, 2008
13. Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A: The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr* 25(5): 790-796, 2006
14. Gamble JE, Peterson EA, Chandler JR: Radiation effects on the inner ear. *Arch Otolaryngology.* 88: 64 - 69, 1968
15. Graham HN: Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21(3): 334-350, 1992

16. Gran C, Moller K, Oerregaard M, *Overgaard J, Elbrend O*: Sensori-neural hearing loss in patients treated with irradiation for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 21: 723-728, 1991
17. Guinand N, Dulgueror P, Giger R: Radiation-induced xerostomia: prevention, treatment, perspectives. *Rev Med Suisse* 3(127): 2225-2229, 2007
18. Hagen SCHROETER, Jeremy P.E. SPENCER, Catherine RICE-EVANS, Robert J. WILLIAMS: Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J* 15:358(Pt 3):547-557, 2001
19. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O: Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A β ₁₋₄₀ in rats. *J Nutr Biochem*. 19(9): 619-626, 2008
20. Hua C, Bass JK, Khn R, Kun LE, Merchant TE: Hearing loss after radiotherapy for pediatric brain tumors: effect of cochlear dose. *Int J Radiation Oncology Biol.Phys* 1-8, 2008
21. Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Finnegan-Olive T, Lou YR, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS: Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 13(6): 947-954, 1992
22. Hwakins JE, Schacht S: Sketches of otohistory. part 10: Noise induced hearing loss. *Audiol Neurotol* 10: 305-309, 2005

23. Kalinec F, Kalinec G, Boukhvalova M, Kachar B: Establishment and characterization of conditionally immortalized organ of corti cell line. *Cell Biol Int* 1999 ; 23: 175-184, 1999
24. Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22(2): 287-294, 2001
25. Katiyar SK, Elmets CA: Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection(Review). *Int J Oncol* 18(6): 1307-1313, 2001
26. Keleman G: Radiation and ear. Experimental studies. *Acta Otolaryngol* 184: suppl 184:1-48, 1963
27. Kim CH, Kang SU, Pyun J, Lee MH, Hwang HS, Lee H: Epicatechin protects auditory cells against cisplatin-induced death. *Apoptosis* 13(9): 11184-11194, 2008
28. Kim EC: Effect of EGCG on amyloid β peptide induced cell death in PC12 cells. Kuangju, University of Chonnam, 2004
29. Kim HJ: Screening of Anti-oxidants against the dopaminergic neurotoxicity of polychlorinated biphenyls(PCBs). Kongju, University of Kong Ju, 2004
30. Kim jong il: Protective effects of Epicatechin derivatives on the UV

- Light-induced skin cell damages. Korea Advance Institute of Science AND Technology, 2000
31. Leach W: Irradiation of the ear. *J Laryngol.* 79: 870-880, 1965
32. Lee EJ. Antioxidative effects and preventive effect on plasmid DNA damage of Rooibos tea and green tea extracts. Daejeon, University of Hannam, 2003
33. Low WK, Fong KW: Long-term hearing status after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 25(1): 21 - 24, 1998
34. Low WK, Sun L, Tan MG, Chua AW, Wang DY. L-N-Acetylcysteine protects against radiation-induced apoptosis in a cochlear cell line. *Acta oto-Laryngologica.* 2008 ; 128: 440-445, 2008
35. Low WK, Tan MGK, Li S, Chua AWC, Goh LK, Wang DY: Dose-dependent radiation-induced auditory neural cell hair cell toxicity. *Apoptosis* 11: 2127-2136, 2006
36. Marcel Verheij, Harry Bartelink: Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 133-142, 2000
37. Mencher GT, Novotny G, Mencher L, Gulliver M: Ototoxicity and irradiation: additional etiologies of hearing loss in adults. *J Am Acad Audiol* 6: 351-357, 1995

38. Meyers, E. N, and Suen, J.Y: Cancer of the head neck. 2nd ed. New York, Churchill Livinston, Inc. pp.160, 1989
39. Mihakea O, Amold AC: Side effect of head and neck radiotherapy: optic neuropathy. *Oftalmologia* 52(1): 36-40, 2008
40. Morley N, Clifford T, Salter L, Campbell S, Gould D, Curnow A: The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatl Photoimmunol Photomed* 21(1): 15-22, 2005
41. Moretti JA: Sensorineural hearing loss following radiotherapy to the nasopharynx. *Laryngoscope* 86: 598-602, 1976
42. Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A, Kariya S, Hamasato S, Sequchi H, Yoshida S: Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cell. *Int J Med* 11: 149-152, 2003
43. Patterson JM, Hildreth A, Wilson JA: Measuring edema in irradiated head and neck cancer patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116(8): 559-564, 2007
44. Reddign SW: Cancer therapy-related oral mucositis. *J Dent Educ* 69(8): 919-929, 2005
45. Rubin, P: Clinical oncology for medical students and physicians. 6th ed. New York, American Cancer Society, Inc. p.230, 1983

46. Schuknecht HF, Karmody CS: Radionecrosis of the temporal bone. *Laryngoscope* 76: 1416 - 1428, 1966
47. Sei one Shin, Sung kyu Kim, and Myung se Kim: 고선량을 강내 조사를 이용한 두경부암의 방사선 치료. *The yeungnam Univ. Med J* 7(2): 109-114, 1990
48. Seo BW, Il SS, Baek WK, Cho JW, Kim SP, Ryu YO Seo BY, Seo SI: The effect of Epigallocatechin gallate on ultraviolet B irradiated cultured human skin fibroblasts. *대한피부과학회지* 39(5): 519-528, 2001
49. Shin DS: The neuroprotective effect of EGCG(Epigallocatechin-3-gallate) on rat hippocampal organotypic slice culture from NMDA(N-methyl-D-aspartate) induced neurotoxicity. Seoul, University of Chungang, 2006
50. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiram G: Enhancement of antioxidant defense system by Epigallocatechin-3-gallate during gleomycin induced experimental pulmonary fibrosis. *Biol Pharm Bull* 31(7): 1306-1311, 2008
51. Ulger S, Ulger Z, Yildiz F, Ozyer E: Incidence of hypothyroidism after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol* 24(1): 91-94, 2007
52. Yang SW, Lee BR, Koh JW: Protective effects of epigallocatechin gallate after UV irradiation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Korea J Ophthalmol* 21(4): 232-237, 2007

53. Yasuda T, Aoki K, Matsumoto A, Maruyama K, Hyodo-Taguchi Y, Fushiki S, Ishikawa Y: Radiation-induced brain cell death can be observed in living Medaka embryos. *J Radiat Res* 47: 295-303, 2006
54. You KH. Protein kinase C-mediated neuroprotective action of (-)-epigallocatechin-3-gallate against Abeta1-42-induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 2008

Protection effect of EC on radiation-induced cell death of auditory cell *in vitro* and *in vivo*

Junghee Pyun

Department of Biomedical Sciences
The Graduate School, Ajou University.

(Supervised by Associate Professor Chul-Ho Kim)

Radiation is widely used to treat various cancers but promotes ototoxicity at higher doses. In this study, the effect of epicatechin(EC) on radiation-induced hair cell death was investigated in a cochlear organ of Corti-derived cell line, HEI-OC1, and *in vivo* in Zebrafish and rat. Radiation promoted apoptosis and altered mitochondrial membrane potential in HEI-OC1 cells. EC inhibited cisplatin-induced apoptosis and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. Labelling of Zebrafish lateral line hair cells by the fluorescent dye YO-PRO1 was lost and distorted upon exposure to radiation, and EC protected against this radiation-induced loss of labeling in a dose-dependent manner. Scanning and transmission electron micrographs show that treatment with EC protected against radiation-induced loss of kinocilium and stereocilia in zebrafish neuromasts. These results suggest that EC prevents radiation-induced ototoxicity by blocking ROS generation and by preventing changes in mitochondrial membrane potential.

Key words : Epicatechin, radiation, HEI-OC1, ototoxicity, ROS, apoptosis