

소음성 감각신경성 난청에서의 Mitochondrial DNA A3243G 돌연변이

계명대학교 의과대학 예방의학교실 및 동산병원 산업의학과, 미생물학교실¹⁾

정인성 · 신동훈 · 백원기¹⁾

— Abstract —

Mitochondrial DNA A3243G mutation in noise-induced sensorineural hearing loss

In-Sung Chung, Dong-Hoon Shin, Won-Ki Baek¹⁾

*Department of Preventive Medicine, Microbiology¹⁾, School of Medicine,
Department of Occupational and Environmental Medicine,
Dongsan Medical center, Keimyung University*

Objectives : A different sequence change, in the mitochondrial tRNA^{LEU(UUR)} gene, has been proposed as a candidate mutation in the sensorineural hearing loss. The purpose of current study is to identify the association between the noise-induced sensorineural hearing loss and the A to G mutation at nucleotide 3243 of mitochondrial DNA.

Methods : Subjects were established by history and chart review, and audiological and clinical data were obtained. Blood was sampled from 101 controls, 50 noise-induced hearing loss, and 12 sensorineural deafness. The DNA of these individuals was extracted, and mitochondrial genome was analyzed by polymerase chain reaction. Subsequently, the coding sequence of mitochondrial genome was sequenced, and compared to the normal sequence, and all sequence variations were analyzed by restriction endonuclease ApaI.

Results : Mitochondrial DNA mutation (3243A→G) was not detected by polymerase chain reaction (PCR) in any patients with noise-induced hearing loss, sensorineural hearing loss, and normal control without hearing loss in Koreans. The DNA sequencing of PCR products did not revealed an A to G substitution at nucleotide 3243 of mitochondrial DNA.

Conclusions : The noise-induced sensorineural hearing loss was not associated with mitochondrial DNA mutation (3243A→G).

Key Words : Mitochondrial DNA mutation, Noise-induced sensorineural hearing loss

〈접수일 : 2000년 7월 7일, 채택일 : 2000년 8월 3일〉

교신저자 : 신 동 훈(Tel : 053-250-7495) E-mail : dhshin@dsmc.or.kr

* 본 연구는 1998년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

서 론

산업장 소음이 건강에 미치는 영향은 잘 알려져 있으며, 그 중 문제가 되고 있는 것은 소음성난청(noise-induced hearing loss)이다. 우리나라의 특수 건강진단을 통한 전체 직업병 유소견자 중 소음성난청 유소견자가 차지하는 비율이 1994년 56.9%(1,746명)를 차지하여 전체 직업성 질환 유소견자의 50% 이상을 차지하고 있다(노동부, 1995). 앞으로 산업의 기계화가 가속화 됨으로써 소음성 난청에 대한 문제는 심각해질 전망이다 소음에 폭로되는 근로자들의 청력보존을 위한 대책이 시급한 실정이다.

소음성난청은 내이 와우각의 감각상피(sensory epithelium)를 구성하고 있는 청세포들의 stereocilia가 임파액의 파동에 의해 형성된 전단력(shearing forces)에 의해 변형되거나 파괴됨으로써 발생하며, 지속적으로 높은 수준의 소음에 노출시 주로 고주파(high frequency)영역의 청세포가 손상되어 난청을 유발한다. 소음성 난청은 일반적으로 청력검사상 양측성이며, 감각신경성난청(sensorineural hearing loss: SNHL)의 소견을 나타내고, 초기에는 고주파영역(4 KHz)에서 특징적인 순음청력역치의 감소를 나타내지만, 계속적인 소음 노출시 회화영역까지 청력역치가 떨어지게 되고, 심한 경우는 완전히 청력을 잃어버리게 된다. 또한 나이가 증가함에 따라 나타나는 노인성난청은 소음성난청의 정도를 더욱 심화 시키며, 소음성 난청이 있는 경우는 aminoglycoside와 같은 항생제 및 이독성 부작용을 가진 물질에 감수성이 커지게 된다(Schindler 등, 1997)

소음에 의한 청력손실의 감수성을 예측하기 위한 많은 방법들이 있으나 대부분이 일시적 청력역치손실(temporary threshold shift: TTS)을 측정하여 영구적 청력역치손실(permanent threshold shift: PTS)에 대한 감수성의 정도를 파악하는 방법을 이용하고 있다. 그러나 이 방법은 TTS와 PTS 간의 연관성이 낮아 실질적인 개인의 감수성을 파악하기는 부족한 것으로 알려져 있다(Burns, 1973; Buck와 Franke, 1986).

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 개체간에 차이를 보이는데, 이러한 차이는 유전적인 요인에 의한 것으로 설명하고 있으며(Cody와 Robertson, 1983), Taylor 등(1965)은 99-102 dB의 일정한 소음에 1년에서 54년동안 폭로되어 온 여성직공들의 청력손실의 정도가 최고와 최저청력손실을 가진 사람에서 70 dB이나 차이가 있음을 보고한 바 있다.

소음성난청에 있어서 유전학적 특성과 연령의 상호작용은 이론적으로나 실제적으로 중요하므로 이들 상호작용을 알아보기 위하여, 사람의 노인성난청과 비슷한 고주파영역에서 일차적으로 청력역치손실이 발생하는 마우스 근친교배종(inbred strains), CBA/Ca와 C57 BL/6J 유전자형을 이용한 동물실험에서 두종의 유전자형에 따라 연령에 증가함에 따라 청각 변성에 차이가 나며, 소음에 의한 청각손상에 대한 감수성이 다르게 나타났다(Li, 1992a,b; Li와 Borg, 1991, 1993; Li 등, 1993). 또한 염색체 10에 위치해 있는 Ah1 유전자형이 소음성 난청에 대한 감수성을 높이는 것으로 알려져 있다(Erway 등, 1996). 이러한 결과는 소음성 난청에 대한 감수성에 있어 유전적인 소인이 중요한 요인임을 시사하는 것으로 생각된다.

Mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA)에 대한 연구는 반응성 산소의 대사에 의한 손상, 허혈, 신경성질환, 노화 그리고 특히 최근에 청력장애에 있어 새로운 연구분야로 알려지게 되었다(Schapira 등, 1989; Cortopassi and Arnheim, 1990; Miyabayashi 등, 1991; Corral-Debrinski 등, 1991; Ballinger 등, 1992; Shoffner and Wallace, 1992). MtDNA는 nuclear DNA보다 10~20배 높은 돌연변이율을 나타낸다. 그러므로 mtDNA의 돌연변이는 사람 질병의 중요한 원인이 될 수 있고(Linnane 등, 1985), 특히 내이 와우각의 병변과 관련된 청력장애의 연구에 중요한 분자생물학적인 연구방법이 될 수 있다(Seidman 등, 1996).

MtDNA 손상은 안정된 조직에서 축적이 잘 되며(Wallace, 1992), cochlear의 세포는 태생기에 이미 유사분열(mitosis)을 끝마쳤기 때문에 mtDNA 돌연변이가 cochlear에 축적되는 경향이 있으므로,

SNHL환자에서 cochlear 조직 뿐만아니라, 백혈구의 mtDNA 돌연변이의 축적 또한 청력소실과 관련이 있을 것이다(Tamagawa 등, 1996; Ueda 등, 1998). MtDNA의 유전학적인 설명에 의하면, 청각 경로에도 mtDNA 돌연변이가 확실히 존재하며, 이러한 이유로 mitochondria의 기능은 감소될 것으로 생각된다. 그러므로 사람의 측두골(temporal bone)에서 mtDNA를 분석한다는 것은 실제 불가능하기 때문에 직접적으로 청각경로에 있어 mtDNA의 돌연변이 전체를 반영하지는 않지만 말초혈액의 백혈구로부터 mtDNA 돌연변이를 분석함으로써 감각신경성 난청에 대한 mtDNA 돌연변이의 관련성 유무를 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

그러므로 본 실험은 소음성난청 환자의 말초혈액의 백혈구에서의 mtDNA를 분자생물학적인 기법으로 분석하여 mtDNA A3243G 돌연변이 유무를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대상자

소음 특수건강진단을 위해 내원한 수진자 중 직접 면담을 통하여 이비인후과적 질병이나 대사성질환(당뇨병 등), 이독성을 나타내는 약물의 복용 그리고 가족성 난청의 경험이 없는 사람을 대상으로 순음청력검사, 음차검사, 언어청력역치검사, 이경검사를 실시하여, 500, 1000, 2000 Hz의 평균청력손실이 30 dB 이상이고 4000 Hz에서 40 dB 이상의 청력손실을 보이며 감각신경성난청의 소견을 보이는 50명을 소음성 감각신경성난청 환자군으로 선정했다. 소음에 대한 노출력과 이비인후과적 질병력이 없고 순음청력검사상 청력손실의 소견이 없는 정상인 101명을 대조군으로 하였다. 양성대조군은 이비인후과에서 원인을 알 수 없는 감각신경성 난청으로 진단된 환자 12명으로 하였다. 대상자의 평균연령은 대조군 45.7세(범위: 24~63세), 감각신경성 난청 환자군 44.8세(범위: 20~67세), 소음성 감각신경성 난청 환자군 46.1세(범위: 19~57세) 였다.

2. DNA 추출

대상자의 말초혈액으로 부터 DNA를 추출하였다. 50 ml polypropylene 시험관에 blood buffer 30

ml (10X buffer 3 ml + H₂O 27 ml)를 넣은 후, 전혈 10 ml를 넣고 5회 섞었다. 얼음에 15분 동안 방치하여(3분에 한번씩 mix) 용혈시키고, 3500-5000 rpm으로 실온에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고(10 ml blood buffer 넣고 1-5회 반복), 10 ml의 SE buffer(75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0) 넣고 혼합한 후 ice에 잠시 방치하고, 500 μl 10 % SDS, 100 μl의 10 mg/ml proteinase K 넣고 잘 혼합한 다음, 25℃에서 밤새 incubation하였다.

10 ml의 phenol(Tris-Saturated) 넣고 10분간 mix 한 후 3500 rpm으로 실온에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 polypropylene tube로 옮기고 phenol 7 ml/chloroform : isoamylalcohol 7 ml 넣고 10분간 혼합한 후, 3500 rpm으로 실온에서 20분간 원심분리하고 상층액을 새로운 polypropylene tube로 옮겼다. 다시 chloroform: isoamylalcohol(24:1) 14 ml 넣고 10분간 혼합 후 3500 rpm으로 실온에서 20분간 원심분리하고 상층액을 새로운 polypropylene tube로 옮겼다. 1/10 volume (1.5 ml) 3 M sodium acetate 넣고 2 volume (30 ml)의 ethanol(absolute, 실온)을 넣고 10~20회 혼합 후 잠시 실온에 방치한 다음, Pasteur pipet으로 DNA를 건져 내어 microfuge tube에 1 ml 70 % ethanol이 들어있는 속으로 DNA넣고 10회 정도 혼합하였다. Pasteur pipet으로 다시 DNA를 회수하여 적당량의 1X TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)(1 ml)가 들어있는 microfuge tube에 넣고 10회 뒤집어 섞은 후 37 ℃에서 3시간 동안 혼합하고 DNA를 녹여서 UV-spectrophotometer로 DNA 양을 측정하였다. 2 % 한천 겔에서 전기영동하여 DNA를 확인 후 4℃에 보관하면서 다음단계의 실험에 이용하였다.

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

MtDNA에서 3243 부위의 A->G 돌연변이 유무를 관찰하기 위하여 mtDNA 3243부위가 포함된 mtDNA fragment를 PCR을 통하여 증폭하였다. PCR에 이용된 forward primer는 3130부터 3149 부위가 포함되는 5' AGGACAAGAGAAATA AGGCC 3' 이며, reverse primer는 3423부터

3404부위가 포함되는 5' CACGTTGGGGCC-TTTGCGTA 3'이었다. DNA시료를 95℃에서 90초간 예열하여 변성시킨 후 PCR에 사용하였다. PCR은 10X reaction buffer(15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 μl 와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP각 1 μl 씩 그리고 20 μM forward 및 reverse primer를 각각 5 μl를 넣은 mixture에 0.5 μg의 변성된 DNA시료와 2.5 unit의 Taq polymerase를 넣은 후 증류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 중층한 후 DNA thermal cycler를 사용하여 PCR을 시행하였다. DNA denaturation은 94℃ 1분, annealing은 52℃ 1분, extension은 72℃ 1분으로 하여 30 cycle을 시행하였다. 합성된 PCR product를 전기영동하여 294 bp의 DNA band를 확인하였다. 확인된 PCR product 10 ul를 ApaI 제한효소로 37℃에서 2시간내지 밤새 처리한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 digested mtDNA fragment(179 bp and 115 bp)를 관찰하였다.

4. T-vector를 이용한 cloning

PCR산물을 Novagen사의 pT7 Blue T-vector로 cloning하였다. PCR산물을 chloroform-isoamyl alcohol로 정제한 후 pT7 Blue T-vector와 5:1(insert:vector)의 molar ratio로 T4 DNA ligase를 사용하여 16℃에서 5시간 ligation시킨 후 transformation을 시행하였다. Transformation은 ligation product 1 μl와 NovaBlue competent cell을 사용하여 heat shock 방법으로 시행하였다. 50 ul의 transformant 배양액을 X-gal(5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside)와 IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)를 함유하는 ampicillin(50 μg/ml)-tetracycline(15 μl/ml) 약제 LB 고형배지에 배양하였다. 배양 후 흰색의 집락만을 선택하여 alkaline lysis method로 plasmid를 분리한 후 T7 promotor primer와 U-19mer primer를 사용하여 PCR로 확인하고 이를 다시 ApaI 제한효소를 이용하여 PCR을 시행하여 recombinant plasmid를 확인하여 최종확인된 clone에 대하여 DNA염기 서열분석을 시행하였다.

5. MtDNA 염기서열 분석

Cloning된 insert의 점돌연변이를 확인하기 위하여 USB사의 Sequenase version 2.0 Kit를 사용하여 dideoxy chain termination method로 double strand DNA sequencing을 시행하였다. Cloning된 plasmid DNA를 alkaline lysis method로 분리하고 분리된 5 μg의 DNA solution에 0.1 volume의 2 M NaOH, 2 mM EDTA solution을 혼합한 후 37℃에 30분 incubation하여 denaturation한 다음 0.1 volume의 3 M sodium acetate(pH 5.0)를 가하여 중화시키고 4 volume의 ethanol을 가하여 -70℃에 15분간 둔 후 원심(12,000 rpm, 4℃, 15분)하여 DNA 침사를 얻은 후 이를 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 DNA를 7 μl의 증류수에 녹이고 reaction buffer 2 μl, sequencing용 primer 1 μl (0.5 pM/μl, 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3')를 첨가한 후 annealing, labelling reaction (35S-dATP사용), termination reaction을 시행한 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 75℃에 2분 두어 denaturation시킨 후 6% urea(7.5 M) polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 전기영동된 gel은 5% acetic acid, 15% methanol solution에 20분간 담구어 urea를 제거한 후 gel dryer를 사용하여 건조시키고 36시간 동안 autoradiography를 시행한 후 염기서열을 분석하였고, double strand DNA cycle sequencing system(Applied Biosystems model 373, Perkin-Elmer Cetus Co.)을 사용하여 확인하였다.

결 과

MtDNA 돌연변이(3243A→G)를 관찰하기 위하여 PCR로 증폭한 후 전기영동을 한 결과, 돌연변이 부위가 포함된 294 bp fragment가 대조군, 감각신경성난청 환자군, 그리고 소음성 감각신경성난청 환자군 모두에서 증폭됨을 관찰할 수 있었다. 또한 294 bp fragment가 나타난 PCR 산물을 restriction endonuclease ApaI 으로 처리한 결과 digested fragment (179 bp와 115 bp)는 나타나지 않았으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일

어나지 않았음을 관찰할 수 있었다. 즉 mtDNA 돌연변이 (3243A→G)이 발생하면 restriction endonuclease ApaI의 restriction sequence (GGGCC↓C)로 염기서열이 변하기 때문에 294 bp fragment가 179 bp와 115 bp의 두개의 frag-

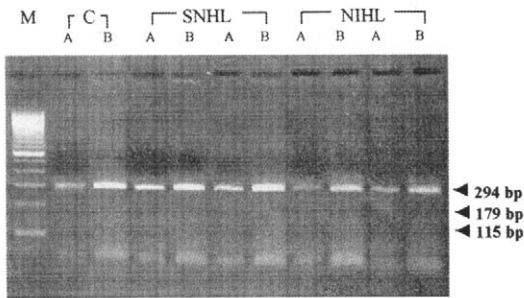


Fig 1. Detection of the mtDNA samples from the control subjects and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss and the unknown origin of sensorineural hearing loss. The mtDNA fragment were amplified by PCR using primer, seperated on 2 % agarose gel, and stained with ethidium bromide. The 294 bp fragment is detected in all lanes(A). The band of 179 bp and 115 bp can be not seen in all subjects after digestion of mtDNA fragment with ApaI(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.

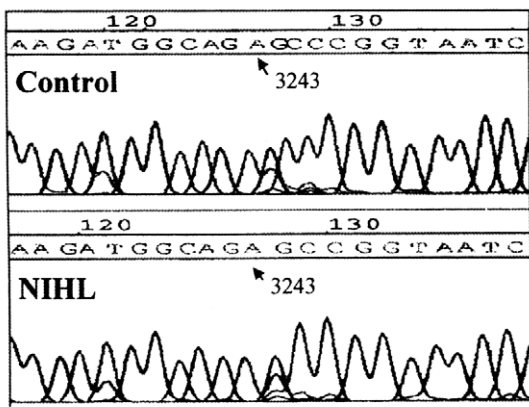


Fig 2. The DNA sequencing of the spanning of nucleotide 3243 from a normal control and the patients with noise-induced sensorineural hearing loss in fig 1. An A to G substitution at nucleotide 3243 was not demonstrated in the patient.

ment로 분리되어 나타나게 된다(Figure 1).

MtDNA 돌연변이(3243A→G)가 관찰되지 않았으므로 PCR산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243부위에서의 염기서열을 확인한 결과 이미 밝혀진 사람의 mtDNA 3243부위의 염기서열과 동일한 염기서열임이 확인 되었으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일어나지 않았음을 확인하였다(Figure 2).

고 찰

산업보건의 직업성질환 예방 프로그램의 일환으로 소음에 폭로되어 발생하는 청력손실의 정도에 대한 개개인의 차이를 연구하는 것은 중요한 의미를 가진다. 소음에 대한 개인의 감수성을 알아내어 특히 감수성이 큰 사람에 대해 예방방법을 권고함이 소음에 의한 직업성 난청의 예방에 기본적인 내용이다.

MtDNA 돌연변이에 의해 유발된 SNHL의 기전은 확실히 밝혀진 것이 없다. 지금까지 알려진 하나의 기전으로 소포체의 산화성 인산화과정에서 organ of Corti와 stria vascularis가 에너지대사에 대한 의존성 때문이라고 설명하고 있다 (Thalman 등, 1970). 즉 MtDNA mutant가 축적됨으로써 산화성인산화의 능력이 떨어지고, 소포체에서 ATP생산이 저하되면서 cochlea의 energy-dependent ATPase와 신경전달물질의 분비가 억제됨으로서 청력소실이 나타날 수 있다는 것이다. 또 다른 기전은 이온 수송의 장애로 청음변환(acoustic transduction)의 효율이 떨어져 청력손실이 발생할 수 있다. (Ikeda 등, 1994).

본 실험은 소음성 난청으로 진단된 환자를 대상으로 말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출한 후, 중합효소연쇄반응으로 증폭하고 유전자 제한효소로 소화하여 전기영동하고 UV transilluminator에서 관찰하였다. 그리고 PCR산물의 DNA염기서열 분석을 실시하여 mtDNA A3243G 돌연변이를 관찰하였다. 그 결과 돌연변이 부위가 포함된 294 bp fragment가 대조군, 감각신경성난청 환자군, 그리고 소음성 감각신경성난청 환자군 모두에서 증폭됨을 관찰할 수 있었다. 또한 294 bp fragment가 나타난 PCR산물을 restriction endonuclease ApaI으로 처리한 결과 digested fragment (179 bp와

115 bp)는 나타나지 않았으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일어나지 않았음을 의미한다. 즉 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 발생하면 restriction endonuclease ApaI 의 restriction sequence (GGGCC↓C)로 염기서열이 변화하기 때문에 249 bp fragment가 179 bp와 115 bp의 두개의 fragment로 분리되어 나타나게 된다. MtDNA 돌연변이(3243A→G)가 관찰되지 않은 PCR산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243부위에서의 염기서열을 확인한 결과, 이미 밝혀진 사람의 mtDNA 3243부위의 염기서열과 동일한 염기서열임이 확인 되었으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일어나지 않았음을 확인하였다.

MtDNA돌연변이는 PCR과 특이 제한효소를 이용한 방법으로 쉽게 조사할 수 있으며 ethidium bromide로 염색한 후 agarose gel로 쉽게 확인할 수 있다. 위음성(false-negative)율은 돌연변이가 발생한 환자의 말초혈액 백혈구에서 10 % 이하로 매우 낮다(Thomas 등, 1995). 그러나 Odawara 등(1995)의 연구보고에 의하면 말초혈액에서의 미토콘드리아 genome의 돌연변이 DNA군이 상대적으로 낮아 band가 약하게 나타나기 때문에 3243 돌연변이 screening시 발견하기 어려운 점이 있고, 본 실험에서 사용된 primer대신 forward(3035-3054), backward (3456-3437) primer를 사용하면 제한효소를 처리시 212 bp 와 214 bp로 분리된 fragment가 나타나기 때문에 분명한 하나의 band를 확인할 수 있으므로 PCR을 위한 primer의 선택이 돌연변이를 발견할 확률을 높일 수 있다고 하였다. 본 실험에서 PCR을 위해 사용한 primer가 위에서 추천한 것은 아니었고 그리고 agarose gel을 사용하였으므로 실험상의 오차가 발생할 여지가 있을 수 있지만, DNA 염기서열분석을 통한 염기서열 확인을 하였으므로 위에서 제시된 제한점으로 인한 위음성의 결과라고는 생각되지는 않는다.

Oshima 등(1996)이 보고한 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 나타난 환자의 특징은 원인을 알 수 없는 양측 대칭성, 당뇨병이 동반된, 또는 모계유전성 감각신경성 난청으로 성인에서 후천적으로 나타난 경우이다. 본 실험에 양성대조군으로 이용된 감각신경성 난청환자는 원인을 알 수 없고 성인에서

발생한 양측성이었으며 당뇨병을 동반한 환자를 포함하고 있었으나 감각신경성 난청의 가족력을 가진 대상자는 없었으므로 mtDNA point mutation(3243A→G)을 발견할 수 없었던 것으로 생각된다. 그러나 본 실험의 결과 소음성 감각신경성 난청, 정상대조군에서도 돌연변이는 관찰되지 않았으므로 우리나라에서의 가족력이 없는 소음성 감각신경성 난청과 mtDNA 돌연변이(3243A→G)는 관련성이 없을 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 나타나지 않았지만 최근에 SNHL가 mtDNA 돌연변이와 관련이 있다는 많은 연구 보고들이 있는데, SNHL의 높은 발생율을 나타내는 MELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes)는 mitochondrial leucine transfer RNA^{UUR}의 3243위치에서 A→G 돌연변이와 관련이 있다(Goto 등, 1993). 또한 MELAS증후군이 없는 SNHL의 환자에서도 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 발견됨으로서 SNHL와 관련이 있음을 보고하고 있다(Reardon 등, 1992; Remes 등, 1993). 또한 원인을 알 수 없는 양측성 감각신경성 난청 환자에서는 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 발견되었다(Oshima 등, 1996). 이러한 연구 보고들은 청각기(hearing organ)가 mtDNA 돌연변이의 주요 대상 기관이 되며, mtDNA가 genetic deafness에 대한 고감수성(hypersensitivity)의 원인이 될 수 있음을 시사하고 있으므로 조사대상자 수의 확대와 감각신경성난청자들의 병력, 가족력 등의 특성을 고려한 대상자선정을 통하여 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 감각신경성난청과 관련된 mtDNA의 돌연변이는 nucleotide 3242외에 nucleotide 1555(Tamagawa 등, 1996), nucleotide 7445 부위(Fischel-Ghodsian 등, 1995)가 있으며, mtDNA 4977 bp 결실(deletion)이 관련성이 있다는 연구 보고(Ueda 등, 1998)가 있으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하며, 2 kb이상을 증폭시키는 long and accurate polymerase chain reaction(LA PCR)을 사용하여 미토콘드리아 DNA전체를 분석하여 소음성 감각 신경성 난청과 mtDNA 돌연변이의 관련성을 밝히기 위한 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

목 적 : 본 실험은 소음성 감각신경성난청 환자의 말초혈액의 백혈구에서의 mitochondria DNA를 분자생물학적인 기법으로 분석하여 mtDNA 돌연변이(3243A→G)와 소음성 감각신경성난청과의 관련성을 조사하였다.

방 법 : 소음성 감각신경성난청으로 진단된 환자를 대상으로 말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출한 후, DNA중합효소의 연속적인 반응을 이용하여 DNA를 대량으로 증폭하는 방법, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction:이하 PCR)으로 증폭한 후 유전자 제한효소로 소화된 mtDNA fragment를 2 % 한천 gel에서 전기영동하고 ethidium bromide용액으로 염색하여 UV transilluminator에서 관찰하였다. 그리고 PCR산물을 T-vector를 이용하여 cloning 한 다음 DNA염기서열 분석을 실시하여 mtDNA A3243G 돌연변이를 관찰하였다.

결 과 : MtDNA 돌연변이 부위가 포함된 294 bp fragment가 대조군, 감각신경성난청 환자군, 그리고 소음성 감각신경성난청 환자군 모두에서 증폭됨을 관찰할 수 있었다. 또한 294 bp fragment가 나타난 PCR산물을 restriction endonuclease ApaI으로 처리한 결과 digested fragment(179 bp와 115 bp)를 관찰할 수 없었으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일어나지 않았음을 알 수 있었다. MtDNA 돌연변이(3243A→G)가 관찰되지 않은 PCR산물을 이용하여 DNA 염기서열을 분석하여 mtDNA 3243부위에서의 염기서열을 확인한 결과 이미 밝혀진 사람의 mtDNA 3243부위의 염기서열과 동일한 염기서열임이 확인되었으므로 mtDNA 돌연변이(3243A→G)가 일어나지 않았음을 확인하였다.

결 론 : 소음성 감각신경성 난청, 정상대조군에서도 돌연변이는 관찰되지 않았으므로 소음성 감각신경성 난청과 mtDNA 돌연변이(3243A→G)는 관련성이 없음을 알 수 있었다.

참고문헌

노동부. 노동통계연감, 1995.

Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, et al. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* 1992;1:3-7.

Buck K, Franke R. Can TTS be an indicator for individual susceptibility to PTS ? In: Salvi RJ, Henderson D, Hameric RP, Coletti W. eds. Basic and applied aspects of noise-induced hearing loss. New York. Plenum Press, 1986.

Burns W. Temporary effects of noise on hearing. In: Murray J. ed. Noise and man. 2nd ed. London: Clowes W and Son. 1973.

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

Cortopassi GA, Arnheim M. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6927-6933.

Corral-Debrinski M, Sapien G, Shoffner JM, et al. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. *JAMA* 1991; 266:1812-1816.

Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res* 1996; 93:181-187.

Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondria mutation associated with nonsyndromic deafness. *Am J Otolaryngol* 1995;16(6):403-408.

Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{LEU}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. *Nature* 1990;348:651-653.

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

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

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

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

- Li H-S, Borg E. Auditory degeneration after acoustic trauma in two genotypes of mice. *Hear Res* 1993;68:19-27.
- Li H-S, Hulcrantz M, Borg E. Influence of age on noise induced permanent TSs in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Audiology* 1993:195-204.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, et al. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease. *Lancet* 1985;1(8639):642-645.
- Miyabayashi S, Hanamizu H, Endo H, et al. A new type of mitochondria DNA deletion in patients with encephalomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 1991;14:805-812.
- Odawara M, Sasaki K, Tachi Y, Yamashita K. Selection of primers for detection of A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial gene. *Diabetologia* 1995;38:377.
- Oshima T, Ueda N, Ikeda K, Abe K, Takasaka T. Bilateral sensorineural hearing loss associated with the point mutation in mitochondrial genome. *Laryngoscope* 1996;106:43-48.
- Rearon W, Ross RJM, Sweeney MG. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* 1992;340:1376-1379.
- Remes AM, Majamaa K, Herva R, et al. Adult-onset diabetes mellitus and neurosensory hearing loss in maternal relatives of MELAS patients in a family with the tRNA^{LEU}(UUR) mutation. *Neurology* 1993;43:1015-1020.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, et al. Mitochondrial complex I deficiency in parkinson's disease. *Lancet* 1989;1(8649):1269.
- Schindler DN, Jackler RK, Robinson ST. Hearing loss. pp 123-138 In: Ladou J, eds: Occupational and environmental medicine, 2nd edition, Appleton and Lange, 1997.
- Seidman MD, Bai U, Khan MJ, Murphy MP, Quirk WS, Castora FJ, Hinojosa R. Association of mitochondria DNA deletions and cochlear pathology: A molecular biologic tool. *Laryngoscope* 1996;106:777-783.
- Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Human Genet* 1992;51:1179-1186.
- Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Hagiwara H, Abe K, Nishizawa M. Mitochondrial DNA mutation at nucleotide 1555 in a patient with bilateral sensorineural hearing loss of unknown etiology. *Acta otolaryngol* 1996;116: 796-798.
- Taylor W, Pearson J, Mair A. Study of noise and hearing in jute weaving. *J Acoust Soc Am* 1965;38:113-120.
- Thalmann I, Matshinsky FM, Thalmann R. Quantitative study of selected enzymes involved in energy metabolism of the cochlear duct. *Ann Otol* 1970;79:12-7.
- Thomas AW, Morgan R, Majid A, Rees A, Alcolado JC. Detection of mitochondrial DNA mutations in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1995;38:376-379.
- Ueda N, Oshima T, Ikeda K, Abe K, Aoki M, Takasaka T. Mitochondrial DNA deletion is a predisposing cause for sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1998;108:580-584.
- Wallace DC. Disease for the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992;61:1175-1212.