

# Attenuation of ROS Generation by KCNE1 Genes in Cisplatin-treated Auditory Cells

Eun Sook Kim<sup>1,2</sup>, Sang-Ho Park<sup>2</sup>, and Raekil Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology, Wonkwang University College of Medicine, Iksan 570-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea

Potassium is essential for the proper functioning of the ears. The inner ear's endolymph differs from all other extracellular fluids (in its positive potential) and in the ionic compositions in the various parts of the endolymphatic space. Ion concentration of the endolymph is 150 mM of potassium, which is comparable to the concentrations in other organs. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II: CDDP) is one of the most effective anticancer drugs, widely used against various tumors. However, its clinical use is limited by the onset of severe side effects, including ototoxicity and nephrotoxicity. For ototoxicity, a number of evidences in cytotoxic mechanism of cisplatin, including perturbation of redox status, increase in lipid peroxydation, and formation of DNA adduct, have been suggested. Therefore, in this study, the author investigated the relationship between the potassium ions on cisplatin-induced cytotoxicity in HEI-OC1 cells associated with reactive oxygen species (ROS). KCNE1 gene expression by the concentration of intracellular potassium appeared in the plasma membrane and increased the concentration of intracellular potassium. Cisplatin decreased the viability of HEI-OC1 cells, but the KCNE1 gene increased. Also, the KCNE1 gene significantly suppressed generation of intracellular ROS by cisplatin. Western blot analysis showed that the KCNE1 gene increased phase II detoxification enzymes markers such as superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase (SOD2), NAD(P)H:quinine oxidoreductases (NQO1), which were associated with the scavenger of ROS. These results suggest that the KCNE1 gene for intracellular potassium concentration ultimately prevents ROS generation from cisplatin and further contributes to protect auditory sensory hair cells from ROS produced by cisplatin.

**Keywords:** KCNE1, ROS, Cisplatin, Ototoxicity

Corresponding author: Raekil Park  
Vestibulocochlear Research Center &  
Department of Microbiology, Wonkwang  
University College of Medicine,  
344-7, Shinyong-dong, Iksan 570-749, Korea.  
Tel: 82-63-840-1210  
E-mail: bacteria-g@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 The Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: August 14, 2013  
Revised: September 10, 2013  
Accepted: September 10, 2013

## 서론

시스플라틴은 여러 자궁종양, 폐암, 두 경부암과 같은 종류의 고형암 및 종양의 치료에 사용되는 다양한 범위의 종양 치료제로 알려져 있다. 그러나, 신독성 및 이독성과 같은 심각한 부작용으로 치료기간을 중단하거나 용량을 낮춰야 하는 결과를 초래한다(Boulikas, 2004). 시스플라틴의 세포 독성 효과는 비정상적인 유전자 전사와 DNA의 복제, 세포주기 정지 및 세포 사멸의 유도로 이어질 DNA 부가물 형성에 의해 일어난다(Jamieson와 Lippard, 1999). 이 독성은 cochlear에서 발생하며 일반적으로 돌이킬 수 없는 감각신경성 청력 손실 및 불균형 장애를 일으킨다(Fausti 등, 1993). 청각 세포내 산화 환원 상태의 교란, 지질과산화(Feghali 등, 2001), DNA의 부가물의 증가, 전 염증성 사이토킨 증가(So 등,

2008), 활성 산소(ROS)종의 증가(Rybak 등, 1999)에 의한 청각유모세포인 HEI-OC1과 내이의 달팽이관 조직의 청각세포의 손상을 유발시킨다(Kim 등, 2010). 내이의 내림프와 외림프는 서로 반대되는 이온 조성을 가지고 있으며, 각기 독특한 전기 전위를 띠고 있다. 이러한 내이의 독특한 이온 조성 및 전기 전위의 유지는 정상 내이 기능에 매우 중요하다. 그 중 칼륨은 정상 청력과 전정기능의 유지에 중요한 역할을 한다(Krick 등, 2001). 세포의 대부분은 높은  $\text{Na}^+$ 과 낮은  $\text{K}^+$  농도를 유지한다. 그러나 내이의 세포는 세포질의  $\text{Na}^+$ 와  $\text{K}^+$ 의 농도는 각각 5~15 mM, 100~120 mM이고 세포 외 농도는 내림프액에서 각각 1 mM와 150 mM로 존재한다(Wangemann와 Marcus, 1992; Takeuchi 등, 1995). 내림프의 높은 농도의  $\text{K}^+$ 은 정상 청력을 유지하는데 필요하며, 감각 전달을 위한 주전하 매개체로서 매우 중요하다(Wangemann, 2002).

시스플라틴에 의한 세포독성은 실제로 칼륨 이온 유출변형에 의해 강화된다. 주된 칼륨 이온의 유출은 세포 사멸의 유도 과정에 중요한 역할을 하며, 세포 사멸은 세포내 K<sup>+</sup> 농도가 감소된 상태에서 강화되고 K<sup>+</sup> 유출을 방지할 때 억제된다(Marklund 등, 2004). 시스플라틴 독성에 대한 다른 메커니즘은 청각기관의 기능을 손상시키는 활성 산소의 발생증가에 의한(Rybak 등, 1999). 시스플라틴에 대한 이독성은 sodium thiosulfate, diethyldithiocarbamate, methionine, glutathione, N-acetylcysteine, sodium salicylate, 그리고 flunarizine과 같은 화학요법제 사용으로 개선 되어지고 있으나(Rybak와 Whitworth, 2005; So 등, 2006), 시스플라틴에 대한 이독성 억제 메커니즘은 아직도 연구중이다. 본 연구는 다른 세포질과 다른 이온조성을 가지고 있는 달팽이관에서 시스플라틴에 의한 이독성과 칼륨이온과의 연관성을 연구하였다.

**재료 및 방법**

**1. 세포주**

마우스 와우기관 organ of Corti에서 유래한 청각각 유모세포주 HEI-OC1은 미국 Federico Kalinec 박사로부터 분양 받아 계대배양 하면서 실험하였다(Kalinec 등, 2003).

**2. 세포배양**

세포는 33°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 열에 의해서 비활성된 10% FBS가 포함된 고농도의 포도당을 함유한 DMEM 배양액으로 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

**3. 세포생존율 측정**

세포생존율은 10% FBS가 포함된 고농도의 포도당 DMEM 배양액으로 33°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 청각세포주는 (3×10<sup>4</sup>세포/24 well plate) 20 μM의 시스플라틴으로 24시간 처리 후 MTT (0.25 MG) 분석법으로 측정 하였다. MTT 용액(5 mg/mL, phosphate buffered saline: PBS, pH7.4)은 각각의 배양 세포에 배양액의 1/10을 첨가하여 4시간 반응하였다. 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan은 500 uL의 DMSO에 용해시킨 후, ELISA reader (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, North Ryde, Austria)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정 하였다. 세포 활성도는 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

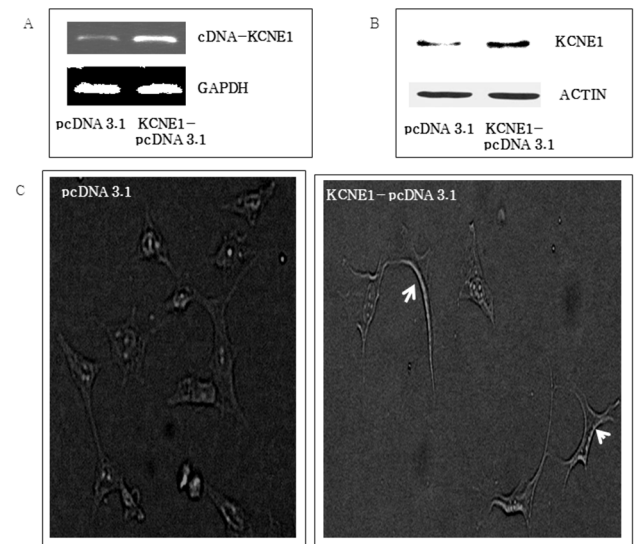
**4. HEI-OC1 세포에서 KCNE1 유전자의 형질전환 세포 만들기**

칼륨 channel로 알려진 KCNE1 발현을 위해  
 KCNE1: 5'-GTAGAATTCATGAGCCTGCCAATTCCA-3'  
 5'-ACTCTCGAGTCACGACAAATGGCTTCAGTTC-3'

Primer를 사용하였으며, pcDNA3.1 벡터에 cloning 하였다. KCNE1 유전자가 정확히 증폭된 것을 확인 하였고 단백질 발현을 확인 하였다. 형질전환세포 형성을 위하여, 형질 전환 1 일 전에 5×10<sup>5</sup> 세포수를 60 mm culture dish에 배양하였다. Plasmid DNA 1 μg, FuGENE6 transfection reagent (Roche, Boehringer Mannheim, Germany) 와 serum free medium 95 μL를 혼합 후 배양세포에 첨가하여 48시간동안 배양 하였다. stable transfectants 세포 형성을 위해, G418 antibiotic reagent 800 μg을 단일 집락이 형성 될때까지 처리 하였다. 형성된 stable transfectants 세포는 RT-PCR과 Western blot analysis (Fig. 1A, B)를 통해 KCNE1 유전자 확인을 하였다.

**5. KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포에서 단백질 발현 분석**

세포는 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/mL aprotinin)으로 용해후 상청액의 단백질을 얻어 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 KCNE1에 대한 1차 항체를 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 2시간 반응후 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)를 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 반응한 후, enhanced chemilluminescence kit (ECL kit, Amersham, Buckinghamshire, England)를 이용하여 현상하였다.



**Fig. 1.** Expression of the KCNE1 gene in HEI-OC1 cell. To examine the effect of pKCNE1 gene expression, the author carried out RT-PCR (A) and western blot (B) from auditory cells that had been subjected to high K<sup>+</sup> media for 24 h. Cells were treated with anti-KCNE1 antibody in immunocytochemical studies (C).

6. KCNE1 유전자 면역학적 검사

KCNE1 유전자 형질 확인을 위해, 청각 세포의 pKCNE1과 pcDNA3.1 형질은 면역형광법으로 KCNE1를 염색 하였다. KCNE1의 면역형광 염색을 위해, pKCNE1 및 pcDNA3.1 청각 세포를 PBS로 두번 세척하고 4% paraformaldehyde로 15분 동안 고정시킨 anti-KCNE1 antibody를 1:200으로 농도로 4°C에서 반응시켰다. Alexa 488 goat anti-rabbit IgG로 반응후, 형광 현미경(DP700, 올림푸스)에서 관찰되었다.

7. 세포내 K<sup>+</sup>의 측정

세포내 K 이온의 농도를 측정하기 위해 Potassium-binding benzofuran isophthalate (PBFI)를 형광 현미경을 사용하여 수행 하였다. 세포를 24시간 배양후 25% (wt/vol) Pluronic F-127 (Molecular Probes, Oregon, Eugene, USA)와 같은 양의 K 이온의 형광염료인 PBFI (Molecular Probes, Oregon, Eugene, USA) 처리후 at 37°C 에서 20분간 방치 하였다. 이후 phenol red가 들어 있지 않은 DMEM 배양액에 20분간 실온에 방치후 digital camera (DP700)로 340 nm 또는 380 nm 파장에서 이미지 촬영 하였다.

8. 세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

시스플라틴에 의한 ROS 생성은 HEI-OC1 세포를 24시간 배양 후 10 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Eastman Kodak, Rochester, NY)로 37°C에서 30분 동안 처리하였다. DCF-DA의 형광 강도는 flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, California, USA)로 측정 하였다. 세포 내 ROS 측정을 위하여, 두 개

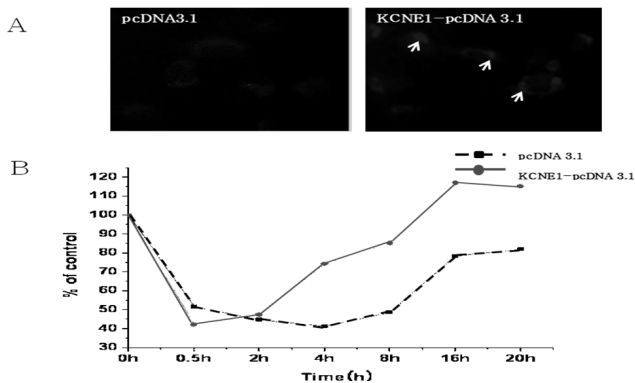


Fig. 2. Accumulation of intracellular K<sup>+</sup> concentration. KCNE1-pcDNA3.1 auditory cells cultured in DMSO containing 80 mM KCl for 24 h were examined to measure the changes in intracellular K<sup>+</sup> concentration using PBFI-AM (K<sup>+</sup>). Cells were analyzed by immunofluorescent for PBFI-AM. White indicators are fluorescence of intracellular K<sup>+</sup> concentration (A). Cells were exposed to cisplatin in a time-dependent manner. It was measured intracellular K<sup>+</sup> concentration using FACS analyzer (B).

의 서로 다른 cellpermeable probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Eastman Kodak, Rochester, NY)와 hydroethidium (HE, Eastman Kodak, Rochester, NY)을 활용 하였다. 시스플라틴 처리후, 세포는 PBS로 세척하고 DCF-DA 10 mM, HE 5 mM를 각각 처리후 37°C 30분 동안 배양하였다. 형광정도를 측정하기 위해 차가운 PBS로 세척후 현탁액을 만들어 ROS 생성량을 flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, California, USA)로 측정하고 CellQuest software를 이용하여 분석 하였다.

9. 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균 (mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하여 결과를 표시하였다. 실험결과 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리 하였으며 p-value가 최대치 0.05 (p<0.05) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 청각 세포에서 KCNE1 - 형질 유전자의 과발현과 코르티기관에서 KCNE1 단백질 발현

KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포는 KCNE1 유전자의 mRNA (Fig. 1A)와 단백질 증가(Fig. 1B)를 관찰 하였다. 또한 KCNE1 유전자의 형질 단백질은 세포막에서 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

2. KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포에서 세포 내 K<sup>+</sup>의 측정

세포 내 K<sup>+</sup>의 측정된 농도를 확인하기 위해, K<sup>+</sup>의 면역형광표시 염료인 PBFI-AM을 사용했다. 세포는 33°C에서 24시간 동안 80 mM 고농도 K<sup>+</sup> 배양액에서 배양후 KCNE1-pcDNA3.1 형질전환

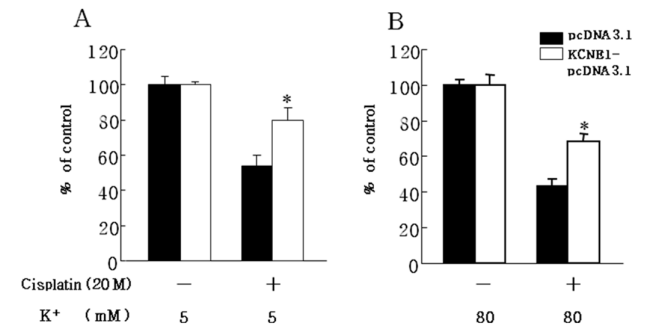


Fig. 3. overexpression of pKCNE1 attenuated the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells. Cell cytotoxicity was assessed by MTT assay as described in Materials and Methods. Cells were treated with cisplatin (20 μM) for 24 h in the presence of 5 mM (A) and 80 mM (B) K<sup>+</sup> concentration and MTT assay was carried out. Data are means±SD of three independent experiments. \*p<0.05.

세포에서 형광발현이 더 강하게 나타났다.

**3. KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포에서 cisplatin에 의한 세포 죽음의 감쇠**

KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포에서 cisplatin에 의한 세포 독성에 KCNE1 유전자의 세포 보호 효과를 확인하기 위해, 5 mM 과 80 mM K<sup>+</sup> 배양액에서 시스플라틴을 처리 한 후 세포생존율을 MTT 분석으로 확인하였다. 5 mM K<sup>+</sup> 배양액에서 pcDNA3.1 형질전환세포는 54%, KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포는 80% 생존율을 보였으며, 80 mM K<sup>+</sup> 배양액에서는 각각, 43%, 78%의 생존율을 보였다(Fig. 3).

**4. 시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포사멸에서 세포내 활성산소종의 생성 변화에 대한 KCNE1 유전자의 과발현 효과**

시스플라틴에 의한 HEI-OC1 세포사멸에서 KCNE1 유전자의 과발현의 보호 효과에 대한 기전연구를 위하여 세포내 활성산소종의 생성을 형광염색을 통해 조사하였다. DCF-DA와 HE 염색방법(Youn 등, 2008)으로 ROS 생성을 측정할 결과, 시스플라틴을 24시간 처리하였을 때 pcDNA3.1 형질전환세포보다 KCNE1-pcDNA3.1 형질전환세포에서 그래프가 왼쪽으로 이동(shift)하여 형광이 감소하였으므로 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양이 감소하였다(Fig. 4).

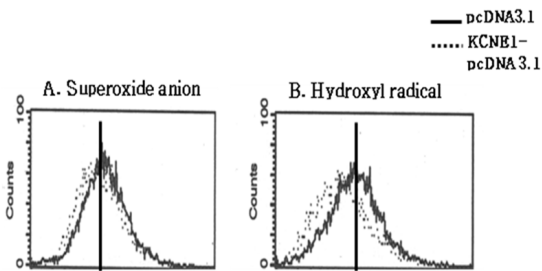
**고찰**

칼륨 이온채널은 휴지막 전위와 활동 전위의 유지, 상피세포의 수송, 세포 증식 및 세포의 죽음에 관여하는 효소의 감소와 활성 등 중요하고 광범위한 생명활동에 관여한다(Bortner 등, 1997). K<sup>+</sup> 이온의 세포의 유출은 apoptosis의 중요한 원인이 되며, 세포내 K<sup>+</sup> 이온의 높은 농도에서 낮은 농도로의 변화는 apoptosis를 일으키는 효소를 활성화시키고 세포의 부피를 감소시킨다(Hughes 등, 1997). 미토콘드리아로부터 시토크롬 C의 유출의 방지로 세포내의 K<sup>+</sup>에 의한

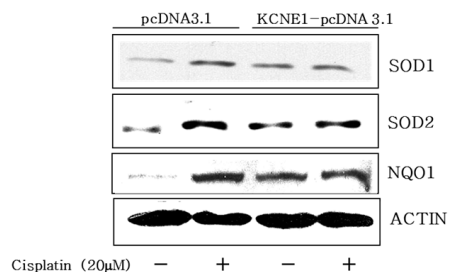
세포 사멸 효과가 억제 되었으며(Karki 등, 2007), 세포내 K<sup>+</sup> 농도는 caspase-3의 활성과 DNA nuclease의 감소를 유도하여 세포사멸을 효과적으로 억제하였는 보고는 있으나(Hughes 등, 1997), 아직 K<sup>+</sup>의 농도변화에 대한 세포사멸 메커니즘은 불분명하다.

본 실험에서는 세포내 K<sup>+</sup> 농도를 조절하는 KCNE1 유전자를 HEI-OC1 세포에 과발현시킨 후 시스플라틴으로 손상을 유도하고 세포독성에 대한 KCNE1 유전자의 세포사멸 보호 효과와 그 기전을 규명하고자 하였다.

시스플라틴(CIS-diamminedichloroplatinum II, CDDP)는 이독성과 신독성 등 심각한 부작용이 있는 광범위하게 사용되는 항암화학 요법제이다(Madasu, 1997; Sastry와 Kellie, 2005). 시스플라틴에 대한 세포사멸은 비정상적인 유전자 전사와 DNA의 복제, 세포주기 정지 및 세포 사멸의 유도로 이어질 DNA 부가물 형성에 의해 일어난다(Jamieson와 Lippard, 1999). 또한 칼륨이온의 modulators에 의한 세포내 K<sup>+</sup>의 감소나(Marklund, 2001), 활성산소종의 증가(ROS)에 의해서도 매개된다(Rybak 등, 1999). 그러나 이독성에서 K<sup>+</sup>의 기능은 아직 보고되지 않았다. 본 실험에서 KCNE1 유전자 과발현 결과, 유전자는 HEI-OC1 세포막에서 발현하였으며(Fig. 1C), 과발현된 세포는 세포내 K<sup>+</sup> 농도증가를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 시스플라틴에 의한 K<sup>+</sup> 농도별 효과는 5 mM 농도보다 고농도(80 mM) 배양액에서 HEI-OC1 세포독성이 심각하게 발생하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 전정와우기 관내 림프액의 조성은 고농도 K<sup>+</sup>으로 조성 되어있으며, 또한, 신장에서의 튜블러내에 존재하는 시스플라틴에 의한 부작용으로 심각한 이독성과 신독성이 일어나는 것은 고농도로 존재하는 K<sup>+</sup>이 원인으로 작용할 것으로 추측해 본다. 또한 시스플라틴은 항산화 효소의 고갈 및 cochlear 내 지질 과산화를 증가시켜 이독성을 일으킨다고 한다(Feghali 등, 2001). 그러므로 활성 산소종에 의한 세포독성은 티오 황산나트륨, diethyldithiocarbamate, 메티오닌, 글루타티온, N-아세틸 시스테인, 나트륨 살리실산, 그리고 flunarizine



**Fig. 4.** Role of ROS in the auditory Cell Death. HEI-OC1 cells were treated with cisplatin (20 μM). The cells were stained with hydroethium (A) and DCF-DA (B) for 30 min. Fluorescence intensity in individual cells was measured using flow cytometry.



**Fig. 5.** Effect of phase II detoxification enzymes in HEI-OC1 cells. Cells were pretreated with cisplatin (20 μM) for 24 h. Cell lysates were electrophoresed through an SDS-polyacrylamide gel, and subjected to immunoblot analysis with antibodies against, SOD-1, SOD-2 and NQO1. The protein levels of actin were determined as control.

등 다양한 화학요법에 의해 개선되기도 한다(Rybak 와 Whitworth, 2005; So 등, 2006). 산화적 스트레스에 대한 다양한 세포 반응은 항산화 반응 요소(ARE)와 전사 인자 NRF2를 통한 신호물질을 포함하고 있다(Sies와 Masumoto, 1997). ARE는 주로 phase II 항산화 유전자 발현을 조절하며(Wasserman와 Fahl, 1997), phase II 관련 효소는 glutathione-S-transferase (GST), c-glutamylcysteine synthetase [c-GCS: catalytic subunit (GCLC); modifier subunit (GCLM)], glutathione reductase (GR), NAD(P)H:quinone oxidoreductases (NQO1)를 포함한다. 이 효소단백질은 ROS에 의해 부과된 자유 라디칼에 대한 스트레스로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다. 청각 세포를 포함한 여러 세포 유형에서 산화적 스트레스에 대한 세포반응은 주로 phase II antioxidant genes 신호 단백질에 의해 조절 되어지고 있다(Wasserman와 Fahl, 1997). 이러한 관찰은 시스플라틴은 아마도 세포내 K<sup>+</sup> 농도의 증가에 의한 Phase II 효소의 유도를 통해 세포의 항산화능력을 향상시킨다고 한다. 그러나 세포내 K<sup>+</sup> 농도 증가는 GSH의 증가보다 ROS의 감소에 의해 더 큰 변화가 있었다(Wang와 Joseph, 1999). 역으로 세포내 K<sup>+</sup>의 농도증가는 SOD1, SOD2, GCLC, NQO1을 포함한 antioxidant genes을 증가시키며, 이러한 유전자는 시스플라틴의 세포독성을 감소시켰다(Fig. 5). 따라서 내이의 내림프에 존재하는 고농도의 칼륨은 내이의 청각유모가 다른 조직의 세포들에 비해 훨씬 더 특이적으로 시스플라틴에 의한 세포자멸사를 유발하며, 또한 활성산소종의 생성증가로 인한 미토콘드리아의 기능변화 등이 수반되는 세포자멸사를 촉진하는 것으로 사료된다. 이러한 결과로부터 KCNE1 유전자의 과발현은 세포내 K<sup>+</sup> 농도를 증가시키며, 증가된 K<sup>+</sup>는 항산화물질을 증가시켜 세포내 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 것으로 추측 되어진다. 따라서 KCNE1 유전자의 과발현은 시스플라틴에 의한 이독성으로부터 청각세포를 보호할 수 있는 효과적인 방법이라고 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 교육과학기술부/한국과학재단(R13-2002-055-00000-0)의 Vestibulocochlear 연구 센터에 지원된 연구비에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

Bortner CD, Hughes FM Jr, Cidlowski JA. A primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997, 272:32436-32442.  
Boulikas T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal

cisplatin (Lipoplantin) in mouse xenografts. *Oncol Rep*. 2004, 12:3-12.  
Fausti SA, Henry JA, Schaffer HI, Olson DJ, Frey RH, Bagby GC Jr. High-frequency monitoring for early detection of cisplatin ototoxicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993, 119:661-666.  
FeghaliJG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope*. 2001, 111:1147-1155.  
Hughes FM Jr, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem*. 1997, 272:30567-30576.  
Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews*. 1999, 99:2467-2498.  
Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, Kalinec F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurootol*. 2003, 8:177-189.  
Karki P, Seong C, Kim JE, Hur K, Shin SY, Lee JS, et al. Intracellular K<sup>+</sup> inhibits apoptosis by suppressing the Apaf-1 apoptosome formation and subsequent downstream pathways but not cytochrome c release. *Cell Death Differ*. 2007, 14:2068-2075.  
Kim HJ, Lee JH, Kim SJ, Oh GS, Moon HD, Kwon KB, et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci*. 2010, 30:3933-3946.  
Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, Kim H, Yuan JX. Activation of K<sup>+</sup> channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Amer J Physiol Cell Physiol*. 2001, 280:C970-C979.  
Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E, Robbins KT. Ototoxic effects of supradosecisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997, 123:978-981.  
Marklund L, Andersson B, Behnam-Motlagh P, Sandström PE, Henriksson R, Grankvist K. Cellular Potassium Ion Deprivation Enhances Apoptosis Induced by Cisplatin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004, 94:245-251.  
Marklund L, Henriksson R, Grankvist K. Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int J Cancer*. 2001, 93:577-583.  
Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *ToxicolSci*. 1999, 47:195-202.  
Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today*. 2005, 10:1313-1321.  
Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005, 22:441-445.  
Sies H, Masumoto H. Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Advances in Pharmacology*. 1997, 38:229-246.  
So H, Kim H, Kim Y, Kim E, Pae HO, Chung HT, et al. Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by down-regulation of proinflammatory cytokines via Nrf2/HO-1. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2008, 9:290-306.  
So HS, Kim HJ, Lee JH, Lee JH, Park SY, Park C, et al. Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of hemeoxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death and Differentiation*. 2006, 13:1763-1775.  
Takeuchi S, Ando M, Kozakura K, Saito H, Irimajiri A. Ion channels in

- basolateral membrane of marginal cells dissociated from gerbil striavascularis. *Hear Res.* 1995, 83:89-100.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999, 27:612-616.
- Wangemann P. K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hear Res.* 2002, 165:1-9.
- Wangemann P, Marcus DC. The membrane potential of vestibular dark cells is controlled by a large Cl<sup>-</sup> conductance. *Hear Res.* 1992, 62:149-156.
- Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997, 94:5361-5366.
- Youn MJ, So HS, Cho HJ, Kim HJ, Kim YH, Lee JH, *et al.* Berberine, a Natural Product, Combined with Cisplatin Enhanced Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Mediated Pathway in HeLa Cells. *Biol Pharm Bull.* 2008, 31:789-795.