

## 소음성 난청에서의 Mitochondrial DNA A3243G, A1555G, A7445G 돌연변이

홍영습<sup>1</sup> · Hisahide Nishio<sup>2</sup> · 이명진<sup>2</sup> · 광기영<sup>1</sup> · 황찬호<sup>3</sup> · 신동훈<sup>4</sup> · 광종영<sup>5</sup> · 이용환<sup>6</sup> · 김종민<sup>7</sup> · 김준연\*

동아대학교 의과대학 예방의학교실 및 환경유전역학 연구회, <sup>1</sup>동아대학교 의과대학 예방의학교실 및 암분자치료연구센터, <sup>2</sup>고베의과대학 공중보건학교실, <sup>3</sup>동아대학교 의과대학 이비인후과교실, <sup>4</sup>계명대학교 의과대학 예방의학교실, <sup>5</sup>동아대학교 암분자치료연구센터, <sup>6</sup>고신대학교 의과대학 예방의학교실, <sup>7</sup>동아대학교 의과대학 해부학교실

Received September 21, 2004 / Accepted October 26, 2004

**Mitochondrial DNA Mutation (3243A→G, 1555A→G, 7445A→G) in Noise-Induced Hearing Loss.** Young-Seoub Hong<sup>1</sup>, Hisahide Nishio<sup>2</sup>, Myeong-Jin Lee<sup>2</sup>, Ki-Young Kwak<sup>1</sup>, Chan-Ho Hwang<sup>3</sup>, Dong-Hoon Shin<sup>4</sup>, Jong-Young Kwak<sup>5</sup>, Yong-Hwan Lee<sup>6</sup>, Jong-Min Kim<sup>7</sup> and Joon-Youn Kim\*. *Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Dong-A University, The Research Society of Environmental Genetic Epidemiology, Korea, <sup>1</sup>Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Dong-A University, Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, College of Medicine, Dong-A University, Korea, <sup>2</sup>Department of Public Health, Kobe University School of Medicine, Japan, <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Dong-A University, Korea, <sup>4</sup>Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Keimyung University, Korea, <sup>5</sup>Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, College of Medicine, Dong-A University, Korea, <sup>6</sup>Department of Preventive Medicine, Kosin Medical College, Korea, <sup>7</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Dong-A University, Korea* – Mitochondrial DNA mutations have been reported in recent years in association with sensorineural hearing loss. The purpose of this study is to identify the association between the noise-induced sensorineural hearing loss and the A to G mutation at nucleotide 3243, 1555, 7445 of mitochondrial DNA. Study subjects were established by history and chart review, and audiological and clinical data were obtained. Blood was sampled from 214 normal controls, 102 noise-induced hearing loss, and 28 sensorineural hearing loss. The DNA of these individuals were extracted, and mitochondrial DNA fragments were analyzed by polymerase chain reaction. Subsequently, the coding sequence of mitochondrial DNA 3243, 1555, 7445 were sequenced, and compared to the normal sequence, and all sequence variations were analyzed by restriction enzymes. Mitochondrial DNA mutations (3243A→G, 1555A→G, 7445A→G) were not detected by polymerase chain reactions in any patients with noise-induced hearing loss, sensorineural hearing loss, and normal controls. The DNA sequencing of PCR products did not revealed an A to G substitution at nucleotide 3243, 1555, 7445 of mitochondrial DNA. The noise-induced sensorineural hearing loss was not associated with mitochondrial DNA mutation (3243A→G, 1555A→G, 7445A→G).

**Key words** – Mitochondrial DNA mutation, Noise-induced hearing loss

Post-Genome 시대를 맞이하여 인간의 Genome 정보를 이용하기 위한 다양한 노력들이 시도되고 있다. 환경성질환에 대한 감수성을 결정하는데 있어 유전학의 역할을 탐색하는 연구 분야 역시 많이 성장하고 있다. 즉, 전통적으로 환경의학에서 사용하는 노출-질환의 패러다임에서 유전자-환경 상호작용에 대한 연구로 유전적 소인을 밝혀 질병예방 및 관리에 활용하고자 하는 새로운 시도가 계속되고 있다(Kelada 등, 2003).

환경성 질환 중 소음성 난청은 현재 우리나라에서 특수건강진단을 통한 직업병 유소전자 중 그 수가 가장 많은 직업성 장애이다. 현재 질병 발생의 규모 뿐만이 아니라 산업의 기계화 가속에 따른 문제까지 고려한다면 소음성 난청에 대한 문제에 대해서는 좀 더 많은 관심과 연구가 필요할 것으로 생각된다.

소음노출에 따른 청력손실은 개인간에 큰 차이를 보여 어떤 사람은 큰 소음에 오랫동안 견딜 수 있는 반면 어떤 사람은 똑 같은 환경에서 급격하게 청력을 잃는다. 즉 소음성 청력장애는 소음에 노출되는 기간과 그 강도와 함께 개인적 감수성과 관련된 다양한 요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Zenz, 1994; Ladou, 1997). Taylor 등(1965)은 99-102dB의 일정한 소음에 1년에서 54년 동안 폭로되어 온 여성 직공들의 청력손실의 정도가 최고와 최저 청력손실을 가진 사람에서 70 dB 정도의 차이가 있음을 보고한 바 있다. 소음성 청력장애에 대한 기존의 감수성 요인으로는 심혈관계 위험요인, 흡연, 혈액점도, 홍채 색소 침착 정도, 외이도 형태, 혈액 백혈구 수, 생리주기, 음주습관, 전해질 및 비타민 부족 그리고 정신적인 요인 등이 알려져 있다(Ward, 1995).

소음에 의한 영구적 청력손실의 위험은 유전적인 감수성(genetic susceptibility)과도 관련이 있으며(Schindler 등, 1997), 많은 역학적 연구들은 이러한 현상을 'tough and tender' 현상으로 밝히고 있다. 동물 실험에서 소음에 대한 감수성은

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2932, Fax : +82-51-253-5729

E-mail : jykim@daunet.donga.ac.kr

개체 간에 차이를 보이는데, 이러한 차이는 유전적인 요인에 의한 것으로 설명하고 있다(Cody와 Robertson, 1983). 소음성 난청에 있어서 유전학적 특성과 연령의 상호작용은 이론적으로나 실제적으로 중요하므로 이들 상호작용을 알아보기 위하여, 사람의 노인성 난청과 비슷한 고주파 영역에서 일차적으로 청력역치손실이 발생하는 마우스 근친교배종(inbred strains), CBA/Ca와 C57BL/6J 유전자형을 이용한 동물실험에서 두 종의 유전자형에 따라 연령이 증가함에 따라 청각변성에 차이가 나며, 소음에 의한 청각손상에 대한 감수성이 다르게 나타났다(Li와 Borg, 1991,1993; Li, 1992a,b; Li등, 1993). 또한 염색체 10에 위치해 있는 Ah1 유전자형이 소음성 난청에 대한 감수성을 높이는 것으로 알려져 있다(Erway 등, 1996). 이러한 결과는 소음성 난청에 대한 감수성이 유전적인 소인이 중요한 요인임을 시사하는 것으로 생각된다.

최근 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 돌연변이는 유전성 난청과 아미노글리코사이드계 항생제 과민성의 주요 원인으로 보고되고 있다(Tamagawa 등, 1996). mtDNA 손상은 안정된 조직에서 축적이 잘 되며(Wallace, 1992), 와우의 세포는 태생기에 이미 유사분열(mitosis)을 끝마쳤기 때문에 mtDNA 돌연변이가 와우에 축적되는 경향이 있으므로, 감각신경성 난청 환자에서 와우 조직 뿐만 아니라, 백혈구의 mtDNA 돌연변이의 축적 또한 청력손실과 관련이 있을 것으로 보고 있다(Tamagawa 등, 1996; Ueda등, 1998).

본 연구에서는 감각신경성난청과 mtDNA와 가장 관련이 높은 것으로 알려진 Nucleotide 3243, Nucleotide 1555, Nucleotide 7445의 돌연변이가 유무를 관찰하고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 대상자

소음성 난청환자는 근로자 특수건강진단에서 소음성 난청으로 의심되어 정밀검사를 받기 위해 내원한 환자 중 순음청력검사, 음차검사, 언어청력역치검사, 이경검사를 실시하여 500, 1000, 2000 Hz의 평균청력손실이 30 dB 이상이고 4000 Hz에서 40 dB 이상의 청력손실을 보이며 이비인후과적 질병이나 대사성질환, 이독성을 나타내는 약물의 복용, 그리고 가족성 난청의 경험이 없는 감각신경성난청 102명을 소음성 감각신경성난청 환자군으로 선정하였다. 소음에 대한 노출력과 이비인후과적 질병력이 없고 순음청력검사상 청력손실의 소견이 없는 정상인 214명을 대조군으로 하였다. 양성대조군은 이비인후과에서 원인을 알 수 없는 감각신경성난청으로 진단된 환자 28명으로 하였다. 대상자의 평균연령은 대조군 42.3세(범위: 28-67세), 감각신경성난청 환자군 40.6세(범위: 18-59세), 소음성 감각신경성난청 환자군 44.7세(범위: 30-56세)였다.

### DNA 추출

DNA 추출을 위해 Wizard Genomic DNA Purification

Kit (Promega Co., U.S.A)를 사용하여 다음과 같이 행하였다. 1.5 ml tube에 전혈 300  $\mu$ l를 분주하고 900  $\mu$ l의 Cell Lysis Solution 900  $\mu$ l를 첨가한 후 5-6번 천천히 섞었다. 실온에서 10 min간 방치한 후 13,000 rpm에서 20 sec간 원심분리 하였다. 상층액의 잔여물이 10-20  $\mu$ l정도만 남도록 한 후 10-15 sec간 섞었다. Nuclei Lysis Solution을 300  $\mu$ l 첨가하고 5-6번 pipetting하여 잘 섞어 37°C에서 1-2 min간 방치하였다. RNase Solution을 1.5  $\mu$ l 첨가하고 2-5번 섞은 후 37°C에서 15 min간 방치하였다. Protein Precipitation Solution을 100  $\mu$ l첨가 한 후 10-20 sec간 섞었다. 13,000 rpm에서 3 min간 원심분리 한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. Isopropanol을 300  $\mu$ l 첨가하여 천천히 섞으면서 DNA가 응집되는 것을 확인하였다. 13,000 rpm에서 1 min간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 70% EtOH 900  $\mu$ l를 첨가하여 천천히 섞으면서 DNA를 씻었다. 13,000 rpm에서 1 min간 원심분리한 후 상층액을 전액 제거하였다. 이때 tube 내의 DNA의 존재여부를 확인하였다. 실온에서 완전 건조시킨 후 DNA Rehydration Solution을 100  $\mu$ l 첨가하고 65°C에서 1 hr 동안 방치하였다. 그리고 4°C에서 밤새 방치시켰다. 이렇게 추출된 DNA는 4°C에서 저장하였다.

### 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)에 의한 mtDNA의 증폭

MtDNA에서 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 유무를 관찰하기 위하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위가 포함된 mtDNA fragment를 다음과 같이 PCR을 통하여 증폭하였다. PCR Master Mix (Promega Co., U.S.A) (50 Units/ml Taq DNA Polymerase, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1% Triton X-100, 400  $\mu$ M dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) 15  $\mu$ l, 10 pM forward primer 1  $\mu$ l, 10 pM reverse primer 1  $\mu$ l, 주형 2  $\mu$ l, 증류수 11  $\mu$ l를 첨가하여 30  $\mu$ l가 되도록 용량을 맞춘 뒤, 초기변성을 94°C에서 5 min간 하고, 94°C에서 1 min간 변성, 55°C에서 1 min간 결합, 72°C에서 1 min간 연장하는 cycle을 30 cycle 행한 뒤, 72°C에서 10 min간 추가 연장 반응으로 증폭시켰다. 이렇게 합성된 PCR 생성물을 2% agarose gel에 전기영동하여 DNA band를 확인하였다. A3243G는 forward primer로 3153부터 3172부위가 포함되는 5 TTCACAAAGC GCCTTCCCCC 3와 reverse primer로 3551부터 3531부위가 포함되는 5 GCGATGGTGAGAGC TAAGGTC 3를 사용하여 399 bp의 DNA band를 확인하였다. 확인된 PCR 생성물 10  $\mu$ l를 Apa I 제한효소로 37°C에서 3 hr 동안 처리한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 돌연변이가 존재시에 309 bp와 90 bp의 digested mtDNA fragment를 관찰하였다. A1555G는 forward primer로 1252부터 1271부위가 포함되는 5 GCCTATATACCGCCATCTTC 3와 reverse primer로 1726부터 1707부위가 포함되는 5 GGTTTGGCTAAGGTTGTCTG 3를 사용하여 475 bp의 DNA band를 확인하였다. 확인된

PCR 생성물 10 µl를 *Alw* 26 I 제한효소로 처리한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 돌연변이가 존재하지 않을 시에 295 bp와 180 bp의 digested mtDNA fragment를 관찰하였다. 그리고, A7445G는 forward primer로 7178부터 7198부위가 포함되는 5 CTCCCAC AACACTTCTCGG 3와 reverse primer로 7840부터 7821부위가 포함되는 5 GTAAAGGATGC GTAGGGATG 3를 사용하여 662 bp의 DNA band를 확인하였다. 확인된 PCR 생성물 10 µl를 *Xba* I 제한효소로 처리한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 돌연변이가 존재하지 않을 시에 400 bp와 262 bp의 digested mtDNA fragment를 관찰하였다.

**정제 및 mtDNA 염기서열 분석**

PCR 생성물을 Solget사의 PCR purification kit를 사용하여 정제하고 난 후 Bigdye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems., U.S.A)를 사용해 96℃에서 10 sec간 변성, 50℃에서 5 sec간 결합, 60℃에서 4 min간 연장하는 cycle을 25회 실시하는 PCR을 행하여 ddNTP에 형광물질을 부착하였다. 형광물질이 부착된 PCR 생성물을 Sequencing reaction cleanup kit인 Millipore사의 Montage™ SEQ<sub>96</sub>을 사용해 정제한 뒤 Perkin-Elmer사의 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (capillary 방식)로 염기서열을 분석하였다.

**연구 결과**

**Mt DNA A3243G 돌연변이**

말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출한 후, mtDNA 3243 부위의 A→G 돌연변이 유무를 관찰하기 위하여 mtDNA 3243부위가 포함된 mtDNA fragment를 중합효소연쇄반응으로 증폭하고 유전자 제한효소로 소화하여 전기영동하고 UV transilluminator에서 관찰하였다. mtDNA A3243G의 돌연변이를 관찰한 결과 돌연변이 부위가 포함된 399 bp fragment가 소음성 감각신경성난청 환자군, 감각신경성난청 환자군, 대조군 모두에서 증폭됨을 관찰하였다. 또한 399 bp fragment가 나타난 PCR 산물을 *Apa* I 제한효소로 처리한 결과 digested mtDNA fragment (309 bp와 90 bp)는 나타나지 않아 mtDNA 3243A→G가 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 1).

**Mt DNA A1555G 돌연변이**

MtDNA A1555G의 돌연변이를 관찰한 결과 돌연변이 부위가 포함된 475 bp fragment가 소음성 감각신경성난청 환자군, 감각신경성난청 환자군, 대조군 모두에서 증폭됨을 관찰하였다. 475 bp fragment가 나타난 PCR 산물을 *Alw* 26 I 제한효소로 처리한 결과 돌연변이가 존재하지 않을 시에 나타나는 295 bp와 180 bp의 digested mtDNA fragment가 관

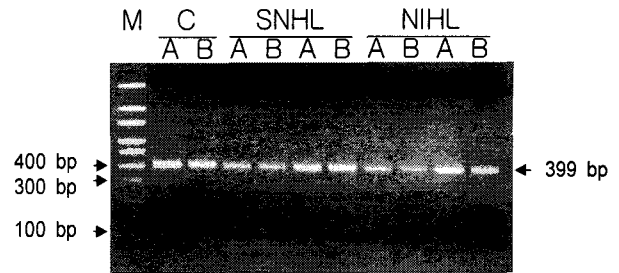


Fig. 1. Detection of the mtDNA samples from the control subjects and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss and the unknown origin of sensorineural hearing loss. The mtDNA fragment were amplified by PCR using primer, seperated on 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide. The 399 bp is detected in all lanes (A). The band of 309 bp and 90 bp can be not seen in all subjects after digestion of mtDNA fragment with *Apa* I (B). M: molecular weight marker (100 bp), C: normal control, SNHL: the patients with unknown origin of sensorineural hearing loss, NIHL: the patients with noise-induced sensorineural hearing loss.

찰되어 mtDNA 1555A→G가 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 3).

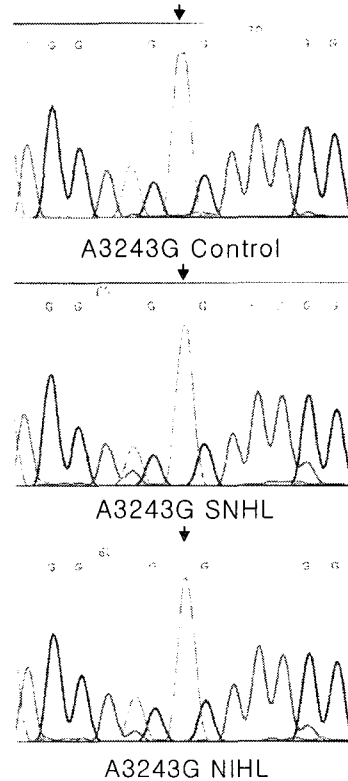


Fig. 2. The DNA sequencing of the spanning of nucleotide 3243 from a normal control and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss in fig 1. An A to G substitution at nucleotide 3243 was not demonstrated in the patient.

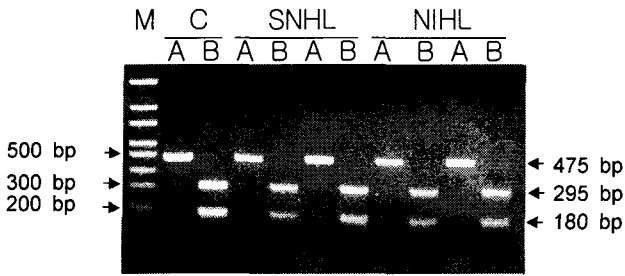


Fig. 3. Detection of the mtDNA samples from the control subjects and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss and the unknown origin of sensorineural hearing loss. The mtDNA fragment were amplified by PCR using primer, seperated on 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide. The 475 bp is detected in all lanes (A). The band of 295 bp and 180 bp can be seen in all subjects after digestion of mtDNA fragment with *Alw* 26 I (B). M: molecular weight marker (100 bp), C: normal control, SNHL: the patients with unknown origin of sensorineural hearing loss, NIHL: the patients with noise-induced sensorineural hearing loss.

**Mt DNA A7445G 돌연변이**

mtDNA A7445G의 돌연변이를 관찰한 결과 돌연변이 부위가 포함된 662 bp fragment가 소음성 감각신경성난청 환자군, 감각신경성난청 환자군, 대조군 모두에서 증폭됨을 관찰하였다. 662 bp fragment가 나타난 PCR 산물을 *Xba* I 제한효소로 처리한 결과 돌연변이가 존재하지 않을 시에 나타나는 400 bp와 262 bp의 digested mtDNA fragment가 관찰되어 mtDNA 7445A→G가 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 5).

**염기서열분석**

MtDNA에서 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 관찰되지 않아 PCR 산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위에서의 염기서열을 확인한 결과 이미 밝혀진 사람의 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 염기서열과 동일한 염기서열임이 확인되었으므로 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 일어나지 않았음을 확인하였다(Fig. 2,4,6).

**고찰**

최근 유전체 연구 기술의 발달은 유전자의 작용으로 인해 생기는 각종 만성질환의 발생 원인을 찾아내어 예방 및 치료를 가능하게 할 전망이며, 이에 발맞추어 생물학의 중심 과제는 건강 및 질병과 인간유전체의 미세한 구조적 차이를 어떻게 연관시킬 것인가에 집중되어 있고 그 결과는 의학적 개념의 급격한 변화를 초래할 것으로 예상된다. 산업보건 및 공중보건 분야에서도 다양한 유전자형에 따른 질병 발생을

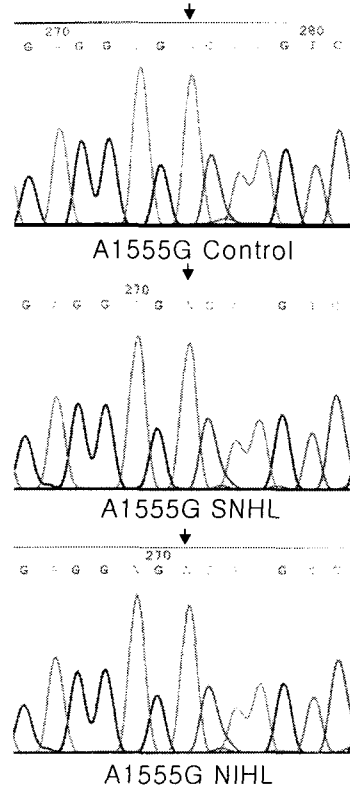


Fig. 4. The DNA sequencing of the spanning of nucleotide 1555 from a normal control and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss in fig 1. An A to G substitution at nucleotide 1555 was not demonstrated in the patient.

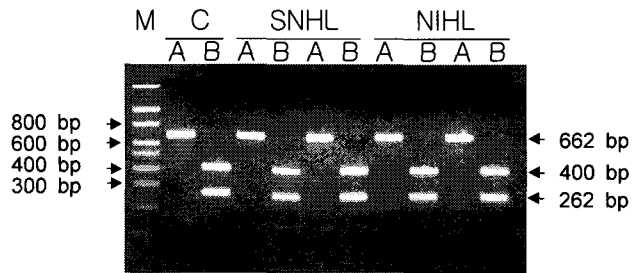


Fig. 5. Detection of the mtDNA samples from the control subjects and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss and the unknown origin of sensorineural hearing loss. The mtDNA fragment were amplified by PCR using primer, seperated on 2% agarose gel, and stained with ethidium bromide. The 662 bp is detected in all lanes (A). The band of 400 bp and 262 bp can be not seen in all subjects after digestion of mtDNA fragment with *Xba* I (B). M: molecular weight marker (100 bp), C: normal control, SNHL: the patients with unknown origin of sensorineural hearing loss, NIHL: the patients with noise-induced sensorineural hearing loss.

파악하기 위한 유전자-환경 상호작용에 대한 연구가 활발히 시도되고 있는 것은 큰 의미를 가진다고 생각된다. 본 연구

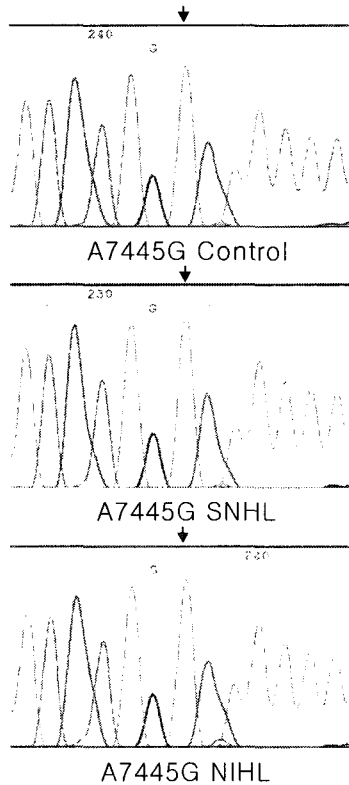


Fig. 6. The DNA sequencing of the spanning of nucleotide 7445 from a normal control and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss in fig 1. An A to G substitution at nucleotide 7445 was not demonstrated in the patient.

에서 시도한 소음성 난청의 유전적 감수성 요인을 파악하기 위한 mtDNA에 대한 연구 역시 이러한 유전자-환경 상호작용에 대한 연구와 맥락을 같이 하는 것이다.

내이는 유사분열 후의 안정된 조직으로 mtDNA 돌연변이의 주요 표적기관으로 알려져 있어 감각신경성난청 발생의 전구요인으로 mtDNA가 작용하는지 여부를 확인하고자 하는 연구가 시도되었다(Ueda 등, 1998). 그러나, mtDNA에 의해 유발된 감각신경성난청의 기전에 대해 확실히 밝혀진 것은 없다.

지금까지 알려진 기전으로는 내이에 mtDNA의 돌연변이가 점진적으로 축적됨으로써 산화성 인산화의 능력이 떨어지고, 소포체에서 ATP 생산이 저하되면서 cochlea의 energy-dependent ATPase와 신경전달물질의 분비가 억제됨으로써 청력소실이 나타날 수 있다는 것이다(Thalmann 등, 1970). 다른 기전으로는 이온 수송의 장애로 청음변환의 불완전성에 의해 청력소실이 발생할 수 있다는 것이다(Ikeda 등, 1994).

본 연구에서는 대상자의 말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출한 후, mtDNA에서 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이 유무를 관찰하기 위하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위가 포함된 mtDNA fragment를 증합효소 연쇄반응으로 증폭하고 유전자 제한효소로 소화하여 전기영동하고 UV trans-illuminator에서 관찰하였다. mtDNA A3243G, A1555G,

A7445G의 돌연변이를 관찰한 결과 돌연변이 부위가 포함된 fragment가 소음성 감각신경성난청 환자군, 감각신경성난청 환자군, 대조군 모두에서 증폭됨을 관찰하였다. 또한 PCR 산물을 제한효소로 처리한 결과에서도 mtDNA에서 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 일어나지 않았음을 알 수 있었다.

MtDNA 돌연변이는 PCR과 특이 제한효소를 이용한 방법으로 쉽게 조사할 수 있으며 ethidium bromide로 염색한 후 agarose gel로 쉽게 확인할 수 있다. 위음성율은 돌연변이가 발생한 환자의 말초혈액 백혈구에서 10% 이하로 매우 낮다(Thomas 등, 1995). 그러나 Odawara 등(1995)에 의하면 말초혈액에서의 미토콘드리아 Genome의 돌연변이 DNA군이 상대적으로 낮아 band가 약하게 나타날 수 있다는 점과 primer의 선택에 따른 실험상의 오차가 발생할 여지가 있음을 제시하였지만, 본 연구에서는 DNA 염기서열분석을 통한 염기서열의 확인을 거쳤으므로 실험상의 오차에 의한 위음성의 가능성은 희박한 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 연구대상자들의 mtDNA 돌연변이(3243A→G, 1555A→G, 7445A→G)가 관찰되지 않아 가족력이 없는 소음성 감각신경성난청, 감각신경성난청, 정상 대조군에서 mtDNA 돌연변이는 관련이 없을 것으로 생각된다. 이와 같은 연구결과는 앞서 신동훈 등(2000)의 mtDNA 돌연변이 3243A→G의 연구결과와 일치하는 소견이었다. 본 실험에서 양성대조군으로 이용된 감각신경성난청 환자는 원인을 알 수 없고 성인에서 발생한 환자로서 감각신경성 난청의 가족력을 가진 대상자가 없었으므로 mtDNA 돌연변이를 발견할 수 없었던 것으로 생각된다.

MtDNA 3243A→G의 변이는 당뇨, MELAS (Mitochondrial encephalopathy, Lactic acidosis, Stroke like eposode) 등의 질환과 연관되며, 감각신경성난청과 관련이 있다는 연구보고가 있다(Goto 등, 1990). mtDNA 1555A→G의 변이는 aminoglycoside 이독성에 대한 선천적인 소인을 설명하는 중요한 변이로 생각되고 있으며, aminoglycoside에 대한 노출이 없어도 이 변이를 가진 사람에서 심각한 청력손실을 올 수 있다는 보고들이 발표되었다(Usami, 1997; Estivill, 1998). mtDNA 7445A→G의 변이는 palmoplantar keratoderma와 연관되며, 청력손실을 가져온다는 연구 보고들이 있다(Goto, 1990; Servior, 1998). 이러한 연구 보고들은 청각기가 mtDNA 돌연변이의 주요 대상 기관이 되며, mtDNA가 유전적인 청력저하의 주요원인이 될 수 있음을 시사하고 있으므로, 따라서, 조사대상자수의 확대와 감각신경성난청자들의 가족력 등의 특성을 고려한 광범위한 대상자 선정을 통하여 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 연구에서의 현실적인 문제에 의해 주요 대상기관인 청각경로의 조직이 아닌 말초혈액의 백혈구를 사용한 점은 청각경로에 있어 mtDNA의 돌연변이 전체를 반영하지 못함으로써 연구결과의 결론적인 판단에 있어 다소의 제한점으로 남아있다.

본 연구에서는 신동훈 등(2000)이 연구한 Nucleotide 3243 뿐만아니라 추가적으로 Nucleotide 1555, Nucleotide 7445 등에 대한 연구도 시도하였으나 mtDNA 돌연변이 유무와 소음성 감각신경성난청과의 관련성을 밝히지 못하였다. 그러나 본 연구에서의 유전자 이외에도 난청과 관련될 수 있는 많은 유전자들이 밝혀지고 있어 이에 대한 후속적인 연구 및 미토콘드리아 DNA전체를 분석하여 소음성 감각신경성난청과 mtDNA 돌연변이의 관련성을 밝히기 위한 연구의 필요성이 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 2003학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

### 요 약

본 연구는 소음성 감각신경성난청 환자의 유전적 관련요인을 파악하고자 관련성이 의심되는 mitochondrial DNA의 돌연변이와 소음성 감각신경성난청과의 관련성을 조사하였다. 말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출한 후, mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이 유무를 관찰하기 위하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위가 포함된 mtDNA fragment를 중합효소 연쇄반응으로 증폭하고 유전자 제한효소로 소화하여 전기영동하고 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV transilluminator에서 관찰하였다. 그리고, PCR 산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위에서의 염기서열 분석을 실시하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이를 관찰하였다. MtDNA A3243G, A1555G, A7445G의 돌연변이를 관찰한 결과 돌연변이 부위가 포함된 fragment가 소음성 감각신경성난청 환자군, 감각신경성난청 환자군, 대조군 모두에서 증폭됨을 관찰하였다. 또한 PCR 산물을 제한효소로 처리한 결과에서도 mtDNA에서 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 일어나지 않았음을 알 수 있었다. PCR 산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243, 1555, 7445부위에서의 염기서열을 확인한 결과 이미 밝혀진 사람의 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 염기서열과 동일한 염기서열임이 확인 되었으므로 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이가 일어나지 않았음을 확인하였다. 소음성 감각신경성난청과 mtDNA 3243, 1555, 7445부위의 A→G 돌연변이와는 관련이 없는 것으로 관찰되었다.

### 참 고 문 헌

1. Chung, I. S., Shin, D. H. and Baek, W. K. 2000. Mitochondrial DNA A3243G mutation in noise-induced senso-

rineural hearing loss. *Korean J Occup Environ Med* **12**(3), 319-326.

2. Cody, A. R. and Robertson, D. 1983. Variability of noise-induced damage in the guinea pig cochlea: electrophysiology and morphological correlates after strictly controlled exposure. *Hear Res* **9**, 55-70.

3. Estivill, X., Govea, N. and Barcelo, A. 1998. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* **62**, 27-35.

4. Erway, L. C., Shiau, Y. W., Davis, R. R., and Krieg, E. F. 1996. Genetics of age-related loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res* **93**, 181-187.

5. Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. 1990. A mutation in the tRNA<sup>LEU</sup> (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. *Nature* **348**, 651-653.

6. Ikeda, K., Sunose, H. and Takasaka, T. 1994. Ion transport mechanisms in the outer hair cell of the mammalian cochlea. *Prog Neurobiol* **42**, 703-737.

7. Kelada, S. N., Eaton, D. L., Wang, S. S. and Khoury. 2003. The role of genetic polymorphism in environmental health. *Environ Health Perspect* **111**, 1055-1065.

8. Ladou, J. 1997. *Occupational and environmental medicine* Prentice-Hall International, Inc.

9. Li, H-S. and Borg, E. 1991. Age related loss of auditory sensitivity in two mouse genotypes. *Acta Otolaryngol* **111**, 827-834.

10. Li, H-S. 1992a. Influence of Genotype and age on acute acoustic trauma and recovery in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol* **112**, 956-967.

11. Li, H-S. 1992b Suppl. Genetic influence on susceptibility of the auditory system to aging and environmental factors. *Scand Audiol* **36**, 1-39.

12. Li, H-S. and Borg, E. 1993. Auditory degeneration after acoustic trauma in two genotypes of mice. *Hear Res* **68**, 19-27.

13. Li, H-S., Hultcrantz, M. and Borg, E. 1993. Influence of age on noise induced permanent TSc in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Audiology* **195**-204.

14. Odawara, M., Sasaki, K., Tachi, Y. and Yamashita, K. 1995. Selection of primers for detection of A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial gene. *Diabetologica* **38**, 377.

15. Schindler, D. N., Jackler, R. K. and Robinson, S. T. 1997. Hearing loss. In: Ladou J, eds: *Occupational and environmental medicine*, 2nd edition, Appleton and Lange p 123-138.

16. Seviour, K. B., Hatamochi, A. and Stewart, I. A. 1998. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* **75**, 170-185.

17. Tamagawa, Y., Kitamura, K., Ishida, T., Hagiwara, H., Abe, K. and Nishizawa, M. 1996. Mitochondrial DNA mutation at nucleotide 1555 in a patient with bilateral sensorineural hearing loss of unknown etiology. *Acta otolaryngol* **116**,

- 796-798.
18. Taylor, W., Pearson, J. and Mair, A. 1965. Study of noise and hearing in jute weaving. *J Acoust Soc Am* **38**, 113-120.
  19. Thalmann, I., Matshinsky, F. M. and Thalmann, R. 1970. Quantitative study of selected of selected enzymes involved in energy metabolism of the cochlear duct. *Ann Otol* **79**, 12-17.
  20. Thomas, A. W., Morgan, R., Majid, A., Rees, A. and Alcolado, J. C. 1995. Detection of mitochondrial DNA mutations in the patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* **38**, 376-379.
  21. Ueda, N., Oshima, T., Ikeda, K., Abe, K., Aoki, M. and Takasaka, T. 1998. Mitochondrial DNA deletion is a pre-disposing cause for sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* **108**, 580-584.
  22. Usami, S., Abe, S. and Kasai, M. 1997. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* **107**, 483-90.
  23. Wald, W. D. 1995. Endogenous factors related to susceptibility to damage from noise. *Occupational Medicine*, state of art review **10(3)**, 561-575.
  24. Wallace, D. C. 1992. Disease for the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* **61**, 1175-1212.
  25. Zenz, C. 1994. *Occupational Medicine*, St. Louis: Mosby Year Book, Inc.