

## 만성 신부전증 환자에서 미토콘드리아 활성과 청력손실과의 연관성

원광대학교 의과대학 전정와우 연구센터,<sup>1</sup> 신장내과학교실<sup>2</sup> 원광보건대학 임상병리과<sup>3</sup>

김 은 숙<sup>1</sup> · 안 선 호<sup>2</sup> · 김 신 무<sup>3</sup> · 소 흥 섭<sup>1</sup> · 박 래 길<sup>1</sup>

### An Association between Mitochondrial Enzyme Activity and Hearing Loss in Patients with Chronic Renal Failure

Eun-Sook Kim<sup>1</sup>, Seon-Ho Ahn<sup>2</sup>, Shin-Moo Kim<sup>3</sup>, Hong-Seob So<sup>1</sup>, and Rae-Kil Park<sup>1</sup>

*Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology<sup>1</sup>, Nephrology of Internal Medicine<sup>2</sup>,  
Institute of Wonkwang Medical Science, College of Medicine,  
Wonkwang University, School of Medicine, Iksan 570-749, Korea  
Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea<sup>3</sup>*

Sensorineural hearing loss is frequently found in patients with chronic renal failure (CRF). There have been many efforts to elucidate the etiologic factors of hearing loss in patients with CRF. However, there was not any clear identified cause of hearing loss. This study was undertaken to evaluate the activity of mitochondrial respiratory chain (MRC) in CRF patients with hearing impairment. To determine MRC activity, peripheral blood cells were obtained from CRF patients with hearing impairment receiving dialysis and normal subjects without any hearing problems. MRC activity of complex I and complex III was measured by the Trounces method. In MRC activities between the normal subjects group and CRF patients with hearing problems, the complex I and III activities of CRF patients with hearing problems were 63% and 85% compared with normal subjects ( $p < 0.01$ ). These results suggest that the activity of MRC may be implicated in the underlying mechanism of the hearing impairment in CRF patients, through mitochondrial DNA mutations at MRC complex I region with a decrement of MRC activity.

**Key words** : Hearing loss, Mitochondrial enzyme activity, Complex I, Complex III

## I. 서 론

신장질환과 내이질환의 연관성은 널리 알려져 있으며 이러한 연관성은 대표적으로 만성신부전증환자에서 보이는 난청을 들 수 있다(Hutchinson와 Klodd, 1982). 만성 신부전증 환자에서 청력손실에 대하여 가장 많은 연구가

진행되어 왔으나 그 원인은 아직 확실히 규명된 바가 없다. 청력손실의 빈도에 대해서는 발표자에 따라 차이가 많으며 그 원인으로는 이독성 약물의 복용, 노인성 난청, 전해질의 불균형, 요독성 독소, 신장과 와우조직의 면역학적 유사성, 빈혈, 장기간의 투석 등이 제기되어 왔으며 (Lee 등, 1999), 최근에는 미토콘드리아 유전자변이로 인한 청력손실에 대한 연구가 진행되고 있다(Jeong 등, 2004). 미토콘드리아 유전자변이는 변이 미토콘드리아 수가 증가됨으로써 미토콘드리아 기능 이상을 보이게 되는

교신저자 : 김신무, (우)570-750 전북 익산시 신용동 344-2.  
원광보건대학 임상병리과  
Tel : 063-840-1211  
E-mail : smkim@wkhc.ac.kr

임상양상을 보이기도 한다. 주로 미토콘드리아 유전자변이와 관련된 질환으로는 신경 근육계질환이나 당뇨병과 관련된 감각신경성 난청, 시각신경계 질환 등 ATP 소모가 많은 신경전달이 관계된 질환이며 이는 모계 유전적 특성으로 나타나고 있다(Shoffner와 Wallace, 1990; van den Ouweland 등, 1992).

미토콘드리아는 세포호흡에 관여가 되는 호흡연쇄 단백질이 mitochondrial DNA(mtDNA) 의해서 13개가 암호화되고 nucleus DNA(nDNA)에서 70개가 암호화되며 complex II, coenzyme Q와 cytochrome C 는 오직 nDNA에 암호화되는 반면, complex I 는 7개, complex III는 1개, complex IV는 3개, complex V는 2개가 mtDNA에 암호화된다(DiMauro, 2004). 산화인산화(oxidative phosphorylation)계의 complex I의 효소 활성의 결핍이 산화인산화계의 결핍을 일으키며 소아과에서 신생아 대사의 이상을 야기하는 중요한 요인이 된다고 보고되었다(Loeffen 등, 2000). Complex I에 영향을 주는 유전자의 변이는 질환유발인자로 알려져 있다(Wallace 등, 1988; Carelli, 2002).

본 연구는 미토콘드리아 유전자변이로 인한 청력손실이 야기될 수 있다는 데에 근거하여 만성 신부전증환자에서 청력이 손실된 환자, 청력이 정상인 환자를 대상으로 미토콘드리아의 complex I 활성과 complex III 활성을 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상

원광대학병원에서 혈액투석실에서 만성 신부전증으로 5년째 혈액투석(Gambro AK 90, Boxter 1550)을 받고 있는 환자 중 이경소견 상 정상이며, 중이염의 과거력이 없고, 소음에 노출된 기왕력이 없으며 두경부의 외상이나 신장이식, 또한 화학요법을 받지 않았던 10명, 20귀를 대상으로 하였다. 청력에 대한 검사는 0.25 kHz에서 8 kHz 사이의 순음청력검사를 시행하였다. 난청은 회화음역에서의 난청과 고음역 난청을 포함하였는데 임상적으로 의미가 있다고 인정되는 난청, 즉 회화음역(0.5, 1, 2 kHz) 및 4 kHz에서의 청력치를 평균하여 25 dB이상일 때로 하였다. 고음역 난청은 4~8 kHz에서 25 dB이상의 난청이 있는 것으로 하였다. 정상인군은 만성신부전증이 있고 청

력이 정상인 사람 10명이며. 난청군은 만성신부전증이 있으며 청력이 손실된 사람 10명을 대상으로 하였다.

미토콘드리아 효소활성검사를 위해 말초혈액을 채취하였다. 혈액을 적혈구 용해 완충액에 부유시킨 후 1000x g에서 2분간 원침하여 백혈구를 얻었다. 백혈구침사를 20 mM/L potassium phosphate 완충액(pH 7.4)으로 2번 씻은 후, 초음파 발생장치(Sonicate, Sonics & Materials Inc., USA)로 4°C에서 50 W로 20초씩 3번 분쇄하였다. 미토콘드리아 단백질을 얻기 위해 음파처리(sonication)된 용액을 15,000x g으로 30분 간 원침하여 상층액을 실험에 사용하였다. 단백질 정량은 bradford 방법(Bradford, 1976)을 이용하여 측정하였다. 효소활성실험은 Trounce 방법(Trounce 등, 1996)으로 하였으며, 모든 과정을 30°C에서 실행하였다.

Complex I 활성 실험(NADH dehydrogenase)은 반응액(250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10  $\mu$ M DB, 2 mM KCN) 1 mL에 미토콘드리아 단백질 100  $\mu$ g을 넣고 30°C에서 10분 반응시킨 후 100  $\mu$ M NADH를 첨가하고 2분 후에 340 nm에서 흡광도(Spectrophotometer, Shimadzu Co, Japan)를 측정하였다.

간단하게 요약하면 Complex III 활성 실험(cytochrome C oxidoreductase)은 반응액(250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50  $\mu$ M cytochrome C, 2 mM KCN) 1 mL에 미토콘드리아 단백질 100  $\mu$ g을 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 Decylubiquinol(DBH2) 50  $\mu$ M을 첨가하고 3분 후에 540 nm에서 측정하였다. 통계처리는 one-way ANOVA 시험으로 실행하였다.

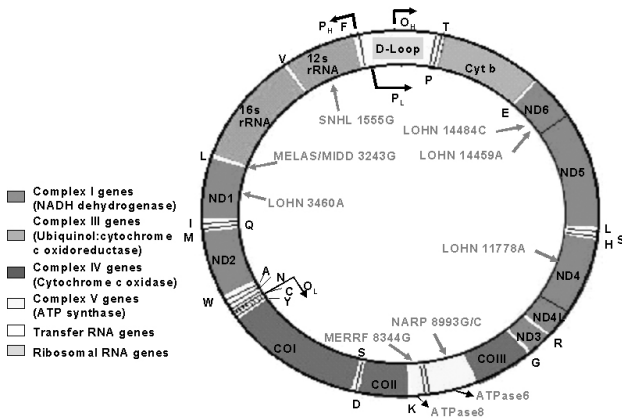
## III. 결 과

만성 신부전증 환자에서 순음청력검사를 시행한 결과 10명에서 난청을 보였다. 정상청력군의 남녀의 비가 7:3 이었고, 연령은 평균 38.25세, 난청군은 남녀의 비가 6:4 이었고, 평균 56.23세였다. 난청은 회화음역보다는 고음역에서 청력손실이 현저한 고음장애형이면서 양측성, 감각신경성의 경향을 보였다. 정상청력군의 평균 순음(pure tone)은 오른쪽 귀는 12.75 dB, 왼쪽 귀는 11.75 dB, 난청군의 평균 순음(pure tone)은 오른쪽 귀는 34.6 dB, 왼쪽 귀는 33.2 dB이었다(Table 1).

만성 신부전증 환자중 정상청력군과 난청군의 complex I 활성비교에서 청력정상군의 활성도를 100%를 기준으로

**Table 1.** Characterization of normal and renal failure hearing loss patients

Group	Sex		Average Age	Average Pure Tone(dB)	
	M	F		Right Ear	Left Ear
Normal (n=10)	7	3	38.25	12.75	11.75
Renal failure, Hearing loss (n=10)	6	4	56.23	34.60	33.20



**Fig. 1.** Human mtDNA map showing the location of selected pathogenic mutations within the 16,569 base pairs genome.

하였을 때 난청군에서 평균 63%의 유의성 있는 활성저하를 보였다( $p < 0.01$ , Fig. 3).

만성 신부전증 환자 중 정상청력군과 난청군의 complex III 활성비교에서 청력정상군의 활성도를 100%를 기준으로 하였을 때 난청군에서 평균 85%의 유의성 있는 활성저하를 보였다( $p < 0.01$ , Fig. 4).

#### IV. 고 찰

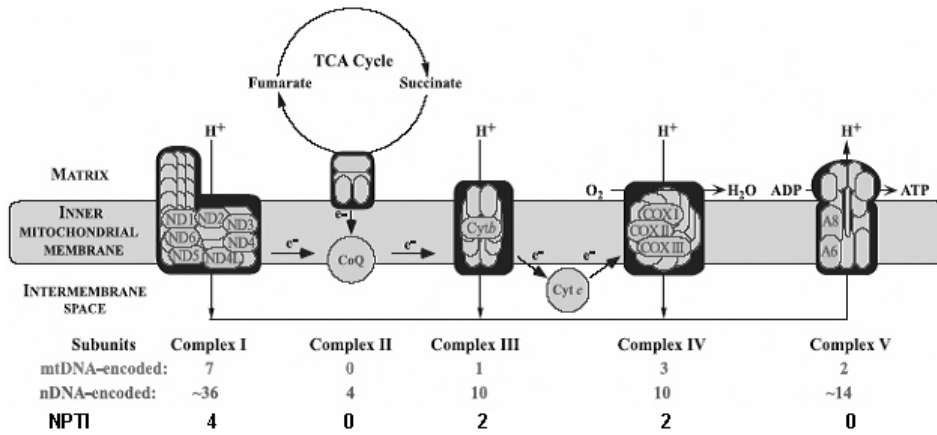
미토콘드리아는 세포에서 필요로 하는 에너지를 생산하는 세포 소기관이며 자신의 DNA를 가지고 있어서 독자적인 정보발현 현상이 일어난다. 이러한 정보발현 유전자에 돌연변이가 일어나면 여러 가지 질병이나 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 인체의 미토콘드리아 유전자는 16,569 염기쌍을 갖는 원형분자로서 산화인산화에 관련된 mRNA, rRNA, tRNA에 필수적인 유전자 13개를 암호화하고 있다(Anderson 등, 1981; Fig. 1).

미토콘드리아 DNA 변이에 의한 질환으로는 뇌, 눈, 골격근과 같은 장기에 이상이 초래되며 미토콘드리아성 근

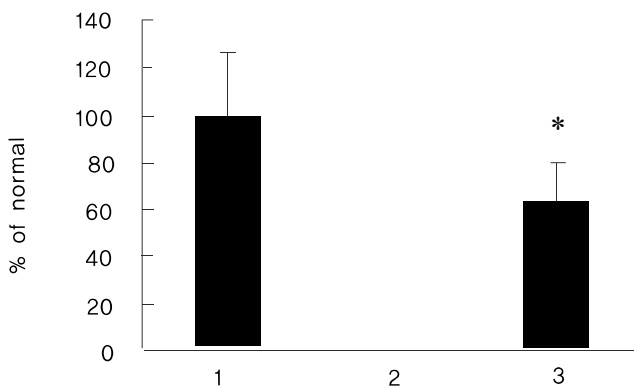
육질환, Kearns-Sayer 증후군, Leber 유전성인 신경병증 등이 대표적으로 알려져 있다(Wallace, 1999). 주요변이로는 G11778A/ND4, G3460A/ND1, 그리고 T14484C/ND6으로 complex I 기능에 변화를 초래함이 밝혀졌다(Brown, 1999). G3460A/ND1 변이는 complex I 전자전달 활성이 60~80%의 감소가 보이는 반면(Majander 등, 1991; Carelli 등, 1997), G11778A/ND4, T14484C/ND6 변이는 정상이거나 약간 감소한다고 보고되었다(Cock 등, 1995; Carelli 등, 1997).

산화인산화과정의 호흡사슬에는 전자전달에 관계된 5 종류의 복합효소가 관여하고 있으며 이 효소의 90%는 nDNA에서 합성되어 미토콘드리아로 이동되고, 나머지 10%는 mtDNA에 의해 합성되어 미토콘드리아 기능에 관여하고 있다(Buemi 등, 1997). 같은 질환에서 똑같이 발견되는 특성이 있는 변이는 질환의 확실성을 간주하게 한다. 주로 신경성 질환에서 미토콘드리아 유전자 재배열이 일어나며 미토콘드리아의 유전자 변이는 미토콘드리아 내막에 존재하는 산화인산화반응에 관여하는 단백질 합성에 결핍이 일어나 산화인산화반응이 원활하게 일어나지 않는다(Jacobs, 2003). 미토콘드리아 유전자변이 정도가 심할수록 청력감퇴가 일찍 시작되지만 미토콘드리아 유전자 변이가 어떻게 와우기능의 점진적인 이상을 초래하는지 그 기전은 확실하게 밝혀져 있지 않다. 그러나 혈관조나 청신경세포는 이온펌프가 있어  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  이온의 농도를 적당하게 조절하는 기능이 청각에서 중요하며 이러한 이온펌프의 작동에는 ATP가 필요하고 필요한 ATP는 미토콘드리아에서 가장 효과적으로 생산되어진다. 미토콘드리아 유전자변이는 산화인산화 반응에 필요한 단백질 합성과정에 영향을 주기 때문에 ATP 생성부족을 초래하여 점진적인 청력감퇴를 유발하게 된다(Ortopassi와 Hutchin, 1994).

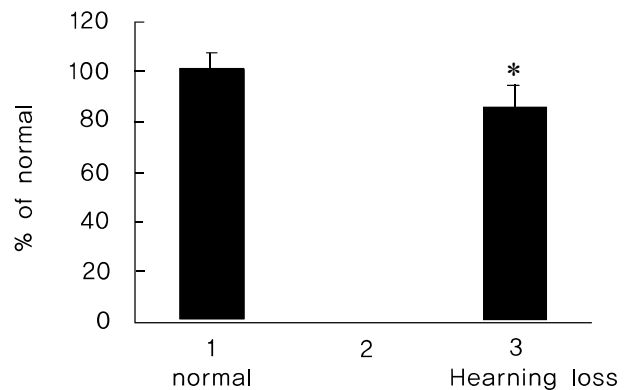
이에 저자들은 미토콘드리아 유전자 변이가 미토콘드리아 단백질 합성에 불균형을 초래하여 미토콘드리아 효소활성 저하로 이온펌프기능에 영향을 주어 난청을 유발



**Fig. 2.** Structure of genetic derivation of OXPHOS complex subunits. Adapted of Salvatore DiMauro, 2004, *Biochimica et Biophysica Acta* 1658:80-88



**Fig. 3.** Complex I (NADH reductase) activity in peripheral blood from normal hearing group and hearing loss group of CRF patients. \* $p < 0.01$  by one-way ANOVA analysis, compared to normal hearing group. The data represent the means  $\pm$ SD of three independent experiments.



**Fig. 4.** Complex III (cytochrome C oxidoreductase) activity in peripheral blood from normal hearing group and hearing loss group of CRF patients. \* $p < 0.01$  by one-way ANOVA analysis, compared to normal hearing group. The data represent the means  $\pm$ SD of three independent experiments.

시킬 수 있다는 위에 서술되어진 내용을 근거로 본 연구를 수행하였다. 미토콘드리아는 세포호흡에 관여가 되는 호흡연쇄 단백질이 mtDNA에 의해서 13개가 코딩되고 nDNA에서 70개가 코딩된다(Fig. 2). Complex II, coenzyme Q와 cytochrome C는 오직 nDNA에 코딩된 반면, complex I(ND1-ND4, ND4L, ND5, ND6)는 7개, complex III(cytochrome b)는 1개, complex IV(COX I-COX III)는 3개, complex V(ATPase 6, ATPase 8) 2개는 mtDNA에 코딩된다(DiMauro, 2004). 미토콘드리아는 산화인산화반응을 위해 complex I, II, III, IV, V의 단백질에 의해서 전자전달이 일어난다. 전자전달과정은 complex I, III, IV, V 과정, complex II, III, IV, V 과정으

로 나누어진다. 대부분의 ATP는 당분해과정을 거쳐서 생성된 NADH, FADH에서 complex I, II에 전자를 전달해 줌으로써 시작된다. 그러나 NADH로부터 전자를 받아들이는 complex I(NADH reductase)의 단백질 결합과 전자를 보내주는 complex I(NADH oxidase)의 단백질 결합은 Co Q에 전자전달을 못하고 ROS를 생성하게 되는 과정을 가지게 된다. Complex I는 미토콘드리아 DNA에 의한 단백질 합성이 이루어지므로 ND1-ND6의 유전자 변이는 complex I의 활성저하를 일으키게 된다.

본 연구는 청력정상군과 난청군을 대상으로 complex I, III 활성 실험을 하였다. 연구결과 complex I 활성은 청력

정상군의 활성도를 100%로 하였을 때 난청군이 63%로 나타났으며 complex III 활성은 청력정상군의 100%에 대해서 난청군이 85%로 나타났다. 두 군간에 특히 complex I 활성에 차이를 보였다. 이런 결과는 complex I 활성이 청력과의 연관성이 있을 수 있는 것으로 추론할 수 있다. 만성 신부전증 환자에서 보이는 청력 소실의 양상은 거의 모든 보고자들이 양측성, 감각신경성, 6 kHz, 와 8 kHz에서 청력손실이 현저한 고음장애형이라고 보고하였다(Hutchinson와 Klodd, 1982). 본 연구에서 대상수가 많지 않았으나 대부분의 신부전증 난청군의 청력 양상이 감각신경성과 고음장애형을 보임을 알 수 있다. 본 연구에서 아직까지 투석이 청력에 미치는 영향에 대해 확실하게 밝혀져 있지 않기 때문에 실험군을 5년째 혈액투석을 하는 만성 신부전증 환자를 대상으로 하였다.

차후 추가연구가 필요한 부분들은 첫째, 현 연구가 예비조사의 형식으로 실험군의 대상수가 많지 않으므로 보다 많은 수를 대상으로 하는 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다. 둘째, 미토콘드리아 활성저하가 청력손실을 야기시키는 요인으로 작용하는지는 ATP 생성량, ROS 생성량, 저해제의 영향에 대한 추가적인 연구가 필요할 수 있다. 셋째, 미토콘드리아 유전자 변이로 인하여 단백질 합성에 영향을 주었는지에 대해서도 연구가 필요할 수 있다. 넷째, complex I의 영향만 있는지는 앞으로 complex 구조물들의 각각의 활성도에 대한 실험이 이루어져야 할 것 같다. 본 실험에서는 연령에 대해서 고려되지 않았으며 대상에서 고령으로 인해 노인성 난청의 청력손실이 나타날 수 있어 신부전증과 청력손실의 관계에서 미토콘드리아의 변이에 대한 명백한 규명이 있어야 할 것으로 생각된다. 다섯째, 미토콘드리아의 변이가 노화의 원인이 될 수 있으므로 노인성 난청에서도 미토콘드리아의 유전자 변이 비율이 높을 것으로 추정되어 노인성 난청환자를 대상으로 하는 연구도 향후 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 만성 신부전증 환자의 청력정상군과 난청군을 대상으로 미토콘드리아의 complex I, III 활성 실험을 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. Complex I 활성은 청력정상군의 활성도를 100%로 하였을 때 난청군이 63%로 유의하게 활성이 저하되었다( $p < 0.01$ , Fig. 3). Complex III 활성은 청력정상군의 100%에 대해서 난청군이 85%로 유의한 활성저하를 보였다( $p < 0.01$ , Fig. 4). 두 군간에 특히 complex I 활성에 현저한 차이를 보여, 이런 결과는 complex I 활성이 청력과의 연관성이 있을 것으로 암시할

수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 원광대학교 Vestibulocochlear Research Center(VCRC) 지원으로 수행되었음(R13-2002-055-00000-0).

## 참고 문헌

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465, 1981.
2. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
3. Brown MD. The enigmatic relationship between mitochondrial dysfunction and Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 165:1-5, 1999.
4. Buemi M, Allegra A, Rotig A, Gubler MC, Aloisi C, Corica F, Pettinato G, Frisina N, Niaudet P. Renal failure from mitochondrial cytopathies. *Nephron* 76:249-253, 1997.
5. Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy. In Schapira AHV, DiMauro SD(eds.). *Mitochondrial Disorders in Neurology*. 2nd ed, p.115-142 Butterworth-Heinemann, Boston, 2002.
6. Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Bacchilega E, Sangiorgi S, Mancini R, Leuzzi V, Cortelli P, Montagna P, Lugaresi E, Degli Esposti M. Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology* 48:1623-1632, 1997.
7. Cock HR, Cooper JM, Schapira AHV. The 14484 ND6 mtDNA mutation in Leber hereditary optic neuropathy does not affect fibroblast complex I activity. *Am J Hum Genet* 57:1501-1502, 1995.

8. DiMauro Salvatore. Mitochondrial diseases. *Biochem Biophys Acta* 1658:80-8, 2004.
9. Hutchinson JC, Klodd DA. Electrophysiologic analysis of auditory, vestibular and brain stem function in chronic renal failure. *Laryngoscope* 92:833-842, 1982.
10. Jacobs HT. Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Hum Mol Genet* 12:293-301, 2003.
11. Jeong HS, Lim MJ, Chang SO, Kim CS, Oh SH. The frequency of mitochondrial mutations in Korean non-syndrome sensorineural hearing loss. *Korean J Otolaryngol* 47:206-211, 2004.
12. Lee HK, Park YH, Kang JM, Kim OY, Lee SK, Kwon YJ, Cho SH. Hearing loss in patients with chronic renal failure with hemodialysis treatment. *Korean J Otolaryngol* 42:1112-1116, 1999.
13. Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengersm RC, van den Heuvel LP. Isolated complex I deficiency in children: Clinical biochemical and genetic aspects. *Human Mut* 15:123-134, 2000.
14. Majander A, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen EK, Wikstrom M. Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett*. 292:289-292, 1991.
15. Ortopassi G, Hutchin T. A molecular and cellular hypothesis for aminoglycoside-induced deafness. *Hearing Res* 78:27-30, 1994.
16. Trounce IA, Yoon L, Kim, Albert SJ, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 264:484-509, 1996.
17. Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative phosphorylation disease. Disorders of two genomes. *Adv hum Genet* 19:267-330, 1990.
18. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA.. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet* 1:368-371, 1992.
19. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488, 1999.
20. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242(4884): 1427-1430, 1988