

## 广西新生儿遗传性非综合征型耳聋基因筛查

阙婷,李旺,耿国兴,俸诗瀚,玉晋武,罗超,林彩娟

(广西壮族自治区妇幼保健院遗传代谢中心实验室,南宁 530012)

**[摘要]** **目的** 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术检测广西新生儿遗传性非综合征型耳聋(NSHI)基因突变基因,探讨耳聋基因筛查在临床中应用的有效性和可行性。**方法** 对7100例出生的新生儿采用自动判别听性脑干诱发电位(AABR)进行听力初筛和复筛,并通过足跟血斑提取基因组DNA,采用MALDI-TOF-MS进行4个耳聋易感基因20个突变位点检测。**结果** 7100例新生儿听力初筛通过率为97.11%(6895/7100),新生儿基因突变阳性率为3.54%(251/7100),其中GJB2基因突变131例,携带率为1.84%,235delC杂合突变108例。SLC26A4基因突变93例,以1229C>T杂合突变和IVS7-2A>G杂合突变为,mtDNA12SRNA基因突变16例,GJB3基因突变11例。**结论** 采用MALDI-TOF-MS技术筛查可提高常见耳聋相关基因热点突变检出率,从分子水平发现新生儿遗传性NSHI,可为早期发现、预测耳聋的发生及制订干预措施提供相应的遗传咨询指导。

**[关键词]** 新生儿筛查;非综合征型耳聋;易感基因;飞行时间质谱

**[中图分类号]** R446.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)07-0926-03

## Gene screening of neonatal non-syndromic hereditary hearing loss in Guangxi

Que Ting, Li Wang, Geng Guoxing, Feng Shihan, Yu Jinwu, Luo Chao, Lin Caijuan

(Genetic Metabolic Central Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital of Guangxi

Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530012, China)

**[Abstract]** **Objective** To use the matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) technique for detecting the mutation gene of neonatal non-syndromic hereditary hearing impairment gene in Guangxi and to investigate its effectiveness and feasibility in clinical application. **Methods** A total of 7100 newborns were performed the hearing preliminary screening and secondary screening by adopting AABR. The genomic DNA was extracted by the heel blood spot. Twenty mutation characteristics of 4 deaf predisposing genes were detected by MALDI-TOF-MS. **Results** The pass rate of hearing screening in 7100 newborns was 97.11% (6895/7100), the positive rate of neonatal gene mutation was 3.54% (251/7100), in which the GJB2 gene mutation was in 131 cases, the carrying rate was 1.84%, 235delC heterozygous mutation was in 108 cases. SLC26A4 gene mutation was in 93 cases, which dominated by 1229C>T heterozygous mutation and IVS7-2A>G heterozygous mutation, mtDNA12SRNA gene mutation was in 16 cases and GJB3 gene mutation was in 11 cases. **Conclusion** Adopting the MALDI-TOF-MS screening technique can increase the detection rate of hot point mutation in common deaf related genes and discover neonatal genetic NSHI from molecular level and provides the corresponding genetic consulting guidance for early finding and predicting deaf occurrence, and formulating the interventional measures.

**[Key words]** neonatal screening; nonsyndromic hearing loss; susceptibility gene; time of flight mass spectrometry

新生儿在出生期或出生时易因生理机能退化、感染、外伤、药物使用不当及遗传方面的病因情况导致耳聋。据报道大约60%的耳聋和遗传因素有关<sup>[1]</sup>。先天性耳聋是引起言语交流障碍的常见疾病之一,有研究报道新生儿发病率约为1%~3%<sup>[2]</sup>。遗传性耳聋分为非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHI)和综合征型耳聋(syndromic hearing loss, SHI),约70%为NSHI。流行病学调查表明中国耳聋人群常见致病突变有GJB2、SLC26A4、线粒体12SrRNA、GJB3基因突变<sup>[3]</sup>。而常见的4个易感基因突变位点因不同地域、不同民族存在遗传的差异性。近年来,关于遗传性耳聋分子遗传学研究报道有不少,基因芯片目前是临床常用的检测方法,但由于只针对常见的4个基因(GJB2、GJB3、SLC26A4和线粒体DNA12SrRNA)9个突变位点,检测位点限定、检出率低、容易造成漏检。广西是一个少数民族群居的区域,因其所处的地域和民族差异,耳聋具有高度的异质性。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption-ionization time

of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是广泛应用新生儿筛查耳聋的技术手段,它具有通量高、成本低、位点覆盖全面、时效期短、准确率高的优势,同时结合临床遗传咨询,可有效进行分子诊断研究。本研究采用MALDI-TOF-MS技术检测大规模筛查方法,对7100例新生儿进行4个耳聋易感基因20个突变位点检测,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择2014年11月至2015年12月在广西壮族自治区妇幼保健院出生的7100例新生儿进行听力筛查,其中男5400例,女1700例。本研究获得医院伦理委员会批准,家长均被详细讲解和告知听力和基因筛查的相关知识,并签订知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 听力筛查方法** 新生儿听力初筛和复筛采用畸变产物耳声发射技术(DPOAE)自动判别听性脑干诱发电位(AABR)。初筛于出生后5~5d进行,在新生儿双侧外耳道清

理后进行,测试时 f1、f2 强度分别为 65、55 dB HL,测试 4 个频率(2~5 kHz),信噪比大于 7 dB HL,以 4 个频率中 3 个以上通过为筛查通过标准。若复筛未通过,生后 3 个月时进行听力学评估和医学诊断。

**1.2.2 DNA 提取** 在知情同意的情况下,用滤纸采集卡采集受检新生儿手指末梢循环血共 5 个血斑(约 250  $\mu$ L),应用厦门致善试剂磁珠提取微量 DNA,利用 ND-2000-UV-VIS 波长紫外/可见光扫描分光光度计(美国 NanoDrop 公司)对标本的基因组 DNA 的提取质量和浓度进行检测,并将 DNA 浓度调节至 10 ng/ $\mu$ L。DNA 样品的吸光度(A)比值 A260 nm/A280 nm 应为 1.6~2.0,A260 nm/A280 nm 需大于或等于 2.0,浓度需大于或等于 10 ng/ $\mu$ L。

**1.2.3 主要仪器和试剂** 德国 Biometra 扩增仪、美国 Sequenom 公司的 Mass Array DNA 质谱阵列基因分析系统、Mass Array 微量点样系统以及试剂盒。

**1.2.4 筛查耳聋基因突变类型** 该检测方法是针对 4 个耳聋基因 20 个突变位点而设计的。含 GJB2 基因的 35delG、167delT、176-191del16、235delC、299-300delAT 突变;GJB3 基因的 538C>T、547G>A 突变;SLC26A4(PDS)基因的 281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、1975G>C、2027T>A、2162C>T、2168A>G、IVS7-2A>G、IVS15+5G>A 突变,以及含 mtDNA12SRNA 基因的 1494C>T、1555A>G 突变。

**2 结 果**

**2.1 听力筛查结果** 7 100 例新生儿中,6 895 例通过听力初筛,初筛通过率为 97.11%;205 例(2.89%)未通过初筛的新生儿均进行复筛,复筛 24 例(11.71%)未通过。

**2.2 聋病易感基因致病突变位点的检测结果** 7 100 例新生儿耳聋基因筛查中,检出耳聋易感基因阳性 251 例,携带率 3.54%,见表 1。

**表 1 7 100 例新生儿耳聋基因检测各位点突变携带率**

易感基因	突变位点	n	携带率(%)
GJB2	176_191del16 杂合突变	6	0.08
	235delC 纯合突变	2	0.03
	235delC 杂合突变	108	1.52
	299_300delAT 纯合突变	4	0.05
	299_300delAT 杂合突变	11	0.15
GJB3	538C>T 杂合突变	6	0.08
	547G>A 杂合突变	5	0.07
SLC26A4	281C>T 杂合突变	3	0.04
	1174A>T 杂合突变	3	0.04
	1229C>T 杂合突变	42	0.59
	1975G>C 杂合突变	6	0.08
	2027T>A 杂合突变	3	0.04
	2168A>G 杂合突变	5	0.07
	IVS7-2A>G 杂合突变	30	0.42
	IVS15+5G>A 杂合突变	1	0.01
mtDNA12SRNA	1555A>G 同质性突变	12	0.17
	1555A>G 异质性突变	4	0.05
合计		251	3.54

**3 讨 论**

耳聋是严重影响人类健康和致残的听力疾病,而先天性听力障碍是新生儿最常见的先天性缺陷。有文献报道,耳聋发病率高,筛查是早期发现和干预的关键。筛查是早期发现和干预的关键,然而这种筛查仍然有假阳性和假阴性的存在,如新生儿自

身原因(羊水残积、中耳功能丧失)、周边环境影响及技术人员业务水平和仪器设备<sup>[5-6]</sup>。为避免出现的假阳性所给予家长造成的困扰,应施行多级联合筛查,采用筛查耳聋易感基因,分析基因突变位点的差异性,结合遗传咨询并进行有效干预。

耳聋具有遗传异质性,多种不同表型与突变基因的基因型有关,且随着环境因素影响其易感性越强<sup>[7]</sup>。如病毒感染,早产、脑外伤、围产期前后感染等因素都有可能致耳聋疾病的发生。国内进行的耳聋病分子流行病学调查显示,在新生儿中发病率约为 1/1 000,约 50%的耳聋患者有遗传背景<sup>[8]</sup>。有研究发现,21%的耳聋患者带有 GJB2 基因突变、14.5%的患者带有 SLC26A4 基因突变、3.8%和 0.6%的患者分别带有线粒体 DNA A1555G 和 GJB3 突变。这一调查结果确定 GJB2、SLC26A4、线粒体基因、GJB3 是导致中国大部分遗传性耳聋发生的最常见的 4 个基因<sup>[9-10]</sup>。研究表明上述基因突变所致的 NSHI 在不同种族、不同地域存在很大的差异,包括不同的突变形式和突变频率,有很强的种族特异性<sup>[11]</sup>。

GJB2 基因编码缝隙连接蛋白 26(CX26)对耳蜗渗透压和听觉起着重要的作用。GJB2 基因突变影响循环通路和细胞信号传导,从而导致感音神经性耳聋的发生。有文献报道,中国耳聋人群中 13.0%~26.7%由 GJB2 突变导致,235delC 是 GJB2 最常见的突变<sup>[12]</sup>。本研究中 GJB2 基因是本地区 NSHI 相关基因的主要基因,235delC 等位基因的频率明显高于其他几个突变位点,表明 235delC 是该地区耳聋患者的热点突变,这与文献报道 235delC 为东亚地区主要突变一致<sup>[13]</sup>。

SLC234A4 基因也是导致神经性听力损失的主要责任基因,维持内耳淋巴液的离子转运与平衡,可导致大前庭水管综合征和 Pendred 综合征<sup>[14]</sup>。是儿童常见的内耳畸形疾病之一,临床表型常为迟发性和渐进性听力损失,疾病加重与感冒、头部外伤引起颅内压升高相关<sup>[15]</sup>。本研究 IVS7-2A>G 和 1229C>T 2 个突变位点为主要的突变位点,而日本和韩国 2168A>G 为 SLC26A4 最主要突变<sup>[16-17]</sup>。因此,在不同地区和种族中,SLC26A4 突变可能是导致神经性听力损失的主要责任基因,但突变位点可能不同。

mtDNA12SRNA 具有母系遗传、自我复制、转录和编码功能,可独立于细胞核染色体以外的基因团中<sup>[18]</sup>。因 mtDNA A1555G 突变引起感音神经性耳聋临床表型具有多样性,推测可能原因:由于线粒体 DNA 空间结构变化暴露氨基糖苷类药物的结合位点,以致对耳蜗毛细胞的生物化学和生理功能产生干扰,引起内耳细胞的可逆和不可逆性损伤<sup>[19]</sup>。本研究 1555A>G 突变率较低,与 Dai 等<sup>[13]</sup>报道的突变率相一致。建议对这种临床表型的患者家属进行有效的防聋宣教,预警禁用氨基糖苷类抗菌药物。

GJB3 为夏家辉院士发现的 NSHI 相关基因,同时还在高危人群的听力下降与基因的错义突变和无义突变有关。本研究检出 6 例 538C>T 杂合,突变率 0.08%,突变频率较小。其听力筛查结果正常,需要定期随访。

本研究参照曾云等<sup>[20]</sup>方法,应用 MALDI-TOF MS 技术筛查新生儿 NSHI 基因的优点:(1)检测位点数目高、覆盖全,包含了中国人群中高发位点;(2)通量高、时效短,一次检测只需 10 s,一台仪器每天通量 3 000 例;(3)MALDI-TOF MS 的检测方法与直接测序结果完全一致,检测数据自动分析,具有高度灵敏性和准确性;(4)适用于大规模筛查,扩增试剂及仪器平均成本较低;(5)进行区域热点突变的检测,可个性化增加新的位点检测需求。存在局限:对临床已明确的遗传性耳聋进行



大规模筛查, MALDI-TOF MS 暂时无法实现对未知突变基因、罕见基因、新基因的检测。

总之, MALDI-TOF MS 技术既能满足临床医生对耳聋基因的检测, 又可以针对不同地区和民族的热点突变谱及发生频率进行个体化筛查, 有效弥补传统新生儿听力筛查不足和提高遗传性耳聋基因携带及迟发性和药物性耳聋基因携带患儿的检出。为实现早发现、早诊断、早干预的临床措施提供遗传咨询指导, 以减少耳残疾的发生。

#### 参考文献

- [1] Faundes V, Pardo RA, Castillo Taucher S. Genetics of congenital deafness[J]. *Med Clin (Barc)*, 2012, 139(10): 446-451.
- [2] Downs MP. The identification of congenital deafness[J]. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 1971, 74(6): 1208-1214.
- [3] 韩明显, 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.
- [4] 许政敏, 沈晓明, 孙晓明, 等. 上海地区开展新生儿听力筛查工作回顾与展望[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2007, 15(4): 277-278.
- [5] 贺鹭, 曲成毅, 孙喜斌. 应用耳声发射技术对 48041 名新生儿进行听力筛查的汇总分析[J]. *中国听力语言康复科学杂志*, 2005(2): 21-23.
- [6] Stewart DL, Mehl A, Hall JW, et al. Universal newborn hearing screening with automated auditory brainstem response: a multisite investigation[J]. *J Perinatol*, 2000, 20(8 Pt 2): S128-S131.
- [7] 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, 3(1): 66-68.
- [8] 林晓江, 陈东野, 吴皓, 等. 一个常染色体显性非综合征耳聋大家系的临床特征及 79 个已知耳聋基因的检测分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 49(8): 654-658.
- [9] 王冰, 徐洁, 姚红兵, 等. 重庆市非综合征型耳聋患儿 GJB2 基因突变分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1028-1029, 1031.
- [10] 徐百成, 郭玉芬, 王秋菊. 常染色体隐性遗传非综合征性

耳聋基因研究进展[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(2): 140-145.

- [11] Tekin M, Xia XJ, Erdenetungalag R, et al. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf[J]. *Ann Hum Genet*, 2010, 74(2): 155-164.
- [12] Liu Y, Ke X, Qi Y, et al. Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population[J]. *J Hum Genet*, 2002, 47(12): 688-690.
- [13] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment[J]. *J Transl Med*, 2009, 7(1): 26.
- [14] Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, et al. Nonsyndromic hearing loss[J]. *Ear Hear*, 2003, 24(4): 275-288.
- [15] 辛渊, 迟放鲁. 大前庭水管综合征基因在大前庭水管综合征发病及诊断中的作用[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2009, 9(3): 196-197.
- [16] Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in East and South Asians: global implications for the epidemiology of deafness[J]. *J Med Genet*, 2003, 40(4): 242-248.
- [17] Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, et al. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese[J]. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11(12): 916-922.
- [18] 刘振, 虞幼军, 王跃建, 等. 佛山地区耳聋儿童 GJB235delC 突变和 mtDNA1555G 突变的研究[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(3): 227-290.
- [19] Abe S, Usami S, Shinkawa H, et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese[J]. *J Med Genet*, 2000, 37(1): 41-43.
- [20] 曾云, 姜丹, 冯大飞, 等. 飞行时间质谱检测技术在非综合征型耳聋基因检测中的应用[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(12): 985-990.

(收稿日期: 2016-07-25 修回日期: 2016-11-23)

(上接第 925 页)

- [8] Zhu SM, Liu YM, An ED, et al. Influence of systemic immune and cytokine responses during the acute phase of zoster on the development of postherpetic neuralgia[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(8): 625-630.
- [9] 黄永. 水痘-带状疱疹病毒免疫逃避机制的研究进展[J]. *国外医学(免疫学分册)*, 2005, 28(5): 305-308.
- [10] 高月, 季风清, 李彦平, 等. 带状疱疹急性期临床症状与皮损区病理性改变的相关性研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(1): 1-3, 6.
- [11] Van Koningsveld R, Schmitz PI, Meché FG, et al. Effect of methylprednisolone when added to standard treatment with intravenous immunoglobulin in Guillain-Barré syndrome: randomised trial[J]. *Lancet*, 2014, 383(9944): 191-196.
- [12] Marcinkiewicz J, Szymanowska Z, Mazurek A. Immunoreg-

latory mechanisms of action of intravenous gammaglobulin in Kawasaki syndrome[J]. *Przegl Lek*, 1998, 55(11): 611-613.

- [13] Sommer C, Schmidt C, George A, et al. A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 237(1): 45-48.
- [14] Üçeyler N, Valet M, Kafke W, et al. Local and systemic cytokine expression in patients with postherpetic neuralgia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105269.
- [15] Di Costanzo L, Ayala F, Megna M, et al. The risk of herpes zoster in the anti-TNF- $\alpha$  era: a case report and review of the literature[J]. *J Dermatol Case Rep*, 2013, 7(1): 1-4.

(收稿日期: 2016-09-05 修回日期: 2016-11-23)