

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.33.010

一个遗传性非综合征型耳聋家系的 GJB2 基因突变分析*

王义旺¹, 胡祥上², 全庆丽², 姜海鸥^{2△}

(1. 湖南医药学院附属医院/怀化市第一人民医院耳鼻喉科, 湖南怀化 418000;

2. 湖南医药学院医学遗传学教研室, 湖南怀化 418000)

[摘要] **目的** 对 1 个遗传性非综合征型耳聋家系的临床表型特征进行分析, 并选取 GJB2 基因进行突变检测。**方法** 详细询问病史和临床检查后, 提取患者及家系成员的外周血基因组 DNA, PCR 扩增 GJB2 基因的外显子及外显子和内含子的交界区域, 然后对扩增产物进行 DNA 测序和 BLAST 比对进行突变分析。**结果** 该家系所有患者为迟发性、渐进性、早期以高频听力下降为主的感觉神经性聋。GJB2 基因突变分析检测到 6 种单核苷酸多态, 其中 c. 79G>A(p. Val27Ile) 和 c. 341G>A(p. Glu114Gly) 为已知单核苷酸多态, 而位于 3'-UTR 的 g. 4159T>C, g. 5142G/T, g. 5227G/A, g. 5352T/C 突变为本研究新发现。**结论** 该家系未发现 GJB2 外显子致病性突变, 遗传性非综合征型耳聋存在明显的遗传异质性。

[关键词] 突变分析; 遗传性非综合征型耳聋; GJB2 基因**[中图分类号]** R76**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)33-4635-03

Mutational analysis of GJB2 gene in a Chinese family with nonsyndromic hearing loss*

Wang Yiwang¹, Hu Xiangshang², Quan Qingli², Jiang Haiou^{2△}

(1. Department of Otolaryngology, the Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine/First People's Hospital of Huaihua City, Huaihua, Hunan 418000, China; 2. Department of Medical Genetics, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the clinical and genetic features of a Chinese family with nonsyndromic hearing loss, and to find deafness-causing mutations in the GJB2 gene. **Methods** After a detailed history and clinical examination, genomic DNA was extracted from peripheral blood for the proband and their family members. Two exons of the GJB2 gene was amplified by polymerase chain reaction, and the PCR products were subjected to automatic DNA sequencing. Finally, the mutation analysis was performed by SeqMan software of DNASTAR to compare BLAST. **Results** All patients in this family had late-onset and progressive hearing loss and ultimately involved all frequencies. Six SNP polymorphisms were found in this pedigree, which were previously reported worldwide, c. 79G>A(p. Val27Ile), c. 341G>A(p. Glu114Gly), were also identified in this family. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) were firstly identified in the GJB2 3'-UTR, including g. 4159T>C, g. 5142G/T, g. 5227G/A, g. 5352T/C. Two SNPs. **Conclusion** Mutation in exons of GJB2 gene was excluded as a pathogenic cause for nonsyndromic hearing loss in this family.

[Key words] mutation; nonsyndromic hearing loss; GJB2 gene

耳聋是最常见的感觉障碍性疾病之一, 在新生儿中发病率约为 1/1 000。按表型特征不同, 遗传性耳聋可分为综合征型耳聋(syndromic hearing loss, SHL)和非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)^[1]。NSHL 可表现为多种遗传方式, 包括常染色体显性遗传, 常染色体隐性遗传, X 连锁遗传, Y 连锁遗传和线粒体遗传等。遗传性耳聋具有高度的遗传异质性。迄今为止, 共定位 NSHL 基因位点 136 个, 已克隆的致病基因有 60 余个, 其中导致遗传性 NSHL 的基因中, GJB2、SLC26A4、MYO15A、OTOF、CDH23 和 TMC1 等基因突变较为常见, 其中又以 GJB2 基因突变最为常见^[2], 在我国约 18.31% 的耳聋患者是由 GJB2 基因突变导致的^[3]。鉴此, 作者对 1 个遗传性 NSHL 家系成员的 GJB2 基因编码序列进行分析, 旨在寻找耳聋患者的致病基因突变。

1 资料与方法

1.1 一般资料 该家系 4 代共 14 人, 其中耳聋患者 4 例(图 1)。先证者(Ⅲ2), 男, 42 岁, 12 岁起双侧耳鸣并进行性听力减

退, 36 岁发展为全聋。纯音测听显示左耳听力为 85 分贝, 右耳听力为 80 分贝, 属于重度耳聋。除耳聋之外, 不伴其他器官系统的异常。该家系耳聋患者的起病年龄为 12~25 岁, 其他患者与先证者临床症状相似。临床表现为双侧耳鸣, 听力减退为双耳对称性、以高频听力下降为主的感觉神经性耳聋。耳部 CT 扫描、前庭功能及全身体格检查, 均未发现异常。

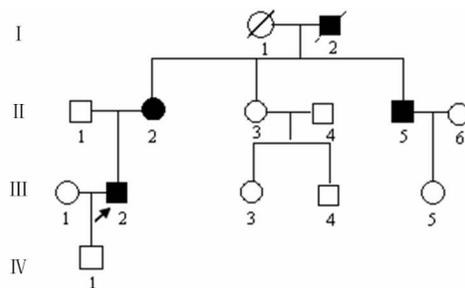


图 1 患者家系图

* 基金项目: 2012 年怀化市科技计划项目(2012-13-1)。 作者简介: 王义旺(1970—), 副主任医师, 主要从事耳鼻喉科临床和科研工作。

△ 通讯作者, E-mail: hhjiangh@126.com。

表 1 PCR 扩增 GJB2 基因的引物

外显子	正向 5'-3'	反向 5'-3'	产物大小(bp)
1	CGTAACTTCCAGTCTCCG	AAGGACGTGTGTTGGTCCAG	356
2-1	CCTGTTTTGGTGAGGTTGTG	ACCAATAACCCCTAACAGCC	1 124
2-2	AGGTGAAACTCCAGATGCC	CAGAATGGGGTCAGACACTC	1 416
2-3	CAGAGGGTCGTTGTGAGTATTG	AGCCAGTCCAGTGTCA	1 117

1.2 方法

1.2.1 DNA 制备 在获得知情同意之后,采集该家系 9 个成员的外周血样本,包括 3 例患者(Ⅱ 2、Ⅱ 5、Ⅲ 2)和 6 名健康人(Ⅱ 1、Ⅱ 3、Ⅱ 6、Ⅲ 1、Ⅲ 5、Ⅳ 1)。血液基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化公司(批号 DP318),按产品说明书介绍的方法提取基因组 DNA。DNA 浓度测定后稀释成为 25 ng/ μ L 工作液。

1.2.2 PCR 扩增 应用 Primer5 软件设计并合成 3 对引物(表 1),扩增区域覆盖 GJB2 基因的两个外显子及外显子与内含子交界区域。PCR 反应体系:总体积为 15 μ L,2 \times GC buffer 7.50 μ L(含 MgCl₂ 10 mmol/L),dNTP 混合液(10 mmol/L) 0.75 μ L,正反向引物(10 μ mol/L)各 0.75 μ L,模板基因组 DNA 0.03 μ g,rTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.80 μ L,双蒸水补至 15.00 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶,恒压 140 V 电泳 25 min,溴化乙锭/紫外线观察,以证实 PCR 扩增的片段。

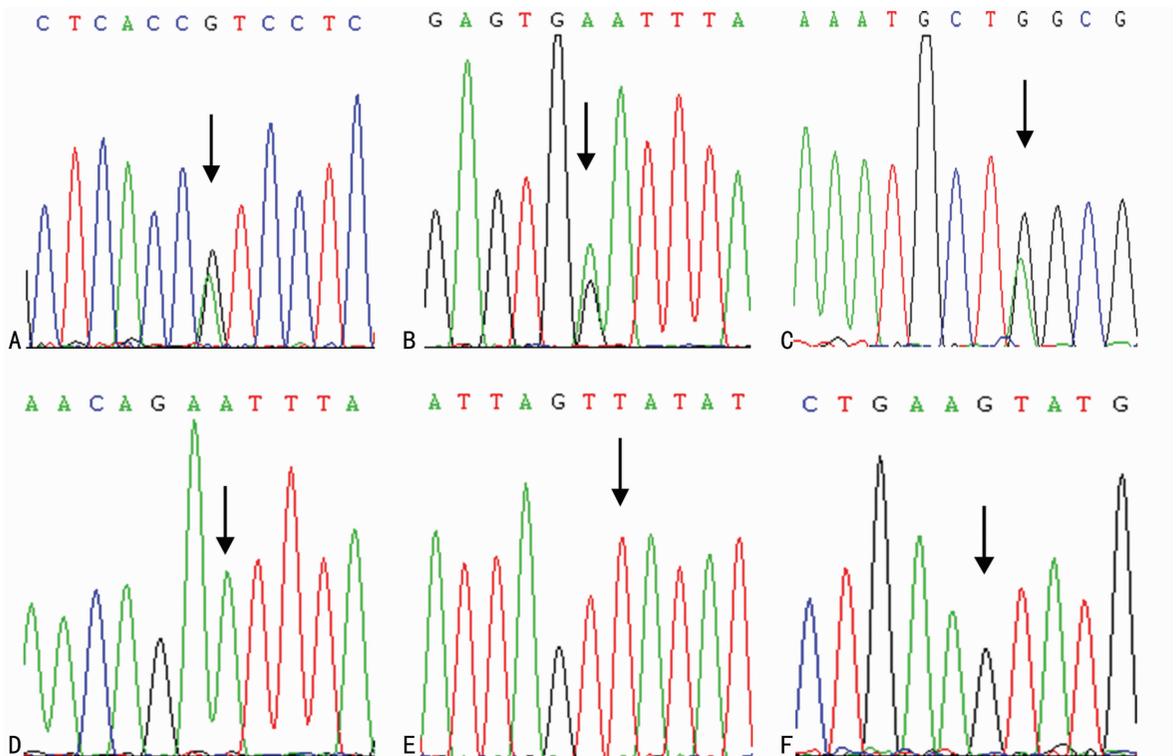
1.2.3 产物纯化、序列测定及分析 PCR 产物纯化(生工 SK1141)后送至上海生工生物工程技术有限公司,在

ABI3730 自动测序仪上应用相应的 PCR 引物进行双向直接序列测定,测序结果使用 DNASTar 软件进行分析。发现的序列变异在 NCBI 和 Hapmap 的多态数据库中进行查询,确定是否为单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism,SNP)。通过同时检测家系内所有患者及其健康同胞的相应序列,鉴定变异序列是否与疾病表型共分离。

2 结 果

该家系共有存活耳聋患者 3 例,从家系图分析,符合常染色体显性遗传;所有患者均为语后聋,为双耳对称性、进行性、高频听力下降为主的感觉神经性聋,随年龄增加耳聋程度逐步加重,最终进展为全频受累的重度感音神经性聋。患者出现听力下降的年龄,从 12~25 岁。Ⅱ 2,女,65 岁,16 岁出现听力下降,48 岁发展为全聋,目前左耳听力为 75 分贝,右耳听力为 80 分贝。Ⅱ 5,男,55 岁,25 岁出现听力下降,42 岁发展为全聋,目前左耳听力为 85 分贝,右耳听力为 84 分贝。

直接双向测序后,发现 GJB2 基因的 6 个变异序列(表 2、图 2),这些变异既存在于部分患者中,也在健康亲属中检测到,与疾病不存在共分离。本研究中发现的 GJB2 基因的核苷酸改变是 SNP。



A: g. 3473G>A (正向); B: g. 3735A>G (正向); C: g. 4159T>C (反向); D: g. 5142G/T (反向); E: g. 5227G/A (反向); F: g. 5352T/C (反向)。

图 2 GJB2 基因中检测到的核苷酸变异序列

表 2 GJB2 基因中检测到的变异序列

变异位置	变异碱基	氨基酸改变	参考序列号
Exon2	C. 79G>A 杂合	Val27Ile	rs72561723
Exon2	C. 341A>G 杂合	Glu114Gly	rs2274083
3'-UTR	g. 4159T>C 杂合	—	本研究新发现
3'-UTR	g. 5142G/T 纯合	—	本研究新发现
3'-UTR	g. 5227G/A 纯合	—	本研究新发现
3'-UTR	g. 5352T/C 纯合	—	本研究新发现

—:此项无数据。

3 讨 论

耳聋是导致交流障碍最常见的疾病,大多数发病都与遗传有关。遗传性耳聋患者中 70% 以上为 NSHL。耳聋具有高度的遗传异质性,相关基因众多,但在不同人群中 GJB2 基因突变均是导致 NSHL 的最主要致病基因^[4]。Mignon 等^[5]于 1996 年将人类 GJB2 定位于 13q11-q12,基因全长 5 510 bp,含两个外显子,而编码序列位于 exon2,长为 681 bp。GJB2 含有 226 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量约为 26×10^3 ,也称缝隙连接蛋白 26(connexin 26,Cx26)。Cx26 是一种跨膜蛋白,4 次跨膜,共分 5 个区:N 端区、跨膜区、细胞外区、胞浆内连接区和 C 端区。Cx26 蛋白以六聚体形式结合形成缝隙连接,形成耳蜗内钾离子运输通道,以维持耳蜗内较高水平电位^[6]。GJB2 基因突变可导致 Cx26 蛋白功能缺陷,减少钾离子再循环效率,进而导致听力损害^[7]。目前发现,GJB2 至少有 111 种突变可以引起 NSHL,其中显性突变 9 种,隐性突变 92 种,遗传模式不明突变 10 种。

本研究的 NSHL 家系中,所有患者均为语后聋,为双耳对称性、进行性、高频听力下降为主的感觉神经性聋,不伴其他器官系统的异常。根据其临床特征和遗传方式,作者认为该家系属于常染色体显性遗传的非综合征型耳聋。进一步用分子遗传学方法尝试了 GJB2 基因的突变筛查,寻找患者特有的突变。检测到的 6 个变异序列既存在于患者中,也出现在患者的健康亲属中,未发现与疾病表型共分离的变异。其中 c. 79G>A(p. Val27Ile)和 c. 341G>A(p. Glu114Gly)为已报道的核苷酸多态,而位于 3'-UTR 的 g. 4159T>C、g. 5142G/T、g. 5227G/A、g. 5352T/C 突变为本研究国内外首次报道。尽管本研究在 GJB2 基因的编码区发现了 2 个杂合突变 79G>A(p. Val27Ile)和 341G>A(p. Glu114Gly),但在该家系患者和健康人中均存在这些突变,因此,作者认为它们更可能是该基因的 SNP,这与大多数研究者认为杂合突变 79G>A 和 341G>A 是 GJB2 基因的多态相一致的^[8-10]。所以,作者初步排除了 GJB2 为本研究 NSHL 家系的致病基因,说明遗传性非综合征型耳聋存在明显的遗传异质性。

参考文献

[1] Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, et al. Genomic duplication

and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(2): 101-109.

[2] Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(1): 90-94.

[3] Xiao ZA, Xie DH. GJB2(Cx26) gene mutations in Chinese patients with congenital sensorineural deafness and a report of one novel mutation [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2004, 117(20): 1797-1801.

[4] Kim HJ, Park CH, Kim HJ, et al. Sequence variations and haplotypes of the GJB2 gene revealed by resequencing of 192 chromosomes from the general population in Korea [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2010, 3(1): 65-69.

[5] Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, et al. Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 72(2/3): 185-186.

[6] Su CC, Li SY, Su MC, et al. Mutation R184Q of connexin 26 in hearing loss patients has a dominant-negative effect on connexin 26 and connexin 30 [J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(12): 1061-1064.

[7] Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations as a cause of the KID syndrome with hearing loss [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(1): 25-30.

[8] Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNBI) hearing loss [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4): 792-799.

[9] Abe S, Usami S, Shinkawa S, et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese [J]. *J Med Genet*, 2000, 37(1): 41-43.

[10] 肖自安, 冯永, 潘乾. 非综合征性耳聋患者连接蛋白 26 基因突变的研究 [J]. *中华耳鼻咽喉科学杂志*, 2000, 35(3): 188-191.

(收稿日期:2015-08-02 修回日期:2015-09-26)