

非综合征耳聋患者线粒体 DNA 12S rRNA 及 tRNA^{Ser(UCN)} 基因序列分析

戴大春¹, 鲁雅洁², 陈智斌³, 魏钦俊², 曹新², 邢光前^{3*}, 卜行宽³

(¹南京医科大学附属医院南京明基医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210019; ²南京医科大学生物技术系, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 12S rRNA 基因及 tRNA^{Ser(UCN)} 基因突变与非综合征耳聋的相关性, 以及常见致聋突变携带频率。方法: 收集非综合征耳聋患者 135 例和听力正常对照人群 126 例的外周血样本, 常规方法提取基因组 DNA, PCR 扩增 mtDNA 12S rRNA 基因及 tRNA^{Ser(UCN)} 基因, 扩增产物经直接测序进行耳聋相关突变的鉴定。结果: 135 例非综合征耳聋患者中共检测到 11 种 mtDNA 12S rRNA 碱基变异, 其中 4 种已知致病突变的携带率分别为: A827G, 4.4%; T961C, 1.5%; T1095C, 0.7%; A1555G, 1.5%。两组人群均未检测到 12S rRNA C1494T 突变以及 tRNA^{Ser(UCN)} 基因任何形式的致聋突变。结论: mtDNA 12S rRNA 是南京地区汉族非综合征耳聋人群的突变热点基因, 其常见致聋突变总携带率约为 8.1%。

[关键词] 非综合征耳聋; 线粒体 DNA; 12S rRNA 基因; tRNA^{Ser(UCN)} 基因; 基因突变

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-067-05

Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser(UCN)} genes in patients with non-syndromic hearing loss

DAI Da-chun¹, LU Ya-jie², CHEN Zhi-bin³, WEI Qin-jun², CAO Xin², XING Guang-qian^{3*}, BU Xing-kuan³

(¹Department of Otolaryngology, BenQ Medical Center Affiliated to NJMU, Nanjing 210019; ²Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the prevalence and characteristics of mitochondrial DNA (mtDNA) 12S rRNA gene and tRNA^{Ser(UCN)} gene mutations in Chinese subjects with non-syndromic hearing impairment. **Methods:** The peripheral blood samples were obtained from 135 patients with non-syndromic hearing loss and 126 normal hearing controls. Genomic DNA was isolated from the peripheral leukocytes of all participants using the Puregene DNA Isolation Kits. The subject's DNA fragments spanning the entire mitochondrial 12S rRNA gene and tRNA^{Ser(UCN)} gene were PCR amplified. Each fragment was purified and subsequently analyzed by direct sequencing to identify deafness-associated mutations. **Results:** There were totally eleven 12S rRNA sequence variants detected in 135 hearing-impaired subjects. Of those, 4 variants are known deafness-associated mutations with variable frequencies of 4.4% in A827G, 1.5% in T961C, 0.7% in T1095C and 1.5% in A1555G. Other variants, such as T1005C, C1048T, T1119C, G709A, C752T and A1382C, seem to be polymorphisms rather than causes of disease. On the other hand, we did not find C1494T mutation in the 12S rRNA gene and any of the known deafness-associated mutations in tRNA^{Ser(UCN)} gene in all individuals. **Conclusion:** The 12S rRNA gene may be a hot spot for mitochondrial mutations causing non-syndromic hearing loss in the Han nationality population in Nanjing, Jiangsu province, with a total carrier frequency of 8.1% for deafness-related mutations.

[Key words] non-syndromic hearing loss; mitochondrial DNA; 12S rRNA gene; tRNA^{Ser(UCN)} gene; gene mutation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 067-071]

人类线粒体 DNA 是由 16 569 bp 组成的双链

超螺旋闭合环状分子, 编码、合成线粒体蛋白质所必需的 2 类 rRNA (12S rRNA 和 16S rRNA)、22 种 tRNA 以及 13 种与细胞氧化磷酸化有关的多肽链亚单位, 通过氧化磷酸化过程以 ATP 形式为细胞提

[基金项目] 江苏省“科教兴卫工程”医学重点人才基金 (RC2007064)

*通讯作者, E-mail: xing-gq@163.com

供能量。

耳蜗毛细胞内富含线粒体,提示正常听觉很大程度上依赖于线粒体的功能。业已证实,多种线粒体突变与感音神经性听力损失有关,其中 12S rRNA 基因以及 tRNA^{Ser(UCN)}基因是公认的突变热点,主要引起非综合征型听力损失;而另外 3 个 tRNA 基因 [tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Lys} 和 tRNA^{Glu}]突变频率相对较低,主要导致综合征型听力损失^[1]。为进一步了解 mtDNA 突变与非综合征耳聋的关系,以及了解常见线粒体致病突变在我国非综合征耳聋人群中的发生频率,本研究采用 PCR 扩增和基因测序等技术,对 135 例散发聋患者及 126 例听力正常的志愿者进行了 mtDNA 12S rRNA 基因和 tRNA^{Ser(UCN)}基因的序列分析,报道如下。

1 资料和方法

1.1 资料

135 例散发聋患者来自南京市聋校,均为汉族,其中男 61 例,女 74 例,年龄 6~17 岁,平均年龄 13 岁。采用问卷调查并获知情同意,对所有研究对象进行详细病史调查(包括耳聋家族史、耳毒

性药物使用情况等)、体检和系统听力学测试(纯音测听、声导抗和畸变产物耳声发射),确定为非综合征型感音神经性耳聋,所有患者氨基糖甙类药物接触史均难以明确。126 例听力正常对照来自在校学生。

1.2 方法

1.2.1 标本采集、处理和 DNA 制备

采集受检对象外周静脉血 3~5 ml,EDTA 抗凝。酚/氯仿法提取基因组 DNA。取少量 DNA 用紫外分光光度计进行定量和纯度检测,其余保存于-70℃备用。

1.2.2 mtDNA 12S rRNA 及 tRNA^{Ser(UCN)}基因 PCR 扩增

根据需要共设计 3 对引物,由上海博亚生物技术有限公司合成,聚丙烯酰胺凝胶纯化。其中引物 1、2 扩增产物覆盖 mtDNA 12S rRNA 基因的全部编码区,引物 3 产物覆盖了 mtDNA tRNA^{Ser(UCN)}基因目前已知的致聋突变位点。引物序列及扩增片段长度见表 1。

PCR 扩增:50 μl 的 PCR 反应体系,包括:1×PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,0.25 mmol/L dNTPs,

表 1 PCR 引物及扩增片段长度

Table 1 The PCR primers and the amplification size

引物名称	引物序列(5'→3')	对应 mtDNA 位置	退火温度(℃)	片段长度(bp)
1F	CTCCTCAAAGCAATACACTG	(nt)594~613	55	840
1R	TGCTAAATCCACCTTCGACC	(nt)1 432~1 413		
2F	CGATCAACCTCACCACCTCT	(nt)1 228~1 247	55	802
2R	TGGACAACCAGCTATCACCA	(nt)2 028~2 009		
3F	ACGCCAAAATCCATTTCACT	(nt)7 130~7 149	55	987
3R	CGGGAATTGCATCTGTTTTT	(nt)8 115~8 096		

F:正义链引物;R:反义链引物。

5 μmol/L 引物,200~500 ng DNA 模板,1.5 U PrimerSTAR HS DNA 聚合酶(PCR 反应试剂均为日本 TaKaRa 公司产品)。PCR 反应在 DNA 热循环仪(MJ Research PTC200,美国 Thermal 公司)上进行,反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,32 个循环,72℃再延伸 10 min。采用热启动 PCR 法扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 序列分析

以 Agarose 胶纯化 PCR 产物,制备测序模板,送上海英骏生物技术有限公司采用双脱氧链终止法进行测序;将测序结果在 NCBI/Blaster 上与标准序列比对,确定基因突变位点。对突变的序列进行反

向测序验证。

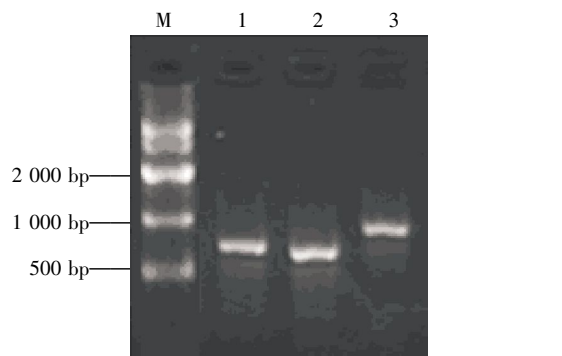
2 结果

2.1 PCR 结果

对 135 例耳聋患者及 126 例听力正常对照的 DNA 样本进行了 PCR 扩增,凝胶电泳均见特征性条带,与预期结果相符(图 1)。

2.2 mtDNA 12S rRNA 基因测序结果

与 mtDNA 基因的标准序列(accession number, NC_001807.4)相比,135 名非综合征耳聋患者中共检测到 11 种碱基变异(表 2),其中包括 4 种已知的致聋突变(图 2),检出率分别为:A827G,4.4%;T961C,1.5%;T1095C,0.7%;A1555G,1.5%。上述 4



M:DNA 分子量标准;1:引物 1 扩增产物 840 bp;2:引物 2 扩增产物 802 bp;3:引物 3 扩增产物 987 bp。

图 1 PCR 扩增结果(79 号患者)

Figure 1 Results of PCR amplification(No.79)

种突变在对照组的检出率均为 0。两组人群中未发现 C1494T 突变个体。

2.3 mtDNA tRNA^{Ser(UCN)}基因测序结果

所有耳聋患者及听力正常对照均未检测到 tR-

表 2 12S rRNA 基因碱基变异情况

位点	碱基变异	耳聋患者检出率	对照组检出率	是否已报道 [#]
709	G to A	3/135	2/126	有
752	C to T	4/135	1/126	有
827*	A to G	6/135	0	有
961*	T to C	2/135	0	有
1005	T to C	6/135	3/126	有
1048	C to T	2/135	0	有
1095*	T to C	1/135	0	有
1119	T to C	3/135	0	有
1382	A to C	4/135	3/126	有
1438	A to G	125/135	112/126	多态性位点
1555*	A to G	2/135	0	有

[#]:参照 <http://www.mitomap.org>; *:已经明确或可疑但尚未证实的致聋性突变。

NA^{Ser(UCN)}基因已知的致聋突变,如 A7445G、7472in-sC、T7510C、T7511C、T7512C 和 G7444A^[1]。

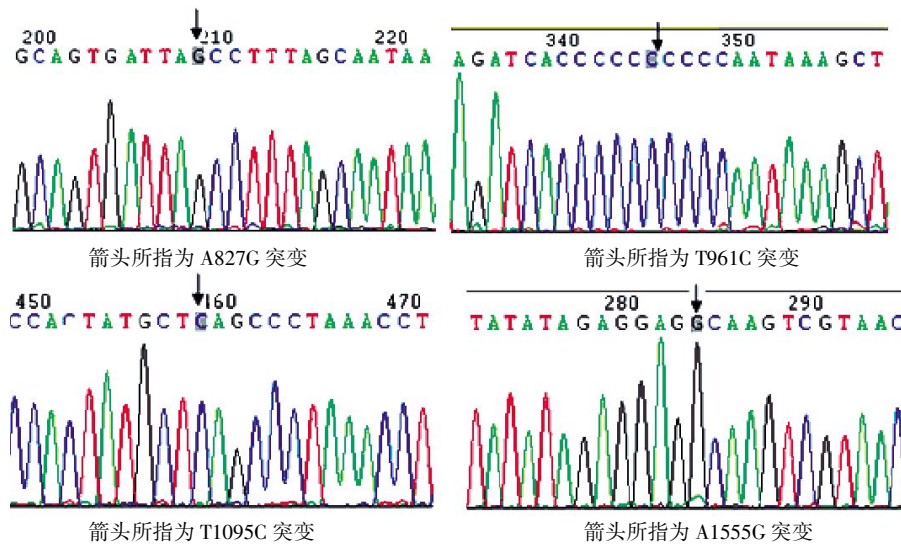


图 2 mtDNA 12S rRNA 基因 A827G、T961C、T1095C 和 A1555G 突变测序结果

Figure 2 Sequencing of mtDNA 12S rRNA gene for A827G, T961C, T1095C and A1555G mutations

3 讨论

自 1993 年 Prezant 等^[2]首先报道在一个母系遗传的阿拉伯-以色列耳聋家系中发现 mtDNA 12S rRNA 基因 A1555G 突变以来,迄今已在不同国家、不同种族的家系和散发耳聋患者中证实该位点突变与非综合征型耳聋及氨基糖甙类药物致聋相关^[3-5]。对 A1555G 突变个体淋巴细胞系的生化研究表明,突变细胞系的线粒体蛋白合成率及氧耗率明显降低,提示 A1555G 本身可以导致蛋白质合成障碍和听力下降^[6],但其临床表型(听力障碍程度、外显率

和发病年龄)受多种因素的调节,如线粒体单倍型、核修饰基因和氨基糖甙类抗生素等^[7]。研究认为,当 1555 位的 A 突变为 G 后,可与 1494 位的 C 形成新的碱基配对,使得 12S rRNA 的二级结构酷似大肠杆菌 16S rRNA 的二级结构,从而易于同氨基糖甙类抗生素结合产生耳毒性^[7]。

现有资料表明,A1555G 是目前最常见的 mtDNA 致聋突变形式,但其在非综合征耳聋群体中的携带率存在明显的地域和种族差异性,如 0.6%~2.5% 的非综合征耳聋高加索人中可以检测到 A1555G 突变^[8],而来自印度尼西亚的报道高达 5.3%^[5]。即便

是同样针对中国汉族非综合征耳聋患者的调查也显示出迥异的结果,如 Li 等^[9]报道温州聋校学生的检出率为 2.9%,邓蔚等^[10]和何勇等^[11]报告在福州和武汉地区的检出率分别为 0.67%和 2.27%,而本研究在南京地区的检出率约为 1.5%(2/135),处于较低水平。导致这一差异的原因可能与地域差异、样本量偏小所引起的抽样误差以及氨基糖甙类药物的不同使用情况等有关。

C1494T 是新近在中国非综合征及氨基糖甙类抗生素致聋家系中发现的 mtDNA 突变,该突变以类似于 A1555G 的机制导致听力下降和对氨基糖甙类的遗传易感性^[8,12]。本研究在总共 261 例南京聋校学生及对照人群中均未检测到 C1494T 突变,结合 Li 等^[9]对 128 名温州聋校学生 12S rRNA 进行筛查也没有发现该突变,提示其在中国非综合征耳聋中的突变频率较低。

12S rRNA 基因的 961 位点可以出现 961delT+C(n)、961insC 及 T961C 等多种形式的突变,导致非综合征型耳聋和氨基糖甙类药物性耳聋^[9,13-15],但本文仅检出 T961C 一种突变(2/135,1.5%)。961 位点介于 12S rRNA 基因的 loop21 和 loop22 之间,并非保守结构区,其功能也不十分确定。推测该位点突变改变了 rRNA 的三级或四级结构,并间接影响其与氨基糖甙类抗生素的结合,从而在听力障碍的发生中起作用^[7]。

T1095 位于 12S rRNA 的第 25 个螺旋茎杆结构上,该 RNA 的 P 位在许多物种中高度保守。1 095 位点 T 到 C 的转换打破了该处一个进化上保守的碱基对 A-U,导致线粒体蛋白合成障碍和细胞色素 c 活性的明显降低^[16]。文献报道,该突变可导致综合征和非综合征耳聋,并与氨基糖甙类药物遗传易感性有关^[16-17]。本研究中仅 1 例患者检测到该位点突变,有趣的是,该患者还同时伴有 A1555G 突变,T1095C 与 A1555G 的共分离现象既往尚未见报道,两者在耳聋发病过程中是否存在相互作用尚需进一步研究。遗憾的是,该患者是一名孤儿,无法深入了解其亲属的听力情况及遗传学背景资料。

12S rRNA A827G 突变的致病性近年来才逐渐引起关注。继 Li 等^[9]在散发的非综合征耳聋及氨基糖甙类致聋患者中检测到该突变后,最近又由 Xing 等^[18]以及 Chaig 等^[19]分别在遗传上相互独立的中国和阿根廷耳聋家系中予以报道,进一步揭示了 A827G 可能是一个新的 mtDNA 致聋突变。A827 位于 12S rRNA 高度保守的 A 位,该位点 A→

G 的突变可能改变了 12S rRNA 的三级或四级结构,从而引起线粒体功能障碍和听力下降。本研究在南京聋校 135 例非综合征耳聋患者中共检测到 6 例携带该位点的纯合突变,是一个相对较高的突变频率(4.4%),提示 A827G 可能在我国非综合征耳聋的发生中起着较为重要的作用,在开展耳聋基因筛查和遗传咨询时有必要充分考虑这一可能性。

虽然 T1005 位点位于 12S rRNA 的保守区域,但目前缺乏有力的证据支持该位点突变可以独立引起耳聋表型。本组患者中 T1005C 突变检出率高达 4.4%(6/135),同时在听力正常人中的检出率也较高(3/126)。Bae 等^[20]最近也报道,在一组韩国非综合征耳聋和听力正常对照中 T1005C 具有相同的检出率。或许,该位点突变尚需要其他因素的调控才导致听力下降,或者,该突变本身仅仅是一个多态性位点,本文 6 名患者的听力下降另有其因。

此外,本组 135 名耳聋患者中,2 例检测到 C1048T 突变,3 例存在 T1119C 突变,而对照组没有检测到,由于上述碱基变异均不引起编码氨基酸的改变,其导致听力损失的可能性较小。其他如 G709A、C752T 以及 A1382C 变异在两组人群中均有发现,是已报道的 mtDNA 12S rRNA 多态性位点。

综上所述,通过对 135 名非综合征耳聋患者 mtDNA 12S rRNA 基因的序列分析,已知及可疑致聋突变的总检出率高达 8.1%(11/135),表明该基因突变在非综合征型耳聋的发生中起着非常重要的作用。本研究无论在耳聋人群还是在听力正常人中均未检测到 tRNA^{Ser(UCN)}基因任何形式的致聋突变,提示该基因可能不是南京地区汉族非综合征耳聋患者的突变热点基因。

[参考文献]

- [1] Xing G, Chen Z, Cao X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function[J]. *Cell Res*, 2007, 17(3): 227-239
- [2] Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness [J]. *Nat Genet*, 1993, 4(3): 289-294
- [3] Casino RA, Bykhovskaya Y, Johnson DF, et al. Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families[J]. *Am J Med Genet*, 1998, 79(5): 388-391
- [4] Estivill X, Govea N, Barcelo' A, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(1): 27-35

- [5] Malik S, Sudoyo H, Sasmono T, et al. Nonsyndromic sensorineural deafness associated with the A1555G mutation in the mitochondrial small subunit ribosomal RNA in a Balinese family[J]. *J Hum Genet*, 2003, 48(3):119-124
- [6] Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(8):573-580
- [7] Guan MX. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1011:259-271
- [8] Guan MX. Prevalence of mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(2):237-245
- [9] Li Z, Li R, Chen J, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss[J]. *Hum Genet*, 2005, 117(1):9-15
- [10] 邓蔚, 于飞, 戴朴, 等. 福州市特教学校非综合征性聋分子病因学分析—GJB2 235delC 突变和线粒体DNA 12S rRNA A1555G 突变筛查报告 [J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(1):12-14
- [11] 何勇, 孙勃, 戴朴, 等. 武汉地区非综合征性聋分子病因学分析—GJB2 235delC 突变和线粒体DNA 12S rRNA A1555G 突变筛查报告 [J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(1):24-26
- [12] Zhao H, Li R, Wang Q, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and non-syndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(1):139-152
- [13] Bacino C, Prezant TR, Bu X, et al. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness[J]. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(3):165-172
- [14] Tang HY, Hutcheson E, Neill S, et al. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: How many are at risk? [J]. *Genet Med*, 2002, 4(5):336-345
- [15] Li R, Xing G, Yan M, et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with A1555G mutation of mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss[J]. *Am J Med Genet*, 2004, 124A(2):113-117
- [16] Thyagarajan D, Bressman S, Bruno C, et al. A novel mitochondrial 12S rRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy [J]. *Ann Neurol*, 2000, 48(5):730-736
- [17] Zhao L, Young WY, Li R, et al. Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA 1095T>C mutation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(4):1503-1508
- [18] Xing G, Chen Z, Wei Q, et al. Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4):1253-1257
- [19] Chaig MR, Zernotti ME, Soria NW, et al. A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(3):631-636
- [20] Bae WJ, Lee KY, Choi SY, et al. Molecular analysis of mitochondrial gene mutations in Korean patients with nonsyndromic hearing loss [J]. *Int J mol med*, 2008, 22(2):175-180

[收稿日期] 2011-08-03