

· 临床研究 ·

广州地区非综合征性耳聋患者耳聋相关基因突变分析

贾蓓¹, 李琦², 宋兰林¹, 刘思平¹, 钟梅^{1△}

(南方医科大学南方医院: 1. 妇产科产前诊断与遗传病诊断技术中心; 2. 耳鼻喉科, 广州 510515)

摘要:目的 分析广州地区非综合征性耳聋患者相关耳聋基因突变, 初步了解广州地区耳聋患者发病的分子机制。方法 详细询问病史和临床检查后, 收集广州地区 52 例非综合征性耳聋患者的外周血, 提取基因组 DNA, 用遗传性耳聋基因芯片对 4 个常见耳聋相关基因(GJB2、SLC26A4、线粒体 12S rRNA 及 GJB3 基因)的 9 个位点进行检测。结果 52 例耳聋患者中共检出 18 例带有耳聋基因突变, 检出阳性率为 34.6%, 其中 GJB2 基因 235delC 纯合突变 6 例, 杂合突变 2 例, 299delAT 纯合突变 1 例; SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 纯合突变 4 例, 杂合突变 1 例; 线粒体 12S rRNA A1555G 均质突变 4 例。结论 广州地区非综合征性耳聋患者的耳聋相关基因检出阳性率、GJB2 基因及 SLC26A4 基因的携带率均低于全国平均水平, 而线粒体基因突变的携带率明显高于全国平均水平。

关键词:非综合征性耳聋; 基因; 突变; 芯片

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)12-1186-03

Analysis of deafness-related gene mutations in nonsyndromic hearing loss patients in Guangzhou

Jia Bei¹, Li Qi², Song Lanlin¹, Liu Siping¹, Zhong Mei^{1△}

(1. Technology Center of Prenatal Diagnosis and Genetic Diseases Diagnosis, Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Otorhinolaryngology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To identify the deafness-related gene mutations in patients with nonsyndromic hearing loss (NSHL) in Guangzhou, and to explore the molecular pathogenic mechanism. **Methods** Genomic DNA samples of 52 deafness patients in Guangzhou were extracted from peripheral blood. Nine mutations of four genes (GJB2, SLC26A4, mitochondrial 12S rRNA, and GJB3) were detected by gene chip technique. **Results** Among 52 patients with nonsyndromic hearing loss, 18 cases were found out to carry at least one pathogenic gene mutation. The positive detection rate was 34.6%. In these patients, 9 cases have GJB2 mutations (235delC homozygous mutation in 6 cases, 235delC heterozygous mutation in 2 cases, and 299delAT homozygous mutation in 1 case), 5 cases have SLC26A4 gene mutations (IVS7-2A>G homozygous mutation in 4 cases and IVS7-2A>G heterozygous mutation in 1 case), and 4 cases have mitochondrial 12S rRNA A1555G mutations. **Conclusion** Incidence of GJB2 and SLC26A4 gene mutations in NSHL population in Guangzhou is below the average of the overall Chinese deaf population. The incidence of mtDNA A1555G is higher than the average of the overall Chinese deaf population.

Key words: nonsyndromic hearing loss; gene; mutation; chip

耳聋是严重影响人类健康和生活的疾病, 在新生儿中的发生率达 1%~3%^[1]。2006 年全国残疾人抽样调查结果显示我国现有听力残疾者在 2 780 万人, 每年新生聋儿 3 万, 居各类残疾之首^[2]。耳聋可分为遗传性和非遗传性, 60% 以上的新生聋儿是由遗传因素导致的^[3-4]。遗传性耳聋具有广泛的遗传异质性, 根据是否伴有耳外组织的异常或病变可将其分为综合征性耳聋 (syndromic hearing loss, SHL) 和非综合征性耳聋 (nonsyndromic hearing loss, NSHL)^[5]。NSHL 占 70% 以上, 目前已定位了 100 多个 NSHL 相关位点, 克隆了 68 个致病基因, 包括 40 个常染色体隐性基因、25 个常染色体显性基因、3 个 X 连锁基因, 每个基因中均散在多个耳聋突变位点。

不同种族不同地区的人群, 耳聋基因突变热点有明显的差异。在欧美人群中, 50% 的 NSHL 由 GJB2 基因突变导致; 其次是 SLC26A4 基因, 5%~10% 的 NSHL 与它有关; 另外 MYO15A、OTOF、CDH23 和 TMC1 也是常见的耳聋致病基因^[6]。而在中国人群中, 聋病分子流行病学调查显示 GJB2、SLC26A4、线粒体基因 (A1555G 和 C1494T 突变) 是中国 NSHL 患者最常见的 3 个致病基因, 且南北各地区间各基因检

出率差异较大^[7-8]。为了了解广州地区 NSHL 患者发病的分子机制, 探讨耳聋临床表型与基因型之间的关系, 本文应用遗传性耳聋基因芯片对广州地区的 NSHL 患者进行了常见耳聋相关基因的突变筛查。

1 资料与方法

1.1 一般资料 受检的耳聋患者均来自广州市及周边县市, 共 52 例, 全部为汉族, 男 32 例, 女 20 例, 就诊年龄 2~42 岁, 平均 (18.2±3.5) 岁。详细了解病史及耳聋相关信息, 如耳聋发病年龄、诱因、用耳毒性药物史, 头部外伤史、家族史等, 进行全身、专科及影像学检查。结合病史排除其他症状和体征, 52 例患者均被诊断为 NSHL。根据纯音测听结果, 52 例均为双侧感音神经性耳聋, 46 例重度以上耳聋 (70 dB 以上), 6 例中度耳聋 (41~70 dB)。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂及仪器 小量基因组 DNA 抽提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。晶芯九项遗传性耳聋基因检测试剂盒 (微阵列芯片法), PCR 仪 (ABI 9700), 芯片杂交仪 (Bio Mixer II), 芯片洗干仪 (SlideWasher TM8), 芯片扫描仪 (Lux-

△ 通讯作者, Email: zhongmei@fimmu.com。

Scan 10K-B)购自博奥生物技术有限公司。

1.2.2 DNA 提取 患者或家属签署知情同意后,采集受检者外周血 2 mL,用小量基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA,并进行浓度及纯度检测,满足浓度 100 ~ 200 ng/ μ L,纯度 OD_{260/280} = 1.7 ~ 2.0。

1.2.3 耳聋基因芯片检测 应用遗传性耳聋基因芯片检测试剂盒对 GJB2、SLC26A4、mtDNA12s rRNA 和 GJB3 四个耳聋相关基因的 9 个致聋突变位点进行检测。这 9 个位点为: GJB2 基因的 35delG,176del16,235delC,299delAT; SLC26A4 基因的 2168A>G,IVS7-2A>G;线粒体 12S rRNA 的 1494C>T,1555A>G;GJB3 基因的 538C>T。检测过程主要分 3 个步骤:多重不对称等位基因特异性 PCR,扩增产物跟芯片杂交,芯片结果的扫描和判读。具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.4 统计学处理 收集资料后,数据分析采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

52 例耳聋患者中,语前聋 24 例(其中先天性耳聋 20 例);语后聋 20 例,平均发病年龄(4.02 \pm 1.35)岁;耳聋发病年龄不详者 8 例。聋前有明确耳毒性药物应用史者 18 例,其中语前聋 8 例,语后聋 10 例,用药年龄主要集中在婴幼儿期,用药原因多为感冒、发烧和腹泻,以应用氨基糖甙类及水杨酸类药物

多见。有 8 名患者有明确的家族史,其中 2 名男性患儿是同胞兄弟为线粒体母系遗传,其余 6 名患者来自不同的家系均为隐性遗传。有 5 名患者颞骨 CT 显示前庭导水管扩张。

应用基因芯片方法在 52 例耳聋患者中共检出 18 例带有耳聋基因突变,检出阳性率为 34.6%,见表 1。其中,检出 GJB2 基因突变 9 例,包括 235delC 纯合突变 6 例,杂合突变 2 例,299delAT 纯合突变 1 例;SLC26A4 基因突变 5 例,IVS7-2A>G 纯合突变 4 例,杂合突变 1 例;线粒体 12S rRNA A1555G 均质突变 4 例。44 名散发病例中检出 13 例(29.5%)携带突变,8 名有家族史的患者检出 5 例携带突变(62.5%),见表 2。

表 1 广州地区 52 例 NHSL 患者耳聋基因突变检出结果

突变基因	突变类型	检出例数(n)	检出阳性率(%)
GJB2	235delC 纯合	6	11.5
	235delC 杂合	2	3.8
	299delAT 纯合	1	1.9
SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合	4	7.7
	IVS7-2A>G 杂合	1	1.9
12S rRNA A1555G	A1555G 均质	4	7.7

表 2 18 例携带耳聋基因突变患者基因型及表型的关系

编号	发病时间	诱因	程度	家族性	突变基因	基因型
1	学语前	无	深度	散发	GJB2	235delC 纯合
2	学语前	无	深度	隐性遗传	GJB2	235delC 纯合
3	学语前	用药	深度	散发	GJB2	235delC 纯合
4	学语前	无	深度	散发	GJB2	235delC 纯合
5	学语前	无	深度	隐性遗传	GJB2	235delC 纯合
6	学语前	无	深度	散发	GJB2	235delC 纯合
7	学语后	用药	深度	散发	GJB2	235delC 杂合
8	学语后	无	重度	散发	GJB2	235delC 杂合
9	学语前	无	深度	散发	GJB2	299delAT 纯合
10	学语后	感冒	重度	散发	SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合
11	学语前	无	重度	散发	SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合
12	学语后	跳水	中度	散发	SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合
13	学语前	无	深度	隐性遗传	SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合
14	学语前	无	深度	散发	SLC26A4	IVS7-2A>G 杂合
15*	学语后	用药	重度	母系遗传	线粒体 12S rRNA	A1555G 均质
16*	学语后	用药	中度	母系遗传	线粒体 12S rRNA	A1555G 均质
17	学语前	用药	深度	散发	线粒体 12S rRNA	A1555G 均质
18	学语后	用药	重度	散发	线粒体 12S rRNA	A1555G 均质

*:15 和 16 来自同一家系,是同胞兄弟。

24 例学语前聋患者中检出 11 例带有耳聋基因突变(45.8%),20 例学语后聋患者检出 7 例(35.0%),两组比较 $\chi^2=0.530, P=0.467$ (双侧),差异无统计学意义,认为学语前聋与学语后聋耳聋基因突变的检出率无差异。

18 例带有耳聋基因突变的患者中,携带 GJB2 基因突变语前聋患者 7 例(77.8%),携带 SLC26A4 基因突变语前聋患者 3 例(60.0%),携带线粒体 12S rRNA 基因突变语前聋患者 1 例(25.0%),3 组比较 $\chi^2=3.293, P=0.193$ (双侧),差异无统计学意义,认为 3 组中语前聋患者的比例无差异。

5 名前庭导水管扩张患者均检出携带 SLC26A4 基因突

变。4 名线粒体 12S rRNA A1555G 均质突变患者均是应用氨基糖甙类药物后致聋。

3 讨 论

耳聋的相关基因众多,遗传异质性强,但大多数耳聋患者是由少数几个基因突变导致的,这为临床开展耳聋基因诊断及产前诊断提供了检测目标基因。郑文波等^[9]、Dai 等^[10-12]、刘新等^[13]在国内进行了大规模聋病分子流行病学研究,调查结果显示 GJB2、SLC26A4、线粒体基因是中国人遗传性耳聋最常见的 3 个致病基因,21%的聋人带有 GJB2 基因突变、14.5%的聋人带有 SLC26A4 基因突变、3.4%和 0.6%的聋人分别带

有线粒体 DNA A1555G 和 C1494T 突变。在王国建等^[14]的研究中,根据流行病学结果开发的芯片能检出 42.41% NSHL 患者。在本研究中,应用基因芯片方法对广州地区的 NSHL 患者的检出阳性率为 34.6%,17.3% 的耳聋患者携带 GJB2 基因突变,9.6% 的患者携带 SLC26A4 基因突变,7.7% 的患者携带线粒体 12S rRNA A1555G 突变;检出阳性率、GJB2 基因及 SLC26A4 基因的携带率均低于全国平均水平,而线粒体基因突变的携带率明显高于全国平均水平。这些差异的原因可能是:(1)中国人基因在地域上存在差异性。中国地域广大,人口、民族众多,人种来源复杂,人群遗传背景在各地存在差异。在 Dai 的研究中,研究对象 65% 以上为北方人群,南方人群局限在几个省市,在反映全国聋病分子流行病学趋势上倾向于北方人群。(2)基因芯片相对于传统酶切及测序等方法的检出率稍低(42.41%,44.30%),可能漏诊了基因其他位点突变的患者。(3)此次调查研究样本量不够大,存在抽样误差。

GJB2 基因突变是导致 NSHL 最常见的原因,中国人群中语前聋患者 26%~33% 由 GJB2 突变所致^[9],广州地区 29.2%(7/24)的语前聋患儿由 GJB2 异常引起,最常见的致病位点是 235delC,与国内外报道相同。本研究组中 GJB2 突变的 NSHL 患者,耳蜗神经和听觉中枢完整,如果接受人工耳蜗植入听力语言康复的效果将会较好,GJB2 突变筛查是人工耳蜗植入术前一项重要的疗效预判检查^[15]。

SLC26A4 基因突变将导致大前庭导水管扩张综合征(enlarged vestibular aqueduct syndrome, EVAS)及 Pendred 综合征。我国约 97% 的 EVAS 患者能够检出 SLC26A4 基因突变,主要突变是 IVS7-2A>G。本研究中,5 例前庭导水管扩张患者均检出携带 SLC26A4 基因突变,4 例 IVS7-2A>G 纯合突变,1 例杂合突变。虽然有 30% 携带 SLC26A4 单条等位基因突变的患者会表现为前庭导水管扩张^[11],但杂合突变患者还应进一步检测 SLC26A4 基因其他位点,以明确基因型。前庭导水管扩张的患者,内耳环境脆弱,任何引起颅内压变化的因素如头部外伤、感冒发热等就能引起 EVAS 患儿听力下降。本研究中 2 例 EVAS 患者出生时听力正常,在感冒、头部震荡后出现听力下降,听力下降为波动性,总的趋势是越来越差。如果我们能在儿童早期进行 SLC26A4 基因筛查,不仅能明确病因,还可以提醒家长注意日常防护,保护残余听力,延缓患儿听力下降的速度。

线粒体 mtDNA A1555G 突变导致的耳聋主要与氨基糖甙类药物使用有关。突变携带者对氨基糖甙类药物很敏感,低剂量使用就会出现耳鸣,甚至致聋^[16]。广州地区 NSHL 患者中的线粒体 12S rRNA A1555G 检出率(7.7%)明显超过全国平均水平(3.4%),表明在广州地区应该对线粒体 mtDNA 突变给予更多的重视。本研究中 4 例患者均是在应用氨基糖甙类药物后致聋,其中 2 例还是同胞兄弟,这提示在应用耳毒性药物治疗儿童疾病前,要注意了解患儿耳聋的家族史,有条件时应进行线粒体 12S rRNA A1555G 及 C1494T 位点筛查,避免一针致聋,全家多人因药致聋的惨剧发生。

通过分析广州地区 NSHL 患者相关耳聋基因突变,初步了解了广州地区耳聋患者发病的分子机制,在一定程度上丰富了中国人耳聋基因突变频率和分布图谱。深入了解耳聋患者发病的遗传背景对在广州地区开展耳聋早期诊断、遗传咨询、及时干预和治疗至关重要。

参考文献:

[1] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a si-

lent revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20): 2151-2164.

- [2] 第二次残疾人抽样调查办公室. 全国第二次残疾人抽样调查主要数据手册[M]. 北京:北京华夏出版社,2007:2-38.
- [3] Van Camp G, Willems P, Smith R. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity [J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(4): 758-764.
- [4] Bitner-Glindzic M. Hereditary deafness and phenotyping in humans[J]. Br Med Bull, 2002, 63(4): 73-94.
- [5] Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment [J]. Ann N Y Acad Sci, 1991, 630(3): 16-31.
- [6] Hilgert N, Smith RJ, Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics[J]. Mutation Res, 2009, 681(213): 189-190.
- [7] 韩明昱,戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展[J]. 北京医学, 2011, 33(5): 419-421.
- [8] 戴朴,刘新,于飞,等. 18 个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究(I)—GJB2 235delC 和线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 1(4): 1-5.
- [9] 郑文波,罗建红,郇云,等. 中国人语前非综合征性耳聋患者 GJB2 基因的突变分析[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(10): 610-613.
- [10] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 Mutation Spectrum in 2063 Chinese Patients with Nonsyndromic Hearing Impairment[J]. J Transl Med, 2009, 14(1): 7-10.
- [11] Dai P, Li Q, Huang D, et al. SLC26A4 c. 919A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss [J]. Genet Med, 2008, 10(8): 586-592.
- [12] Dai P, Liu X, Han D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 194-199.
- [13] 刘新,戴朴,黄德亮,等. 线粒体 DNA A1555G 突变大规模筛查及其预防意义探讨[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(19): 1318-1322.
- [14] 王国建,戴朴,韩东一,等. 基因芯片技术在非综合征性耳聋快速基因诊断中的应用研究[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(1): 61-66.
- [15] 戴朴,韩东一,袁慧军,等. 基因诊断-耳科诊断领域的重大进步[J]. 中华耳科学杂志, 2005, 1(1): 62-64.
- [16] Li R, Xing G, Yan M, et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12SrRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss[J]. Am J Med Genet, 2004, 124(2): 113-117.

(收稿日期:2011-11-21 修回日期:2011-12-24)