

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

高薇薇 卢文翔 张雷 白云飞

【摘要】 目的 筛查分析宁波地区非综合征型耳聋(NSHL)患儿耳聋基因热点突变情况,了解该地区耳聋患儿分子流行病学特征。方法 选取宁波市特殊教育中心就读的重度、极重度 NSHL 患儿 168 例,应用遗传性耳聋基因检测试剂盒,采用多重突变阻滞扩增系统毛细管电泳检测技术进行 4 个遗传性耳聋基因的 29 个位点的突变筛查。结果 本研究 NSHL 患儿中检出耳聋基因热点突变 58 例(34.52%),其中单一 GJB2 基因热点突变者 43 例,单一 SLC26A4 基因热点突变者 9 例,GJB2 基因合并 SLC26A4 基因热点突变者 3 例,12S rRNA 基因热点突变 3 例;GJB2、SLC26A4、12S rRNA 基因热点总突变率分别为 27.38%、7.14%和 1.79%。在所有热点突变中,以 GJB2 235delC 突变率最高(23.21%),其次是 GJB2 299 del AT(5.36%)。结论 宁波地区 NSHL 患儿热点突变耳聋基因以 GJB2 基因和 SLC26A4 基因为主,且 GJB2 235delC 是最常见突变位点。

【关键词】 遗传性耳聋 非综合征型耳聋 热点突变 基因诊断

Screening of hot-spot deafness gene mutations among children with non-syndromic hearing loss in Ningbo region GAO Weiwei, LU Wenxiang, ZHANG Lei, et al. Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315800, China

【Abstract】 Objective To screen the hot-spot deafness gene mutation in children with non-syndromic hearing loss (NSHL) in Ningbo region. Methods One hundred and sixty eight NSHL children were enrolled from Ningbo Special Education Center for the study. The screening of 29 hot-spot mutations of 4 deafness genes was performed by multiple ARMS capillary electrophoresis using AGCU genetic deafness gene detection kit. Results Among 168 children, the deafness gene mutations were detected in 58 cases (34.52%), including 43 cases with single hotspot mutation in GJB2 gene, 9 with hotspot mutations in single SLC26A4 gene, and 3 with GJB2 gene and SLC26A4 gene mutation, and 3 with 12S rRNA gene mutation. The total hot spot mutation rate of GJB2 gene was 27.38%, that of SLC26A4 gene was 7.14%, and that of 12S rRNA gene was 1.79%. The mutation rate of GJB2 235delC was the highest (23.21%), followed by GJB2 299 del AT (5.36%) in all hotspots. Conclusion GJB2 and SLC26A4 are the main genes associated with non-syndromic deafness patients in Ningbo area, and GJB2 235delC is the most common mutation site.

【Key words】 Hereditary hearing loss Non-syndromic hearing loss Hot-spot mutation Genetic diagnosis

我国每年患各种出生缺陷和先天残疾的新生儿中,听力残疾是最常见,也是最严重的,其中遗传因素导致的听力残疾超过半数。遗传性耳聋按表型不同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)。NSHL 是指

只有听力损害,不伴有耳外组织的异常和病变,约占遗传性耳聋的 70%。国内大规模的耳聋分子流行病学调查显示,在 NSHL 患者中存在几个热点突变:GJB2 基因突变、GJB3 基因突变、线粒体 12S RNA 和 SLC26A4 基因突变^[1]。这些热点突变的发现为我国开展耳聋基因突变的筛查、诊断及阻断提供了理论基础。本研究对宁波地区 NSHL 患儿进行了 4 个遗传性耳聋基因的 29 个位点的突变筛查,以了解该地区 NSHL 患儿耳聋基因热点突变谱系及发生频率,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2015 年 7 月至 2016 年 12 月在宁波市特殊教育中心及其附属幼儿园(鄞州区小雨点听力语

doi: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.12.2017-595

基金项目:浙江省教育厅科研项目(Y201534685)

作者单位:315100 宁波卫生职业技术学院(高薇薇);无锡中德美联生物技术有限公司研发部(卢文翔);浙江大学明州医院耳鼻咽喉科、浙江大学医学院附属邵逸夫医院耳鼻咽喉头颈外科(张雷);东南大学分子电子学国家重点实验室(白云飞)

通信作者:高薇薇,E-mail:wiwi_g@163.com

言康复中心)就读的具有完整听力学资料的重度、极重度耳聋患儿 168 例,排除各类 SHL 及慢性中耳炎、听神经性瘤、耳外伤等有明显原因致聋的患儿。经问卷调查及体格检查,全部患儿为 NSHL,其中男 87 例,女 81 例;年龄 3~16(11.22±4.10)岁。本研究患儿均接受了耳聋基因检测,并取得患儿及患儿家长的知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 AGCU 遗传性耳聋基因检测试剂盒(无锡中德美联生物技术有限公司),磁珠法 DNA 提取试剂盒(长春市博坤生物科技有限公司),去离子甲酰胺(美国 ABI 公司),POP4 胶(美国 ABI 公司),Life Pro 扩增仪(杭州博日科技有限公司),3130XL 型遗传分析仪(美国 ABI 公司)。

1.2.2 DNA 样本的采集 先在干净的 15ml 离心管上空白位置和管盖上作好耳聋患儿代号标记。耳聋患儿在取样前 30min 内停止进食。采样人员用消毒棉签轻轻刮取患儿口腔舌下及双侧颊黏膜口腔上皮细胞,轻轻地旋转或刮动 10 次左右以保证获得足够的 DNA,采集过程中注意避免用手触及棉签;采集完成后置于空气中风干片刻,再放回离心管并封口。

1.2.3 检测方法 采用磁珠法提取 DNA。每例棉签样本用小剪刀剪取少量,可被 150 μ l 裂解液淹没即可,提取的 DNA 直接用于 PCR 扩增。PCR 扩增体系组成: Reaction Mix 5.0 μ l+ Primers 2.0 μ l + 热启动 C-Taq 酶 0.3 μ l + 模板(磁珠法提取)1.0 μ l + sdH₂O 1.7 μ l。PCR 扩增程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,60 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min(循环 30 次),终延伸 72 $^{\circ}$ C 20min。

1.2.4 热点突变筛查 采用多重突变阻滞扩增系统毛细管电泳检测技术筛查。取 1 μ l PCR 产物与 10 μ l 去离子甲酰胺和 AGCU Marker SIZ-500 混合物混匀,采用 3130XL 型遗传分析仪检测(进样电压 3KV,时间 10s),结果采用 GeneMapper v3.2 软件进行分析。筛查 4 个遗传性耳聋基因的 29 个位点的突变,包括 GJB2 基因(9、35、167、176、235、299、155、424、512)、GJB3 基因(538、547)、SLC26A4 基因(281、589、707、IVS7-2、1174、1226、1229、1238、1336、1548、1829、1975、IVS15+5、2027、2168)和 12S rRNA 基因(1494、1555、12201)。

2 结果

2.1 168 例 NSHL 患儿耳聋基因热点突变分析 本研究 NSHL 患儿中检测到耳聋基因热点突变者 58 例(34.52%),其中单一 GJB2 基因热点突变者 43 例,单一

SLC26A4 基因热点突变者 9 例,GJB2 基因合并 SLC26A4 基因热点突变者 3 例,12S rRNA 基因热点突变 3 例。GJB2 基因热点总突变率为 27.38%(46/168),SLC26A4 基因热点总突变率为 7.14%(12/168),12S rRNA 基因热点总突变率 1.79%(3/168)。在上述所有热点突变中,GJB2 235delC 突变率最高,为 23.21%(39/168);其次是 GJB2 299 del AT,为 5.36%(9/168);SLC26A4 1226G>A、2168A>G 以及 12S rRNA 1555A>G 突变率均为 1.79%(3/168);本研究患儿未检出 GJB3 基因突变。168 例 NSHL 患儿耳聋基因热点突变分析见表 1。

表 1 168 例 NSHL 患儿耳聋基因热点突变分析

耳聋基因	突变热点	突变率(%)	致病突变率(%)
GJB2	235delC	23.21(39/168)	13.01(22/168)
	299delAT	5.36(9/168)	-
	176del16	1.19(2/168)	-
	35delG	0.60(1/168)	-
SLC26A4	1226G>A	1.79(3/168)	-
	2168A>G	1.79(3/168)	0.60(1/168)
	1229C>T	1.19(2/268)	-
	1975G>C	1.19(2/168)	0.60(1/168)
	1180delTTC	0.60(1/168)	-
12S rRNA	919A>G	0.60(1/168)	0.60(1/168)
	1555A>G	1.79(3/168)	1.19(2/168)

2.2 58 例耳聋基因突变 NSHL 患儿突变热点分析 由表 2 可见,46 例 GJB2 基因热点突变 NSHL 患儿中 GJB2 基因单个热点突变的患者 39 例,分别为 235delC 纯合突变 21 例,235delC 杂合突变 11 例,299-300delAT 杂合突变 5 例,176del16 杂合突变 1 例,35delG 杂合突变 1 例;GJB2 基因 2 个突变热点的患者 4 例,分别是 299delAT/235delC 复合杂合突变 3 例,176del16、235delC 复合杂合突变 1 例;GJB2 基因与 SLC26A4 基因复合突变的患者 3 例,分别是 GJB2 235delC 纯合突变合并 SLC26A4 1180delTTC 杂合突变 1 例,GJB2 235delC 杂合突变合并 SLC26A4 2168A>G 杂合突变 1 例。

12 例 SLC26A4 基因热点突变 NSHL 患儿中,与 GJB2 基因复合突变 3 例,SLC26A4 基因单一热点突变 9 例:919A>G 纯合突变 1 例,1975G>C 纯合突变 1 例,杂合突变 1 例,1226G>A 杂合突变 3 例,2168A>G 杂合突变 1 例,1229C>T 杂合突变 2 例。

3 例 12S rRNA 基因热点突变 NSHL 患儿中,1555A>G 均质性突变 2 例,1555A>G 异质性突变 1

表 2 58 例耳聋基因突变 NSHL 患儿突变热点分析(例)

耳聋基因	突变热点	纯合	杂合	复合杂合	双基因突变
GJB2	235delC	21	11		
	35delG		1		
	176-191del16		1		
	299-300delAT		5		
	299-300delAT/235delC			3	
	176-191del16/235delC			1	
GJB2& SLC26A4	235delC/W& 2168A>G/ 2168A>G				1
	235delC/235delC& 1180-1182delTTC/W				1
	235delC/W, 299-300delAT& 2168A>G/W				1
SLC26A4	1975G>C	1	1		
	1226G>A		3		
	919A>G	1			
	2168A>G		1		
	1229C>T		2		
12S rRNA	1555 A>G	2	1		
合计		25	26	4	3

例。其中 2 例 1555A>G 均质性突变患儿为出生后用药致聋,另 1 例异质性突变患儿为先天性聋。

3 讨论

遗传因素能够影响耳聋的发生、发展,通过确定耳聋患者及高危人群的遗传因素,给予正确的指导及干预措施,可一定程度上预防耳聋新发及加重。目前发现的耳聋基因众多,突变谱广泛,国内 NSHL 患者耳聋基因热点突变的确定为寻找国内多数 NSHL 的病因指明了方向。

GJB2 基因突变会导致耳蜗中的细胞缝隙连接中断,导致听觉功能失常。目前约有 50% 的常染色体隐性遗传 NSHL 存在该基因耳聋突变^[2]。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。GJB2 基因的突变几乎覆盖整个编码区,其突变位点具有明显的种族差异性,欧美人群中 GJB2 基因突变最多见为 30delG 或 35delG 的热点突变^[3],纪育斌等^[4]2011 年通过对国内 GJB2 基因突变流行病学文献的荟萃分析认为国内 GJB2 总体致病突变率为 12.88%,总体突变率为 19.41%。彭新等^[5]报道扬州地区 278 例 NSHL 的 GJB2 基因突变率为 31.7%,致病突变率为 23.4%。张迪等^[6]报道内蒙古自治区 355 例 NSHL 患者 GJB2 基因突变率为 14.93%;GJB2 基因具有多种突变方式,国内多项耳聋分子流行病学调查研究表明,GJB2 基因以 235delC 突变最常见,其次为 299delAT、176del 16,而 35delG 突变少见。戴朴等^[7]对 1 680 例 NSHL 患者进行耳聋分子流行病学研究,发现 GJB2

235delC 突变率较高,为 18.16%。于飞等^[8]研究提示国内不同地区 NSHL 患者 235delC 突变率为 6.59%~25.18%。杨雪等^[9]报道贵州省 356 例 NSHL 患者 GJB2 基因最常见突变位点是 235delC。本研究结果显示,宁波地区 NSHL 患儿 GJB2 基因致病突变率为 13.01%(22/168),突变率为 27.38%(46/168),表明宁波地区耳聋基因突变以 GJB2 突变最普遍;本研究结果显示 235delC 突变率最高,为 23.21%,突变率明显高于 GJB2 其他位点,其中纯合突变有 22 例,杂合突变有 17 例,说明 235del 也是宁波地区 NSHL 患儿中最常见的突变位点。

SLC26A4 基因突变可引起 NSHL 及 SHL。在 NSHL 中,SLC26A4 基因与常见的一种内耳畸形-大前庭导水管综合征的发病有直接因果关系,国内各地区有关 SLC26A4 基因突变率的报道并不一致:梁鹏飞等^[10]报道陕西省 800 例 NSHL 患者 SLC26A4 基因突变率为 18.88%;刘水霞等^[11]报道广西地区 127 例 NSHL 患者 SLC26A4 基因突变率为 2.36%;牟书瑜等^[12]报道大连地区 5 266 例耳聋患者中 SLC26A4 基因突变率为 9.72%。不同种族人群中 SLC26A4 基因突变谱不同,国内 SLC26A4 基因突变热点主要是 IVS7-2A>G:袁永一等^[13]对国内 2 352 例重度、极重度耳聋人群进行了 SLC26A4 基因全序列分析,发现 IVS7-2A>G 位点突变率达到 11.52%;何本超等^[14]对湖北天门市 52 例聋哑儿童基因检测发现 SLC26A4 基因突变率为 17.30%,以 IVS7-2A>G 位点突变最为常见。本研究结果显示 SLC26A4 基因热点突变率为 7.14%(12/168),其中纯合突变 3 例,分别是 1975G>C、919A>G 和 2168A>G,此 3 例患儿临床诊

断均为大前庭导水管综合征,其它热点突变为杂合突变,分别为 1975G>C、2168A>G、1226G>A 和 1229C>T,并未发现国内报道最多的 IVS 7-2 A>G 突变。除了选择对象的不同,推测可能确实存在地区间的差异。受实验条件限制,由于此基因的遗传特性,双等位基因突变可以导致耳聋表型的发生,对单杂合突变和复合杂合突变的耳聋患者,检测结果受目前耳聋基因突变位点数目及种类的限制,不能检出全部已知 SLC26A4 基因突变位点,所以 SLC26A4 基因单杂合突变患者应进一步做基因测序明确病因。

线粒体 12S rRNA 基因突变跟母系遗传有关,该突变携带者应用氨基糖苷类药物可造成不可逆的听力损害。目前,mtDNA12S rRNA A1555G 点突变导致的药物性耳聋已成为公认的突变致聋位点,纪育斌等^[15]综合 16 篇研究对象为 NSHL 患者的文献数据,初步得出中国患者 A1555G 突变率为 6.62% (230/3473)。本研究结果显示 12S rRNA 突变率为 1.79% (3/168),低于国内其他报导,其中 2 例为 1555 A>G 均质性突变,此 2 例患儿均为出生后用药致聋;另 1 例为异质性突变,该患儿致聋病因与其有一定相关。目前在对这 3 个患儿母系家庭成员进行相关调查,拟行基因突变的筛查,找出携带该基因突变的氨基糖苷类药物敏感听力正常个体,通过科普宣教、指导用药、遗传咨询、产前诊断等干预措施,能阻断该基因突变在此类家族中继续传递。

总之,耳聋基因热点突变筛查对于耳聋阻断意义重大。对多数耳聋患者可以从分子学进行诊断,利用基因快速检测技术筛查耳聋人群和突变基因携带者,通过产前诊断技术预防后代耳聋的发生。

4 参考文献

- [1] 戴朴. 遗传性耳聋的预防和阻断[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(40): 2811-2813.
- [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] Putcha G V, Bejjani B A, Bleoo S, et al. A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort[J]. *Genet Med*, 2007, 9(7): 413-426.
- [4] 纪育斌, 兰兰, 王大勇, 等. 中国非综合征型聋患者 GJB2 基因突变流行病学文献荟萃分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(4): 323-327.
- [5] 彭新, 关兵, 徐英, 等. 扬州市 278 例非综合征性耳聋患者常见耳聋基因突变检测结果分析[J]. *中国耳鼻咽喉科杂志*, 2013, 13(4):254-257.
- [6] 张迪, 韩东一, 段宏, 等. 新型多基因检测技术对内蒙古自治区 355 例非综合征性聋患者的检测分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(22):1941.
- [7] 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 A 1555G 突变筛查报告[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(1):1-5.
- [8] 于飞, 戴朴, 韩东一, 等. 中国部分地区非综合征型耳聋患者 GJB2 基因 233~235delC 突变频率分析[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2006, 13(3):223-226.
- [9] 杨雪, 王幼勤, 郭洪源, 等. 贵州省 356 例非综合征型聋患者常见致聋基因突变分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2017, 25(1): 9-13.
- [10] 梁鹏飞, 王淑娟, 王剑, 等. 陕西省 800 例非综合征型聋患者常见致聋基因突变分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2015, 23(1):11-15.
- [11] 刘水霞, 胥亮, 陈柏文, 等. 广西地区 127 例非综合征性聋患者常见致聋基因突变位点的筛查分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(22):1954-1958.
- [12] 牟书瑜, 刘琳, 崔玲, 等. 大连地区耳聋人群常见聋病基因突变的研究[J]. *大连医科大学学报*, 2015, (1):34-36.
- [13] 袁永一, 黄莎莎, 王国建, 等. 27 个省市聋校学生基于 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 突变的全序列分析[J]. *中华耳科学杂志*, 2011, 9(1): 17-23.
- [14] 何本超, 徐碧生, 李健勇, 等. 天门市特殊教育学校聋哑学生耳聋相关基因检测结果分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2012, 20(6): 547-550.
- [15] 纪育斌, 王秋菊, 兰兰, 等. 国内线粒体 DNA 12S rRNA A 1555G 突变的流行病学文献分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(1): 6-10.

(收稿日期:2017-03-19)

(本文编辑:李媚)

(上接第 956 页)

- [13] Genzer Y, Dadon M, Burg C, et al. Ketogenic diet delays the phase of circadian rhythms and does not affect AMP-activated protein kinase (AMPK) in mouse liver[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 417: 124-130.
- [14] Jeon B T, Lee D H, Kim K H, et al. Ketogenic diet attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death by decreasing

AMPK/ACC pathway activity and HSP70[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453(1): 49-53.

- [15] Guo D, Zeng L, Zou J, et al. Rapamycin prevents acute dendritic injury following seizures[J]. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2016, 3(3): 180-190.

(收稿日期:2016-11-02)

(本文编辑:陈丹)