

Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter가 결핍된 백서에서 전정 기관의 형태학적 변화

가천의과대학교 이비인후과학교실¹, 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실²,
연세대학교 원주의과대학 이비인후과학교실³
이주형¹, 최재영², 정상호³, 이원상²

Morphologic Change of the Vestibular Organ in the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Deficiency Mouse

Ju Hyoung Lee, M.D.¹, Jae Young Choi, M.D.², Sang Ho Jung, M.D.³, Won-Sang Lee, M.D.²

Department of Otolaryngology, Gachon University of Medical and Science¹, Incheon,

Department of Otolaryngology, Yonsei University College of Medicine², Seoul,

Department of Otolaryngology, Yonsei University Wonju College of Medicine³, Wonju, Korea

Background and Objectives: The Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter-1 (NKCC1) is a member of the cation-coupled chloride transporter that participates in salt transport and cell volume regulation in diverse tissues. NKCC1 deficient mice exhibit deafness, and have structural alterations in the cochlea. In addition to hearing loss, NKCC1-deficient mice show a shaker-waltzer behavior, which suggests a vestibular system defect. This study investigated the morphology of the vestibular system of NKCC1-deficient mice. In addition, this study evaluated whether NKCC1 mRNA and its protein are expressed in human vestibular end organs.

Materials and Method: NKCC1-deficient and wild type mice aged 4~5 weeks were sacrificed. Their heads were cut in the midsagittal plane, fixed and decalcified. For light microscopy, 5 m sections were cut, and stained with hematoxylin and eosin. Human vestibular end organs were harvested during acoustic tumor surgery via translabyrinthine approach. Some of these end organs were used for the total mRNA extraction and the remainder was used for immunostaining. RT-PCR was performed for NKCC1.

Results: The scala media of the cochlear of the NKCC1-deficient mice were collapsed but the bony labyrinth of the cochlea appeared unaffected. However, the semicircular canals (SCCs) were much smaller than those in the wild type. Furthermore, the SCCs were completely missing in some NKCC1-deficient mice. NKCC1 mRNA was expressed in both human macula and crista ampullaris and its protein was expressed mainly in the transitional and dark cell area of the human crista ampullaris.

Conclusion: NKCC1 may be essential for maintaining the vestibular morphology and its function in mice and NKCC1 is well expressed in human vestibular end organs.

Key Words : Ion transport, Vestibule, Knockout mouse

• 교신저자 : 이 원 상
120-750 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
Tel: 02-2228-3600, Fax: 02-393-0580
E-mail: wsleemd@yumc.yonsei.ac.kr

* 이 논문은 2005년도 범석학술장학재단 연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서 론

내이의 림프액은 두 가지 성분으로 구성된다. 막성미로(membranous labyrinth) 내에는 내림프액(endolymph)이 들어 있고 막성미로와 골성미로(bony labyrinth) 사이에는 외림프액(perilymph)이 들어있다. 와우의 고실계(scala tympani)와 전정계(scala vestibuli)에는 외림프액이, 중심계(scala media)에는 내림프액이 존재하며, 전정기관에서는 이석기관(otolith organ)인 난형낭(utricle)과 구형낭(sacculle), 세 개의 반고리관에는 내림프액이 존재한다. 내림프의 이온성분은 세포내액과 유사한 조성(고농도의 K^+ , 저농도의 Na^+)을 가지고 있으며, 외림프액의 이온성분은 세포외액의 조성(저농도의 K^+ , 고농도의 Na^+)과 유사하다. 내림프액은 혈관선조(stria vascularis)의 변연세포(marginal cell)에서 생성되며 내림프낭(endolymphatic sac)에서 흡수되는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 내림프액이 세포내액과 유사한 농도를 유지하기 위해서는 계속해서 K^+ 이 내림프액 내로 들어와야 하는데, 이러한 내림프액 내로의 K^+ 의 이동은 변연세포의 기저외측부에서 $Na, K\text{-ATPase}$ 와³⁾ $Na^+K^+2Cl^-$ cotransporter (NKCC1)^{2,4)}를 통하여 이루어진다고 알려져 있다. NKCC1은 상피세포와 비상피세포 모두에서 세포막을 통해 양이온인 Na^+ 와 K^+ 가 두 개의 Cl^- 와 같이 이동하여 전해질 균형을 맞추는 체계이며, 신장, 비점막 뿐만 아니라 전해질 이동이 있는 모든 기관에 분포한다. NKCC1의 역할은 전해질의 이동과 항상성유지, 세포의 용적 조절 등이 주된 것으로 보고되어지고 있다.^{5,6)} 내이에서 NKCC1이 고농도로 발현되는 것을 보고한 경우가 있으며, 변연세포의 기저외측 뿐만 아니라 말초전정계의 암세포(dark cell)에서도 발현되는 것으로 보고된바 있다.^{7,9)}

지금까지 NKCC1이 결핍된 귀에서 광학현미경적 이상에 대한 연구는 몇 차례 보고된바 있었으며, 이들 모두 와우의 구조 변화에 대한 것만 기술이 되어있다.¹⁰⁻¹²⁾ 대표적인 와우의 구조 이상은 Reissner막의 와해(collapse), 이로 인한 내림프강의 소실 또는 축소 등이고^{11,12)} 그 외에도 개막(tectorial membrane)에의 calcium 침착, Corti 관(tunnel of Corti)의 소실, 유모세포(hair cell)와 지지세포(supporting cell) 수의 감소 등이 있다. 전정계의 이상에 대한 조직학적 연구는 아직 미진한 상태이다.

NKCC1이 결핍되었을 때 나타나는 구조적 이상뿐만 아니라 여러 신체의 기관에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 몇 차례 있었다. 주로 NKCC1이 결핍된 백서에서 실험을 한 것이며, 대표적인 이상은 불임, 장에서 염소(chloride) 분비 감소, 타액의 심각한 감소, 전정 기능 장애로 인한 평형감각 이상 및 청각 소실 등이 보고되었다.^{10,11,13)}

전정 말초 기관에서는 전해질의 이동을 통해 내림프액의 전해질 농도가 조절되므로, NKCC1 같은 전해질 이동 체계가 존재할 가능성이 높으나, 아직 이에 대한 연구가 없다. NKCC1의 기능이 파괴되어 있다면 전정 말초 기관의 구조에 어떠한 영향을 미치는지도 연구가 안 되어있는 상태이다. 본 연구의 목적은 NKCC1이 결핍된 백서(knock out mouse)에서 정상 백서와 비교하여 전정 기관의 구조 변화를 알아보고자 함이다. 또한 인체의 내이에서 NKCC1의 기능을 밝히기 위하여, 청신경종양 수술 시 채취한 인체의 말초 전정 기관에서 NKCC1의 발현을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 조직의 채취

1) NKCC1 결핍 백서

연구에 이용 예정인 백서는 *Sla12a2*^{Δ506-521} 종이다. 이는 NKCC-1형성에 관여하는 유전자(*Sla12a2* gene)을 파괴시켜 생성시켰으며, Pace 등¹³⁾이 만든 종을 이용하였다. 실험 동물의 처리 과정은 연세대학교 의과대학 동물실험실의 규정과 헬싱키 선언을 준수하였다.

2) 인간의 말초 전정 기관

인간에서 청신경종양 등으로 경미로 종양절제술(translabyrinthine approach)를 시행 시에 3개의 반고리관과 이석 기관에서 조직을 채취하였다.

2. 조직의 처리

1) 백서

백서의 gm 당 1.42 mg의 71 mM avertin (2,2,2-tribromoethanol)을 이용해 5마리의 정상 백서와 8마리의 NKCC-1 결핍 백서(knock out mouse)를 마취시킨 후 두 부를 절단한 다음, 두부는 시상면으로 절개하여 뇌를 제거하고 내이를 절제하여 노출시킨 다음에 4℃

의 포르말린 고정액에 24시간 고정시켰다. 고정된 조직은 0.1M EDTA 용액에서 탈칼슘화(decalcification)를 시켰다.

2) 인간의 전정말초 기관

경미로 종양절제술 시행시 채취한 전정 말초 기관(총 10예)은 각각의 반고리관(상, 후, 수평) 및 이석기관(난형낭, 구형낭) 부위 별로 분류하여 액화 질소로 급속 냉동시킨 후 영하 80℃로 냉동고에 보존하였다.

3. 조직의 분석

1) 조직학적 연구

탈칼슘화된 조직은 세척 및 파라핀 포매를 시행하였고, 4 μm 두께로 절편을 자르고 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 그 다음 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행한 후 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

2) Total RNA의 분리와 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

경미로 접근법으로 내이수술을 시행할 당시 인체에서 채취한 전정 기관을 이용하여 NKCC1의 발현을 확인하고자 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. NKCC1의 유전자를 증폭하기 위해 사용한 primer 쌍은 5'-GTG GCT TTT TGA TGA TGG AGG TTT G-3' 과 5'-TGA TCT GCC GGT ATG TCT TGG TCT TA-3' 이었다. Total RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였다. NKCC1의 존재를 확인하기 위해 얻어진 total RNA를 DNA로

역전사(reverse transcription)하였으며, PCR시 magnesium chloride의 농도는 1.5 mmol/L로 하였다. 95℃에서 1분간 denaturation시키고, 60℃에서 annealing 과정을 거친 후, 72℃에서 1분간 extension을 시행하였다. 중합효소 연쇄 반응에 의한 산물을 ethidium bromide이 포함된 2% agarose gels(FMC Byproducts, Rockland ME)을 이용하여 분리하고, CSC (chemiluminescence's Detection Module, Retest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 bands를 분석하였다.

결 과

1. NKCC1이 결핍된 백서의 행동

NKCC1이 결핍된 백서는 정상과 비교하여 외관상에는 차이가 없었으나 행동에서 특이한 이상을 보여 정상과 쉽게 구분되었다. 앉아서 정지하고 있을 경우 정상 백서는 움직임이 전혀 없었으나, NKCC1이 결핍된 백서는 실험 대상인 8마리 모두 머리를 고정하지 못하고 좌우로 흔드는 이상 행동을 보였다. 일정한 구간을 이동하게 하였을 경우에 정상 백서는 목표 지점에 일직선으로 동요 없이 이동하였으나, NKCC1이 결핍된 백서는 모든 경우에서 목표 지점에 이르지 못하고 계속해서 중심을 잃고 제자리에서 빙빙 도는 이상 행동(shaker-waltzer behavior)을 보였다. 운동 중에는 평형감을 상실해서 운동 시에 부자연스러운 모습을 보였다. 즉 NKCC1이 결핍된 백서는 모두에서 전정 기능 이상에 합당한 소견을 보였다.

2. 백서 내이의 광학현미경적 관찰



Fig. 1. Histological overview of the inner ear; vestibular organ of normal mouse (A) and NKCC1 deficient mouse (B). (H-E stain, ×20, Bar=50 μm) The diameters of semicircular canal are much reduced in a NKCC1-deficient mouse (B), compared with those of the wild type mouse. The bony framework of vestibular organ of NKCC1 deficient mouse is similar to normal one but endolymphatic spaces are severely atrophied.

정상 백서와 NKCC1이 결핍된 백서의 내이를 광학 현미경을 통해 비교하였다(Fig. 1). 정상 백서의 경우 난형낭과 구형낭은 형태가 모두 잘 유지되고, 이석막(otolithic membrane)과 평형반(macule)의 구조가 잘 유지되고 전정과 반고리관의 형태도 잘 유지되어 있다(Fig. 1A). 정상 백서에 비해 NKCC1이 결핍된 백서는 전정과 반고리관의 크기가 정상 백서에 비해 감소하여 있으며, 불규칙하며 위축된 구조 변화를 보였다. 내림프강(endolymphatic space)이 축소되어 있었고, 상대적으로 외림프강(perilymphatic space)는 확장되어 있었다. 와우의 막성 미로도 전정 기관과 마찬가지로 내림프강이 수축되어 있었다. 그러나 와우의 골성 구조는 정상과 비교하여 큰 차이는 없었다(Fig. 1B).

전정 기관의 전반적 양상을 보면 반고리관과 이석 기관 모두 정상과 비교하여 NKCC1이 결핍된 백서는

막성미로의 위축과 그로 인한 내림프강의 축소, 감각 세포의 감소 및 팽대정의 점액성 구조 소실과 이석과 이석막의 소실로 인한 변형이 관찰되었다(Fig. 2).

정상 백서의 경우 팽대부릉(crista ampullaris)의 형태는 잘 유지되고 있었고, 팽대정의 점액성분도 잘 보였다. 그리고 내림프강 및 외림프강의 형태도 잘 유지되고 있었다(Fig. 3A). 그에 반해 NKCC1이 결핍된 백서의 경우에 막성미로가 팽대정위에 위축되어 있었으며, 그로 인해 내림프강이 좁아져 있었다. 팽대정의 점액성 구조도 소실되어 있었다(Fig. 3B). 반고리관을 수직으로 잘라 반고리관 내부를 관찰하였을 때, 정상 백서의 경우 정상적인 골격이 유지되고 있고, 반고리관 내부에서 막성미로의 형태가 잘 유지되고 있었으며, 내림프강과 외림프강의 형태도 잘 유지되고 있었다(Fig. 3C). 그에 반해 NKCC1이 결핍된 백서에서 반

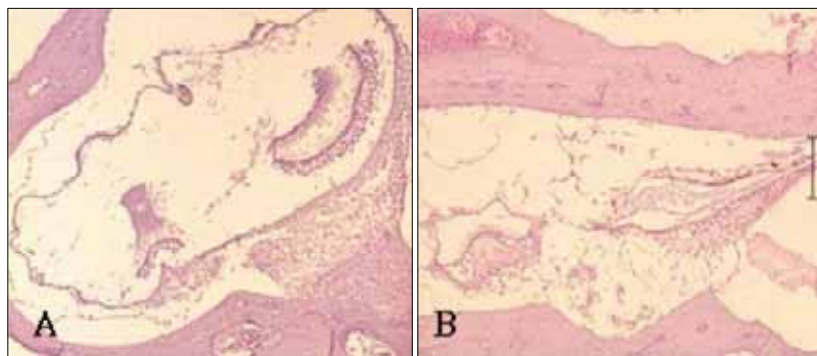


Fig. 2. Histology of the vestibular system; normal mouse (A) and NKCC1 deficient mouse (B) (H-E stain, $\times 40$, bar=20 μm). In contrast to normal mouse, the membranous labyrinth was atrophied on the crista ampullaris and endolymphatic spaces were nearly collapsed. The gelatinous material of cupula was disappeared. Epithelial lining of the utricle has also collapsed onto the otoconia and the number of sensory cell was decreased.

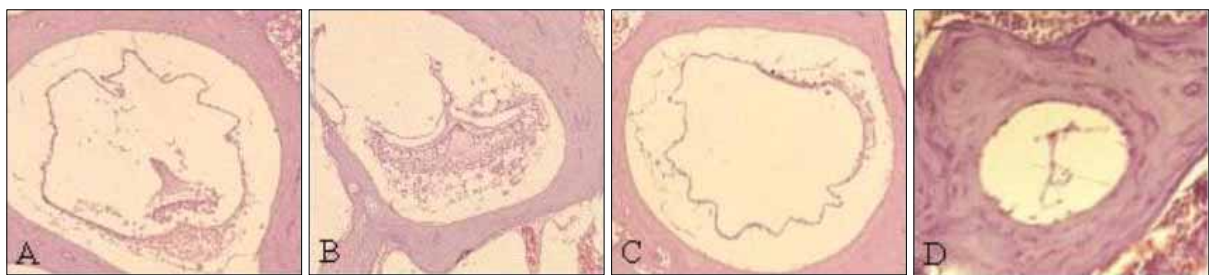


Fig. 3. Histology of semicircular canal; normal mouse (A, C) and NKCC1 deficient mouse (B, D) (H-E stain, $\times 200$). In the ampulla of the SCCs of the NKCC1 deficient mouse the endolymphatic space is severely collapsed upon the crista and the gelatinous cupula was disappeared (B). Sections through the semicircular canals (SCCs) of the NKCC1 deficient mouse confirm that the diameter of the bony wall of SCCs is markedly reduced and that the endolymphatic space was collapsed compared with that of the wild type mice.

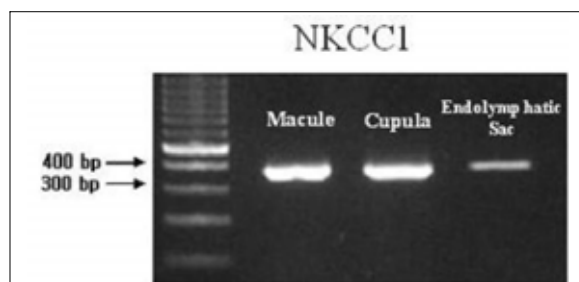


Fig. 4. Expression of mRNA for NKCC1 detected by reverse transcription polymerase chain reaction in the human vestibular organs.

고리관의 크기는 정상에 비해 현저하게 감소하여 있었고, 막성미로의 위축으로 인해 내림프강의 용적이 거의 없을 정도로 좁아져 있었으며, 상대적으로 외림프강의 공간이 넓어져 있는 소견이 관찰되었다. 반고리관 자체의 골격은 어느정도 유지되고 있었다(Fig. 3D).

3. 인체의 말초 전정 기관에서 NKCC1의 발현 확인

수술 중 채취한 인체의 전정 기관에서 시행한 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에서 이석기관의 평형반과 반고리관의 팽대정에서 NKCC1이 강하게 발현되었다. 내림프낭에서는 약하게 발현되었다(Fig. 4).

고 찰

내이에서 전해질 항상성 유지는 주로 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (NKCC)를 이용하는 것으로 알려져 있다.^{2,4)} 이러한 NKCC은 2개의 유형이 존재하는데 세포막의 기저외측에서 분비 기능이 주인 NKCC1과 세포막 침부에서 흡수 기능을 주로 하는 NKCC2이다. NKCC1은 다양한 기관에 분포하는데 반해,^{5,10)} NKCC2는 신장에만 존재한다고 알려져 있다.¹⁴⁾ NKCC1은 전해질 이동이 있는 모든 기관에 존재하며, 양이온인 Na^+ 와 K^+ 이 2개의 Cl^- 와 동시에 세포막을 통해 이동하여 와우내전위(endocochlear potential)을 생성하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 내이에서 NKCC1에 대한 연구는 전정 기관 보다는 주로 와우에 대한 연구가 많이 되어 있으며, 와우 내에서는 혈관조의 변연세포(marginal cell)에서의 발현이 주로 보고되어져 있다.⁷⁾ Dixon (1999) 등은 NKCC1이 내림프액의 형성과 세포 용적 유지에

가장 중요한 역할을 하는 전해질 이동 경로이며, 다른 전해질 이동 통로와도 긴밀한 상호작용을 한다고 설명하였으며, 이러한 NKCC1이 생체에 존재하지 않거나 기능을 안 할 경우 난청과 평형 기능의 장애를 유발하고 해부학적으로도 이상을 일으킬 수 있다고 보고하였다.¹⁶⁾

NKCC1이 결핍될 경우 실제 생체에서는 어떤 변화가 일어나는지 알아보기 위해서 지금까지는 주로 NKCC1을 인위적으로 제거된 백서를 이용한 동물 실험이 이용되어 왔다. NKCC1이 결핍된 백서는 정상에 비해 발육이 부진하고 청력이 떨어져 있으며 균형 감각을 잘못 잡아 제자리에서 빙빙 도는 행동(circling behavior)을 하였으며, 전해질 항상성 유지 실패로 인해 28%에서는 사산하였고, 저혈압, 소화기관 및 호흡기에서 염소이온 분비 감소 등의 소견을 보였다.¹¹⁾ 기존의 연구 중 동물 실험에서 내이의 기능 중 청력은 뇌유발전위 청력검사를 통해 객관적인 결과를 내는데 성공하였고, 실제로 NKCC1이 결핍된 백서에서 고도의 난청이 존재함을 확인한 연구가 있었다.¹¹⁾ 아직까지 평형 기능을 객관적으로 측정하여 보고한 연구는 이루어지지 않았다. 본 연구에서 실험에 이용한 백서는 Pace (2000)가 만든 종을 이용하였으며,¹³⁾ 정상에 비해 과다활동과 계속 제자리에서 빙빙 도는 행동을 보였다. 이러한 운동 중에 계속해서 중심을 잃고 평형감을 상실해서 운동 시 부자연스러운 모습을 보였다. 이러한 점들과 본 연구의 결과에서 보듯이 전해질 불균형에 의한 전정기관의 심한 구조적 변형이 평형 기능의 감소를 일으키는 것으로 사료된다. 아직까지 백서에서 객관적인 평형기능을 측정하는 것에는 한계가 있고, 현재까지의 연구들은 명백한 이상 행동으로 주관적인 판단을 하였는데, 앞으로 객관적인 평형 기능을 평가하는 방법을 개발하여 연구에 응용하면 더 의미 있는 연구가 될 것으로 생각된다.

양이온과 음이온이 같이 세포 내로 이동하는 체계(cotransporter)를 억제하는 이뇨제(furosemide, bumetanide 등)는 이독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 임상적으로 상당히 많이 이용되는 이러한 이뇨제에 의한 이독성으로는 가역적인 감각신경성 난청이 furosemide 투여 후 바로 나타날 수 있다고 하는데, 어지럼과 동시에 나타날 수도 있다.⁸⁾ 이러한 결과는 인체의 전정 기관 내에 NKCC1의 존재 여부를 설명할

수 있다고 설명한 보고가 있다.¹⁰⁾ 내림프강 내에 수분과 K^+ 은 완전히 없어지지 않고 약간 남아 있는데, Na, K-ATPase에 의한 분비 작용에 의해서 NKCC1이 없어도 수분과 K^+ 이 세포 내로 들어가기 때문이다.¹⁸⁾ 결과적으로 NKCC1이 결핍되어 있으면 내림프액의 생성이 안 되기 때문에 내림프액이 감소하게 된다. 세포내로의 K^+ 분비는 NKCC1 뿐만 아니라 Na, K-ATPase 등에 의해서도 일어난다.¹⁹⁾ 그러나 Na, K-ATPase 만으로는 K^+ 의 분비가 충분하지 않고, NKCC1이 K^+ 분비에 더 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 NKCC1이 결핍된 백서에서는 내림프액이 감소하고 Reissner 막의 와해가 나게 된다. 그러므로 NKCC1은 세포 용적 유지 및 생성에 절대적으로 필요한 이온의 통로라고 보고하였다.¹²⁾

Pace는 NKCC1이 결핍된 백서의 와우를 전자현미경으로 관찰하였는데, 특히 소견으로 Reissner 막의 세포층이 정상에서는 2층인데 비해 NKCC1이 결핍된 백서는 3~4층으로 늘어나 있고, 개막에 과립형 침착물이 있으며, 혈관조의 변연세포의 용적이 감소되어 있고 미토콘드리아(mitochondria)의 수가 증가해 있는 이상을 보고하였다.¹²⁾

전정기관의 구조변화에 대한 연구는 잘 이루어지지 않았으며, Flagella 등은 NKCC1이 결핍된 백서의 분비 기관의 구조적 변화를 보고하였는데, 주로 소화기 쪽에 더 비중을 두었고, 전정 기관의 구조 변화에 대해서는 간략하게 기술하여 보고한 바 있다.¹¹⁾ 이 보고에 따르면 정상 백서에 비해 NKCC1이 결핍된 백서의 전정기관의 광학현미경적 소견은 반고리관의 경우 막성미로의 상피 세포는 정상적으로 존재하지만 팽대정 위로 위축된 소견을 보였고, 결과적으로 외림프강이 상대적으로 팽창되어 있는 소견을 보였다. 이석 기관의 경우도 막성미로의 위축과 불규칙한 소견이 보인다고 기술하였는데, 구형낭이 난형낭보다 변형이 심하다고 기술하였다. Dixon 등은 정상과 NKCC1이 결핍된 백서의 내이의 형태학적 비교를 시행하였는데, 와우의 변형을 보고하면서 전정 기관의 기형도 일부 언급하였다. 이 보고에서 반고리관을 이루는 골구조가 얇아져 있으며, 반고리관 자체의 반경도 정상에 비해 NKCC1이 결핍된 백서가 더 작아져 있었으나, 골성 미로 자체의 변형은 없다고 하였다.¹⁷⁾ 세 개의 반고리관 중 수평반고리관의 변형이 가장 심하다고

한다. 그 이유로는 발생학적으로 수평반고리관이 세 개의 반고리관 중 가장 늦게 형성되기 때문이라고 알려져 있다.²⁰⁾ 본 연구에서도 유사한 변형이 관찰되었는데, 반고리관의 크기가 정상에 비해 더 감소되어 있고, 팽대정의 점액 구조가 소실되고 이석막의 파괴가 진행되어 있는 것을 발견하였다. 그러나 와우의 막성미로가 심하게 변형되어 있는 것에 반해 골성 구조는 대체로 정상적인 형태를 유지하였다. 이는 과거 와우의 형태학적 연구와도 같은 결과이다. 반고리관의 형성이 완전히 되지 않은 상태에서도 NKCC1에 의한 전해질 이동은 존재할 것이며, NKCC1이 결핍되어 내림프액의 생성에 문제가 생겨서 내림프액의 용적이 감소하게 되어서 반고리관의 크기가 줄어들고 얇아질 수 있다고 추정된다. 본 연구에서 전정 기관 특히 반고리관의 골 구조의 크기가 정상에 비해 감소되어 있었는데, NKCC1의 결핍에 의해서 막성미로 뿐만 아니라 전정 기관의 골성 구조의 형성에도 영향을 미치는 것으로 사료되며, 와우에 비해 전정기관의 변형이 더 큰 것으로 사료된다. 이는 아마도 외림프강에 대한 내림프강이 차지하는 비중이 와우에 비해 전정기관이 더 크거나 전정 기관의 내림프액 생성과정에서 NKCC1의 비중이 와우보다 더 클 것이라고 추정된다.

내림프공간이 완전히 없어지는 경우는 드문 것으로 보고되고 있다. 그 이유로는 와우에서처럼 전정 기관에서도 NKCC1이 전해질 항상성을 유지하는데 가장 중요한 역할을 하지만, Na, K-ATPase와 같은 다른 전해질 이동 체계가 존재하기 때문일 것이다. 본 연구에서도 막성미로의 위축에 의한 내림프강이 정상에 비해 감소한 것으로 나왔으나, 완전히 내림프강이 없어진 경우는 없었다. NKCC1이 결핍된 백서가 한 방향으로 빙빙 도는 현상을 보이는 것도 전정 기능이 완전히 파괴되지 않고 어느 한 쪽이 상대적으로 덜 파괴되어 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 형태학적인 이상에 의해 평형 기능의 장애가 유발되는 것으로 추정되며, 향후에 더 객관적인 평형 기능 측정이 필요할 것으로 사료된다.

Crouch (1997) 등은 정상 백서의 내이에서 면역화학염색과 역전사중합효소반응을 이용하여 더 정확한 부위를 찾아내었는데, 와우 혈관조 변연세포의 기저외막에서 NKCC1이 주로 존재한다고 보고하였으며, 변연세포 기저막 뿐만 아니라 나선형인대(spiral liga-

ment)의 아래쪽에 위치한 제2형 섬유세포(type 2 fibrocyte)에서도 발현됨을 발표하였다.⁷⁾ 이들은 전정기관에서도 동일한 연구를 시행하였는데, 반고리관의 팽대부릉에 있는 암세포에 주로 발현하는 것으로 보고하였으며, 감각신경 상피 배열의 아래쪽에 있는 섬유세포에서도 발현됨을 보고하였다. 본 연구는 직접 인체에서 채취한 전정기관의 감각 상피에서 역전사 중합효소 반응을 이용하여 NKCC1의 전정 기관 내 발현 위치를 확인하였는데, 이석기관의 평형반과 반고리관의 팽대정에서 강하게 발현됨을 확인하였다. 즉 인간의 말초 전정 질환의 형태 유지와 수분 전해질 항상성 유지에도 NKCC1이 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 결핍될 경우 인간에서도 고도 난청 및 전정 기형을 동반 할 것으로 생각된다. 인간의 전정 기관 내에서 더 정확한 위치 확인을 위하여 차후에 대한 면역화학염색법을 이용하여야 할 것이다.

결 론

NKCC1이 결핍된 백서는 정상 백서와 비교하여 전정 기관에 해부학적으로 많은 변형이 관찰되었다. 와우와 비교하여 전정 기관의 변형이 더 심한 것을 확인하였다. 인간의 말초 전정 기관에서도 NKCC1이 발현되는 것이 확인되었으며, NKCC1은 전정기관의 형태유지와 수분 전해질 항상성 유지에 대단히 중요한 기능을 담당할 것으로 생각된다.

향후에 NKCC1의 전정 기관내의 정확한 위치를 파악하는 것과 평형 기능의 객관적 평가를 통한 NKCC1과 내이 기능의 상관관계를 밝혀내는 것에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

중심단어: 전해질 이동, 전정기관, NKCC1이 결핍된 백서

REFERENCES

- 1) Wangemann P. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cell and stria marginal cell. *Hear Res* 1995;84:149-57.
- 2) Wangemann P, Liu J, Marcus DC. Ion transport mechanisms responsible for K⁺ secretion and the trans-epithelial voltage across marginal cells of stria vascularis *in vitro*. *Hear Res* 1995;84:19-29.
- 3) Konishi T, Hamrick PE, Walsh PJ. Ion transport in guinea pig cochlear. I. potassium and sodium. *Acta Otolaryngol* 1978;86:22-34.
- 4) Ikeda K, Morizono T. Electrochemical profiles for mono valent ions in the stria vascularis: cellular model of ion transport mechanism. *Hear Res* 1989;39:279-86.
- 5) Haas M, Forbush B. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 2000;62:515-34.
- 6) Russell JM. Sodium potassium chloride cotransport. *Physiol Rev* 2000;80:212-7.
- 7) Crouch JJ, Sakaguchi N, Lytle C, Schulte, BA. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem* 1997;45:773-8.
- 8) Goto S, Oshima T, Ikeda K, Ueda N, Takasaka T. Expression and localization of the Na-K-2Cl cotransporter in the rat cochlea. *Brain Res* 1997;765:324-6.
- 9) Sakaguchi N, Crouch JJ, Lytle C, Schulte, BA. Na-K-Cl cotransporter expression in the developing and senescent gerbil cochlea. *Hear Res* 1998;118:114-22.
- 10) Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 1999;22:192-5.
- 11) Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway L, Giannella RA, Andringa A, et al. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem* 1999;274:26946-55.
- 12) Pace AJ, Madden VJ, Henson OW, Koller BH, Henson MM. Ultrastructure of the inner ear of NKCC1-deficient mice. *Hear Res* 2001;156:17-30.
- 13) Pace AJ, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien DA, Koller BH. Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter. *J Clin Invest* 2000;105:441-50.
- 14) Gamba G, Miyanoshta A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994;269:17713-22.
- 15) Haas M. The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol* 1994; 267:865-9.
- 16) Dixon MJ, Gazard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP. Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Human Molecular Genetics* 1999;8:1579-84.
- 17) Ikeda K, Oshima T, Hikada H, Takasaka T. Molecular and

- clinical implication of loop diuretic ototoxicity. Hear Research 1997;107:1-8.*
- 18) Iwano T, Yamamoto, A Omori K, Kawasaki K, Kumazawa T, Tashiro Y. *Quantitative immunocytochemical localization of Na, K-ATPase α -subunit in the lateral wall of rat cochlear duct. J Histochem Cytochem 1990;37:353-63.*
- 19) Kerr TP, Ross MD, Ernst SA. *Cellular localization of Na, K-ATPase in the mammalian cochlear duct: Significance for cochlear fluid balance. Am J Otolaryngol 1982;3:332-8.*
- 20) Jackler RK, Luxford WM, House WF. *Sound detection with the cochlear implant in five ears of four children with congenital malformations of the cochlea. Laryngoscope 1987;97:15-7.*