

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.015

网络首发 [https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200312.1853.027.html\(2020-03-14\)](https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200312.1853.027.html(2020-03-14))

## 遗传性耳聋基因突变筛查及 Usher 家系致病位点分析\*

罗婧楠<sup>1</sup>, 谢天宏<sup>1</sup>, 丁丹<sup>1</sup>, 黄晗<sup>2</sup>, 李小英<sup>3</sup>, 王世飞<sup>1△</sup>

(1. 遵义医科大学附属医院耳鼻咽喉科, 贵州遵义 563099; 2. 河南省周口市中心医院耳鼻咽喉科 466000; 3. 四川大学华西第四医院耳鼻咽喉科, 成都 610041)

**[摘要]** **目的** 研究遗传性耳聋基因突变及 Usher 家系致病位点分析。**方法** 收集遵义市汇川区特殊教育学校 192 例耳聋学生详细询问病史并抽取静脉血, 提取 DNA 进行测序分析其基因突变位点。成功从 192 例患者中筛选出 1 例 Usher 综合征患者, 分析其家族史, 对其家族每位成员进行基因检测, 绘制遗传图并分析该家系患者的基因突变位点。**结果** 192 例聋哑学生中共检出 32 例基因突变阳性, 检出率为 16.67%, GJB2 基因突变 20 例 (10.41%), 其中 235 delC 纯合突变 13 例, 杂合突变 3 例, 299del AT 杂合突变 2 例, 176del16 纯合突变 1 例, 35 delG 纯合突变 1 例; SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 纯合突变 1 例, 杂合突变 1 例, 线粒体 12Sr RNA 1494C>T 突变 4 例及 1555A>G 突变 6 例, 未发现 GJB3 基因突变。通过对 USH-001 家系的调查研究, 发现 3 种碱基突变, 其中 4457G>A(R1486K) 涉及对氨基酸序列的改变。**结论** 遵义市汇川区特殊教育学校学生以 GJB2 基因 235del C 突变、线粒体 1555A>G 突变为主, 尚需进一步研究本地区的遗传性耳聋未知基因突变, 更好地开展防聋治聋工作。

**[关键词]** 耳聋基因; 遗传; Usher 综合征**[中图分类号]** R764.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1615-03

## Genetic mutation screening for hereditary deafness and analysis of pathogenic sites in a Usher family\*

LUO Qiangnan<sup>1</sup>, XIE Tianhong<sup>1</sup>, DING Dan<sup>1</sup>, HUANG Han<sup>2</sup>, LI Xiaoying<sup>3</sup>, WANG Shifei<sup>1△</sup>

(1. Department of Otolaryngology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563099, China; 2. Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan 466000, China; 3. Department of Otolaryngology, West China Fourth Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the mutation of hereditary deafness gene and to analyze pathogenic sites in a Usher family. **Methods** A total of 192 deaf students were collected from special education school in Hui-chuan of Zunyi. Detailed medical history was taken and venous blood was extracted. DNA was extracted and sequenced to analyze the gene mutation sites. A case of Usher syndrome was successfully screened out from 192 students and the family history was analyzed. The gene of each member in this family was detected. The genetic map was drawn and the gene mutation sites of the patients in the family were analyzed. **Results** Among the 192 deaf-mute students, 32 cases of gene mutation were positive, with the detection rate of 16.67%, 20 cases of GJB2 gene mutation (10.41%), including 13 cases of 235del C homozygous mutation, 3 cases of heterozygous mutation, 2 cases of heterozygous mutation, 2 cases of 299del AT heterozygous mutation, 1 case of 176del16 homozygous mutation, and 1 case of 35delG homozygous mutation, 1 cases of SLC26A4 gene IVS 7-2A > G homozygous mutation, 1 cases of heterozygous mutation, 4 cases of mitochondrial 12Sr RNA 1494C > T mutation and 6 cases of 1555A>G mutation, no GJB3 mutation was found. Three base mutations were found in the USH-001 family. Among them, 4457G>A (R1486K) involved the change of amino acid sequence. **Conclusion** The mutation of GJB2 gene 235del C and mitochondrial 1555A>G were the main mutations in the special education school in Huichuan of Zunyi. It is necessary to further study the unknown gene mutation detection of hereditary deafness in this area, so as to better carry out the prevention and treatment of deafness.

**[Key words]** deafness genes; heredity; Usher syndrome

\* 基金项目: 贵州省科技厅联合资助项目(黔科合字[2015]7497号)。 作者简介: 罗婧楠(1994-), 在读硕士研究生, 主要从事耳鼻咽喉科的研究。 △ 通信作者, E-mail: wsf5511@126.com。

耳聋是人类常见的遗传缺陷之一,其发病率约为 2%左右,且遗传因素导致的耳聋占 60%以上<sup>[1]</sup>。耳聋患者在全世界的发病率都呈现逐年递增趋势,据统计每 1 000 名新生儿中至少有 1 名耳聋患者。耳聋的分类可根据染色体分为:X-连锁、常染色体隐性、常染色体显性和线粒体等;根据其临床症状可分为综合征型、非综合征型耳聋。国内外研究表明,遗传性耳聋中非综合征性耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)占耳聋人群的 70%以上,不同种族、不同民族、不同地区遗传性耳聋的发病率及发病原因各不相同<sup>[2]</sup>。根据流行病学研究,GJB2、GJB3、SLC26A4 及 mtDNA12S rRNA 是我国常见的非综合征型耳聋基因。

Usher 综合征是目前临床上较常见的神经性耳聋的一种<sup>[3]</sup>,又称遗传性耳聋-视网膜色素变性综合征,是一种常染色体隐性遗传疾病。其临床特征主要为双侧感音性耳聋和色素性视网膜炎。可根据视觉损失程度、前庭功能以及听力下降程度分为 3 种临床亚型 USH1、USH2、USH3 型,其中以 USH2 型最为常见<sup>[4]</sup>。到目前为止被发现的与 USH 相关的基因有 CDH23、MYO7A、USH2A 等。

研究对致聋基因进行分析,以期提高对遗传性耳聋的认识,为本地深入开展遗传性耳聋遗传咨询及诊治、康复奠定基础,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

受检对象为 2016 年 3 月到 2017 年 9 月在遵义市汇川区特殊教育学校就读的 192 例耳聋学生。纳入标准:(1)感音神经性耳聋;(2)重度以上的听力缺陷,不能正常言语交流;(3)就读于汇川区特殊教育学校;(4)聋哑学生家长同意,全力配合本研究所有项目。排除标准:(1)正患或曾患中耳炎;(2)听力下降由颅脑损伤或者高热引起的;(3)不能配合该项目研究;(4)学生及家长拒绝配合本研究所有项目。本研究经过遵义医科大学附属医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

每例受检对象由护士使用一次性无菌针采血 5 mL, -80 °C 保存,检测时解冻使用 DNA 提取试剂盒(生工生物工程)提取 DNA,使用 Thermo ND-2000 测定 DNA 浓度与纯度,控制样本纯度  $A_{260/280}$  1.8~2.1,浓度 150 ng/ $\mu$ L 左右。

#### 1.2.2 耳聋基因芯片检测

将抽提的 DNA 取 50 ng 配置成 25  $\mu$ L 体系进行 PCR 扩增,反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,50~60 °C 下 30 s 复性后 72 °C 延伸 30 s,进行 30 个循环;终止反应后 72 °C 延伸 7 min,置于 4 °C 冰箱保存。使用耳聋基因芯片及相关的致聋基因测序(北京博奥生物有限公司)对本研究中 192 例患者的

耳聋基因突变进行筛查,主要包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 及 mtDNA12S rRNA 4 个常见耳聋基因的 9 个位点。

### 1.2.3 USH2A 基因突变检测及家系表征图绘制

对受检的 192 例聋哑学生详细询问其家族史,从中筛选出 1 例患者,诊断为 Usher 综合征,详细向家族成员解释本研究的意义后均签署知情同意书,抽取 4 mL 静脉血,用于提取基因组 DNA。PCR 反应后,送北京博奥生物有限公司进行测序,并根据家族史绘制其家系表征图。

## 2 结果

### 2.1 患者一般资料

年龄 7~22 岁,男 113 例,女 79 例;语前聋患者(发生耳聋时间在 3 岁以下)125 例(65.10%),语后聋患者(发生耳聋时间在 3 岁以后)66 例(34.38%);使用氨基糖苷类药物患者 58 例(30.21%)。

### 2.2 基因突变位点检出情况

对测序产物使用 Mutation Surveyor 进行比对分析,在 192 例患者中基因突变阳性 32 例(16.67%),见表 1。

表 1 耳聋基因突变位点检出情况

基因	突变位点	n	检出率(%)
GJB2	235 delC 纯合	13	6.77
	235 delC 杂合	3	1.56
	299 delAT 杂合突变	2	1.04
	176 del16 纯合突变	1	0.52
	35 delG 纯合突变	1	0.52
SLC26A4	IVS7-2A>G 纯合突变	1	0.52
	IVS7-2A>G 杂合突变	1	0.52
线粒体 12Sr RNA	12Sr RNA 1494C>T	4	2.08
	12Sr RNA 1555A>G	6	3.13
GJB3	538 C>T	0	0

### 2.3 遗传图谱绘制

根据家族史筛选出来确诊为 Usher 综合征的 1 例患者(记为 USH-001),经过详细向家族成员解释本研究的意义后询问每位成员病史,应用 Cyrillic 2.1 绘制出其家系遗传图谱。该家系现存 3 代 15 例,其中患病例数为 2 例,有 1 例患者在 4 岁时发生听力下降,且随着年龄增长听力下降没有明显的变化,为双侧对称性感音神经性耳聋,见图 1。

### 2.4 USH2A 基因突变检出情况

对该家系中的耳聋患者的基因突变情况进行了分析,共发现 3 种碱基发生改变,见表 2。这 3 种碱基突变中,能够改变氨基酸序列的是 c.4457G>A (R1486K),其余两种不对蛋白产生影响。

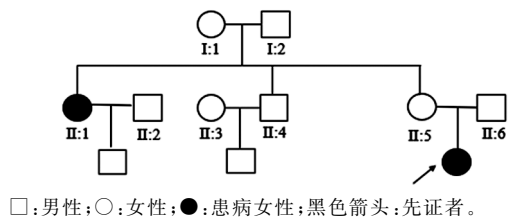


图 1 USH-001 家系谱系图

表 2 USH2A 基因突变检出情况

序号	突变位点	类型	作用
1	4457G>A(R1486K)	错义突变	改变氨基酸序列
2	879 T>G(L293L)	同义突变	不影响蛋白
3	504 A>G(T168T)	同义突变	不影响蛋白

### 3 讨 论

遗传性耳聋是临床上常见的缺陷性疾病,对人类的健康有较大的威胁,而遗传因素是其主要的致病因素。根据其临床症状可分为综合征型、非综合征型耳聋,在我国有 4 种主要的致病基因 GJB2、GJB3、SLC26A4 及 mtDNA12S rRNA,涉及 9 个突变位点<sup>[5]</sup>。GJB2 是主要的一个引起遗传性耳聋的突变基因,它的突变会产生异常的连接蛋白 Cx-26,从而影响细胞间隙连接,导致在内耳中的钾离子异常回收而致耳聋,GJB2 基因突变导致的听力损失多表现为先天性、双侧对称性、非进行性重度或极重度耳聋<sup>[6]</sup>。SLC26A4 基因主要编码蛋白质 Pendrin,与氯/碘、氯/碳酸氢根等的转运有关,它的异常表达会导致 Pendrin 综合征以及大前庭水管综合征。GJB3 是中国首个本土的耳聋基因,它的异常引起的临床表现为高频听力感音性耳聋主要为语后型。mtDNA12S rRNA 主要引起 DNA 空间结构的改变而致聋,其中线粒体 DNA 12S rRNA 1555A>G 异质性突变对临床表型影响最为关键<sup>[7-8]</sup>。线粒体导致的遗传方式为母系遗传,只有女性才能遗传给下一代,且子代中也只有女性可以遗传给下一代<sup>[9]</sup>。

Usher 综合征是一种常染色体隐性遗传疾病,又称遗传性耳聋-视网膜色素变性综合征。USH2 是最常见的一种在许多国家发生率高达 50% 以上,前庭功能是否正常是区分 USH1 与 USH2 的主要因素。USH1 患者在幼儿时期表现为运动发育迟缓,学习各项运动的能力都较其他幼儿晚;与 USH1 相比 USH2 的患者听力损失较轻,USH2 主要是 USH2A ~ USH2D 四型,各亚型根据发病时间、发病程度、耳聋程度等进行区分。其中 USH2A 最为常见,在 USH2A 中存在错义突变、确实突变等 30 多种基因突变类型。

通过对 192 例聋哑学生进行了详细的病史调查、突变基因检测并通过分析其病史筛选出 1 例确诊为 Usher 综合征对其家系进行了详细的研究,分析了该

家系中患者的突变基因位点。基因突变检测显示 192 例聋哑学生中共检出 32 例基因突变阳性,检出率为 16.67%,GJB2 基因基因突变 20 例(10.24%),其中 235 delC 纯合突变 13 例,杂合突变 3 例,299 delAT 杂合突变 2 例,176 del16 纯合突变 1 例,35 delG 纯合突变 1 例;SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 纯合突变 1 例,杂合突变 1 例,线粒体 12SrRNA 1494C>T 突变 4 例及 1555A>G 突变 6 例,未发现 GJB3 基因突变,与文献[10]相符。通过对 USH-001 家系的调查研究,发现 3 种碱基突变,其中 4457G>A(R1486K)涉及对氨基酸序列的改变,刘梦婷等<sup>[11]</sup>在 1 例 Usher 综合征家系中定位 MYO7A 基因的两个新突变,对 Usher 综合征的研究需更加深入,力求全面掌握其突变谱。张怡等<sup>[12]</sup>报道黑龙江某聋哑学校 103 例耳聋患者共发现突变携带者 47 例,检出率为 45.63%。张华等<sup>[13]</sup>采用飞行时间质谱检测河北省秦皇岛市聋哑学校耳聋患者基因突变 4 个基因的共 20 个位点,基因突变总的检出率为 50.00%;芦婷等<sup>[14]</sup>对 191 例感音神经性耳聋患者进行 4 种常见耳聋基因 15 个突变位点检测,基因突变检出率为 47.12%。可能与本研究耳聋基因检测位点少,血样采集、冻存及运输影响,未检测 SLC26A4 基因 H723R 突变位点,所用检测方法需改进等有关。然而此次研究中的标本量不够大,还不能够很好的揭示 USH 家系中患者的所有的突变位点。本组药物致聋比例较国内报道偏高,本课题组前期的耳聋调查中发现遵义市汇川区特殊教育学校有明确的氨基糖苷类应用后耳聋者 31 例<sup>[15]</sup>,但线粒体 12SrRNA 基因检测阳性率不高,尚有许多未知耳聋基因突变需进一步探索。

但此次的研究提示耳聋基因的筛查对人类听力健康至关重要,尤其应该将其与产前诊断相结合,通过对基因的筛查发现敏感的个体,对其进行相关的预防,以降低聋儿出生率,并对优生优育进行指导。目前研究的内容受标本量限制并不完善,后续将扩大标本量进行更进一步的研究,完善本地的基因突变数据库。

### 参考文献

[1] HILGERT N, SIMITH R J, VAN CAMP G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment; which ones should be analyzed in DNA diagnostics [J]. *Mutat Res*, 2009, 681 (23):189-196.

[2] 李海波,李琼,李红,等.非综合征性聋突变热点的流行病学分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外杂志*, 2012,26(13):589-594.

[3] LENARDUZZI S, VOZZI D, MORGAN A, et al. Usher syndrome: an effective sequencing approach to establish a genetic (下转第 1622 页)



- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016 年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3):167-181.
- [7] BOUSQUET J, KHALTAEV N, CRUZ A A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA (2) LEN and AllerGen) [J]. *Allergy*, 2008, 63 (Suppl 86):8-160.
- [8] ERWIN E A, RÖNMARK E, WICKENS K, et al. Contribution of dust mite and cat specific IgE to total IgE: relevance to asthma prevalence [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(2):359-365.
- [9] 罗星星, 陈展泽, 许杨杨等. 血清 IgG4 和 IgE 在儿童过敏性哮喘和过敏性鼻炎中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4):442-443.
- [10] 许健, 陈莉农, 黄成, 等. 成都地区过敏性疾病儿童过敏原种类分布及流行特征调查[J]. 重庆医学, 2015, 44(28):3992-3994.
- [11] 卓观宏, 曾东良, 刘倩如. 不同地区支气管哮喘儿童过敏原检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(2):176-177.
- [12] HUANG C, HU Y, LIU W, et al. Pet-keeping and its impact on asthma and allergies among preschool children in Shanghai, China[J]. *Chin Sci Bull*, 2013, 58(34):4203-4210.
- [13] 邵洁. 儿童过敏性疾病的早期预防[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(4):398-400.
- [14] 肖晓雄, 黄东明, 何晓玲, 等. 过敏性鼻炎儿童居住环境和饮食习惯中的危险因素分析[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(7):662-665.
- [15] 卢家美, 孙秀珍, 李满祥, 等. 西安市过敏性哮喘变应原谱的分析[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(6):728-731.
- [16] LI J, SUN B, HUANG Y, et al. A multicentre study assessing the prevalence of sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China [J]. *Allergy*, 2009, 64(7):1083-1092.
- [17] GUERRA S, SHERRILL D L, MARTINEZ F D, et al. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109(3):419-425.
- [18] 蔡幸生, 朱勇斌, 林丽爱, 等. 尘螨特异性 IgE 阳性儿童支气管哮喘脱敏治疗临床研究[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(15):2488-2490.

(收稿日期:2019-07-18 修回日期:2019-11-29)

(上接第 1617 页)

- and clinical diagnosis[J]. *Hear Res*, 2015, 320:18-23.
- [4] RAMZAN K, ALOWAINL M, HUMA R, et al. Utility of whole exome sequencing in the diagnosis of Usher syndrome: report of novel compound heterozygous MYO7A mutations [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2018, 108:17-21.
- [5] 张涛, 张英, 石磊. 常见遗传性耳聋基因的临床应用研究[J]. 青海医药杂志, 2016, 46(7):77-80.
- [6] 高薇薇, 卢文翔, 张雷, 等. 宁波地区非综合征型耳聋患儿耳聋基因热点突变筛查分析[J]. 浙江医学, 2017, 39(12):957-960.
- [7] 瞿剑伟, 王建峰, 徐思思, 等. 线粒体 DNA 突变、氨基糖苷类抗生素与耳聋. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志[J]. 2015, 29(22):1936-1940.
- [8] 高慧, 沈姗姗, 刘晶晶, 等. 几种定量线粒体 DNA1555A>G 异质性突变检测方法[J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(5):686-691.
- [9] 王芳, 刘星辰, 郭玉芬. 线粒体 DNA 突变与遗传性聋[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(4):405-408.
- [10] 廖生波, 谢天宏, 丁丹, 等. 遵义市汇川区特殊教育学校 192 例耳聋学生耳聋基因检测分析[J]. 遵义医科大学学报, 2019, 42(5):105-108.
- [11] 刘梦婷, 张天虹, 张硕影, 等. 在 1 例 Usher 综合征家系中定位 MYO7A 基因的两个新突变位点 [J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2019, 17(2):88-91.
- [12] 张怡, 张蕾, 张丽娜. 黑龙江某聋哑学校 103 例耳聋患者耳聋基因分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(11):101-102.
- [13] 张华, 张昊昱, 张为霞, 等. 河北省秦皇岛市聋哑学校耳聋患者基因突变调查分析[J]. 中华耳科学杂志, 2017, 15(3):310-313.
- [14] 芦婷, 刘艳玲, 马琪琪, 等. 191 例感音神经性耳聋患者常见耳聋基因筛查结果分析[J]. 宁夏医学杂志, 2019, 41(2):155-157.
- [15] 黄晗, 李小英, 陈鹏, 等. 遵义市汇川区特殊教育学校聋哑学生致聋原因调查分析[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(2):208-220.

(收稿日期:2019-09-20 修回日期:2019-12-25)