

耳聋分子病因学检测与临床应用研究

朱晓燕^{1Δ}, 魏钦俊², 鲁雅洁², 王荷溪³, 陈智斌¹, 曹新², 邢光前^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学生物技术系, 江苏 南京 210029; ³镇江市计划生育指导所, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的:探讨基因检测在耳聋病因学诊断中的应用前景。方法:收集原因不明的门诊非综合征型耳聋患者 200 例,采用耳聋基因芯片结合 DNA 序列测定方法,对中国人中 4 个常见耳聋相关基因的 9 个热点突变进行分子检测。9 个突变位点分别是:GJB2 基因的 35delG、176del16bp、235delC 和 299delAT, GJB3 基因的 C538T, SLC26A4 基因的 IVS7-2A>G 和 A2168G, 以及线粒体 DNA 12S rRNA 基因的 A1555G 和 C1494T。结果:芯片筛查发现携带上述耳聋基因突变者 78 例(39.0%),其中 GJB2 突变 37 例(18.5%), SLC26A4 突变 28 例(14.0%), GJB3 突变 2 例(1.0%), mtDNA 12S rRNA 突变 11 例(5.5%)。59 例(29.5%)患者可确诊为遗传性耳聋。结论:约 30%的原因不明的门诊非综合征型耳聋患者与遗传因素有关,耳聋基因诊断具有广阔的应用前景。

[关键词] 非综合征型耳聋;GJB2 基因;SLC26A4 基因;基因诊断

[中图分类号] R764.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-186-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130209

Molecular etiology analysis and clinical application in deafness patients

Zhu Xiaoyan^{1Δ}, Wei Qinjun², Lu Yajie², Wang Hexi³, Chen Zhibin¹, Cao Xin², Xing Guangqian^{1*}

(¹Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 210029; ³Zhenjiang Institute for Family Planning, Zhenjiang 212000, China)

[Abstract] Objective: To explore the significance of genetic testing in the etiological diagnosis in deafness patients. Methods: A total of 200 unrelated individuals with nonsyndromic hearing loss of unknown etiology were recruited for the mutational screening, by using the methods of DNA microarray and direct sequencing. The mutations tested were 35delG, 176del16bp, 235delC and 299delAT in the GJB2 gene, C538T in the GJB3 gene, IVS7-2A>G and A2168G in the SLC26A4 gene, and A1555G and C1494T in the mitochondrial 12S rRNA gene. Results: Deafness-causing mutations were detected in 78 patients (39.0%), of which 59 subjects (29.5%) were diagnosed as hereditary hearing loss. The carrier frequencies of deafness-causing mutations in these patients were 18.5% in GJB2, 14.0% in SLC26A4, 1.0% in GJB3 and 5.5% in mitochondrial DNA 12S rRNA, respectively. Conclusion: Genetic factors account for almost 30% hearing-impaired subjects of unknown etiology. The results indicate the necessity of genetic screening for mutations of these causative genes in patients with nonsyndromic hearing loss.

[Key words] nonsyndromic hearing loss; GJB2; SLC26A4; genetic testing

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 186-190]

耳聋是人类最常见的感觉功能障碍,每 1 000 名新生儿中就有 1 人患重度或极重度听力异常,其

中约 60%与遗传因素有关。根据是否合并其他临床症状,遗传性耳聋可分为综合征型耳聋和非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)两种,后者约占 70%。截至 2012 年 2 月 17 日,国际上已成功克隆了 40 个常染色体隐性、26 个常染色体显性和 3 个 X-连锁 NSHL 相关基因(<http://hereditaryhearingloss.org/>)。此外,越来越多的证据显示,线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的多种突变也与

[基金项目] 国家自然科学基金(31171217);江苏省科教兴卫工程医学创新团队与领军人才基金(LJ201120)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xing-gq@163.com

Δ现工作单位为南京市中西医结合医院耳鼻喉科,江苏南京 210014

NSHL发生密切相关^[1-2]。由于涉及的基因较多,且每个基因中又散在数目众多的耳聋突变位点,因而NSHL具有较高的基因和位点遗传异质性。

近年来,我国大规模的耳聋分子流行病学研究表明,大部分NSHL仅由为数不多的几个基因突变引起,如GJB2、SLC26A4、mtDNA 12S rRNA及GJB3等^[3-5],这为临床上规模化开展耳聋基因诊断和遗传咨询奠定了重要的理论基础。本研究通过耳聋基因芯片结合DNA测序技术,对门诊收集的200例NSHL患者进行上述4个常见耳聋基因的分子检测,初步探讨耳聋基因诊断的临床应用前景。

1 资料和方法

1.1 资料

全部患者收集于2009年1月~2012年2月南京医科大学第一附属医院耳鼻喉科门诊,经详细的病史调查、全身体检以及与年龄相符的听力学测试,临床诊断为原因不明的、双侧非综合征型感音神经性耳聋者作为本研究对象。有明确致聋原因者如梅尼埃病、听神经瘤、全身疾病致聋、感染性聋、外伤性耳聋、噪音性聋、老年性聋等,以及原因不明的单耳聋、突发性耳聋和听神经病患者均排除在本研究之外,但氨基糖甙类药物接触史和耳聋家族史不作为排除标准。

符合入选标准者共200人,均为汉族,男94例,女106例,年龄1~32岁,平均年龄(11.6±2.3)岁。听力学测试显示为双耳对称或基本对称的感音神经性听力损失,其中181例为重度以上耳聋,19例为中度听力下降;语前聋122例,语后聋78例。

本项目分子实验得到南京医科大学伦理委员会伦理认证认可。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

经患者知情同意后,抽取外周静脉血3~5 ml,EDTA抗凝。所有血样用小量基因组DNA抽提试剂盒提取DNA(北京天根生物公司),定量鉴定,保存于-20℃备用。

1.2.2 基因芯片检测

采用晶芯九项遗传性耳聋基因检测试剂盒(北京博奥生物有限公司),通过芯片杂交、扫描及数据分析,对与中国人耳聋相关的常见基因GJB2、SLC26A4、mtDNA 12S rRNA、GJB3共9个突变位点进行检测,方法如下。

PCR反应:将针对9个突变位点的9组引物分

成A和B 2个反应体系,分别进行多重PCR,在每个20 μl反应体系中加入模板DNA 3 μl(浓度100~150 ng/μl)、扩增引物混合物12.5 μl和扩增试剂混合物4.5 μl。PCR反应条件:37℃ 10 min、95℃ 15 min、96℃ 1 min 预变性,94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 45 s共32个循环,70℃ 45 s、60℃ 10 min。

杂交与扫描:将PCR产物加热至95℃变性5 min后,立即浸入冰水混合物中冰浴3 min。从同一个样品模板的两个不同的扩增体系管(A、B)中各取PCR产物2.5 μl加入10 μl杂交缓冲液管中。将杂交混合液加到芯片的微阵列区域,然后放入50℃预热水浴中保温1 h。取出杂交芯片,于42℃分别在洗涤液I、II中振荡洗涤2 min,进行洗片、晾干。

结果判定:用晶芯LuxScan 10K-B阵列芯片扫描仪进行芯片扫描,并用晶芯遗传性耳聋基因检测芯片判读系统进行信号读取及结果分析。

1.2.3 PCR/DNA测序分析

对基因芯片筛检为阳性结果的病例,进行突变位点区域的测序验证;同时对芯片检测为GJB2和SLC26A4单杂合突变者,进行相应基因的全序列测定分析。参考文献[5]进行常规PCR反应,扩增产物送上海英骏生物技术公司测序。

1.2.4 CT检查

对SLC26A4基因突变阳性的患者进行颞骨高分辨率CT扫描。前庭导水管扩大的CT诊断标准为:前庭导水管外口与前庭总脚或峡部后中点直径>1.5 mm。

2 结果

2.1 基因芯片筛查及测序验证结果

200例患者中,芯片筛查发现携带上述基因突变者78例(39.0%),其中GJB2基因突变37例(18.5%);SLC26A4突变28例(14.0%);GJB3突变2例(1.0%),均为C538T突变;mtDNA 12S rRNA基因突变11例(5.5%),均有氨基糖甙类药物接触史,其中A1555G突变8例(4.0%),C1494T突变3例(1.5%)。上述芯片筛查结果均为测序所验证,两者符合率100%。

37例GJB2基因突变患者中,芯片筛查可以明确该隐性基因2个突变位点的27例,其中235delC纯合突变17例,235delC/35delG复合突变1例,235delC/299delAT复合突变2例,235delC/176del16复合突变4例,176del16纯合突变2例,176del16/299delAT复合突变1例。只能确定该隐性基因1个

突变位点者10例,分别为235delC杂合突变9例和176del16杂合突变1例。28例SLC26A4基因突变病例中,可以确定2个突变位点者19例;IVS7-2A>G纯合突变18例,IVS7-2A>G/A2168G复合突变1例;只能确定1个突变位点者9例,均为IVS7-2A>G杂合突变(表1)。

37例GJB2基因突变阳性患者共含有64个突变等位基因,其中235delC 50个(78.13%),是最常见的突变等位基因,其次是176del16和299delAT,分别是10个(15.63%)和3个(4.68%),最少见的是35delG,1个(1.56%)。28例SLC26A4基因突变病例含有47个等位基因,其中IVS7-2A>G 46个,占97.87%,而A2168G仅占2.13%(表2)。

表1 GJB2/SLC26A4基因突变致聋状态

Table 1 Variation in GJB2 and SLC26A4 genes identified in 200 deafness patients

| 突变位点 | 例数 |
|---------------------|----|
| GJB2 基因 | |
| 235delC/235delC | 17 |
| 235delC | 9 |
| 235delC/299delAT | 2 |
| 176del16/176del16 | 2 |
| 176del16/299delAT | 1 |
| 176del16/235delC | 4 |
| 35delG/235delC | 1 |
| 176del16 | 1 |
| SLC26A4 基因 | |
| IVS7-2A>G/IVS7-2A>G | 18 |
| IVS7-2A>G | 9 |
| IVS7-2A>G/A2168G | 1 |

表2 GJB2及SLC26A4突变等位基因频率

Table 2 The frequencies of patients with the alleles mutations in GJB2 and SLC26A4 genes

| 突变等位基因 | 个数 | 等位基因频率(%) |
|------------|----|-----------|
| GJB2 基因 | | |
| 35delG | 1 | 1.56 |
| 176del16 | 10 | 15.63 |
| 299delAT | 3 | 4.68 |
| 235delC | 50 | 78.13 |
| SLC26A4 基因 | | |
| IVS7-2A>G | 46 | 97.87 |
| A2168G | 1 | 2.13 |

2.2 GJB2及SLC26A4单杂合突变个体基因全序列分析

对芯片检测为GJB2和SLC26A4单杂合突变者

19人进行了相应基因的全序列分析,其中10例GJB2和8例SLC26A4突变者仍仅能检测到1种致病突变,与芯片筛查结果一致。另有1名芯片检测为SLC26A4 IVS7-2A>G杂合突变的患儿,通过SLC26A4基因全部外显子(含剪切位点)序列分析,结果发现其携带IVS7-2A>G和2167C>G两种杂合突变,而其父亲携带IVS7-2A>G杂合突变,母亲携带2167C>G杂合突变(图1)。颞骨高分辨率CT扫描显示该患者的前庭导水管明显扩大(图2),而双亲正常。

2.3 SLC26A4基因变异携带者颞骨CT扫描结果

对携带SLC26A4基因变异的28例患者进行了颞骨高分辨率CT扫描,发现18例IVS7-2A>G纯合突变、1例IVS7-2A>G/C2167G复合突变及1例IVS7-2A>G单杂合突变者前庭导水管均有扩大,其余8例IVS7-2A>G单杂合突变者前庭导水管正常。

3 讨论

鉴于耳聋高度的遗传异质性和技术方面的局限,现阶段对所有已克隆的耳聋致病基因进行分子诊断尚不现实。然而,对中国人耳聋分子流行病学结果证实,2个隐性遗传基因GJB2和SLC26A4在NSHL人群中拥有最高的突变频率^[6],此外,mtDNA 12S rRNA突变在我国NSHL人群中也是热点突变基因之一^[2]。上述结果为耳聋基因诊断迈向临床应用提供了可能性。

GJB2基因编码缝隙连接蛋白26,后者对细胞中钾离子的循环利用起着关键性作用。该基因突变引起缝隙连接蛋白的合成障碍,影响钾离子再循环,最终导致听功能的受损^[7]。研究表明,GJB2突变是导致常染色体隐性遗传性NSHL的最主要病因,在某些人群中的突变频率甚至可高达50%^[8-9];其在高加索人、犹太人以及亚洲人群中最常见的突变形式分别为35delG、176-191del16及235delC^[6]。SLC26A4基因编码跨膜蛋白Pendrin,后者是一种I⁻/Cl⁻转运子,该基因突变引起Pendrin结构和功能的改变,不但是引起大前庭导水管综合征的主要遗传学基础,也是仅次于GJB2的导致NSHL的遗传学因素;该基因常见致病突变为IVS7-2A>G和A2168G^[6]。而mtDNA 12S rRNA基因A1555G和C1494T突变不但与NSHL有关,而且也是氨基糖甙类药物致聋的主要分子基础^[2]。

近年来,北京博奥生物有限公司研制的晶芯九

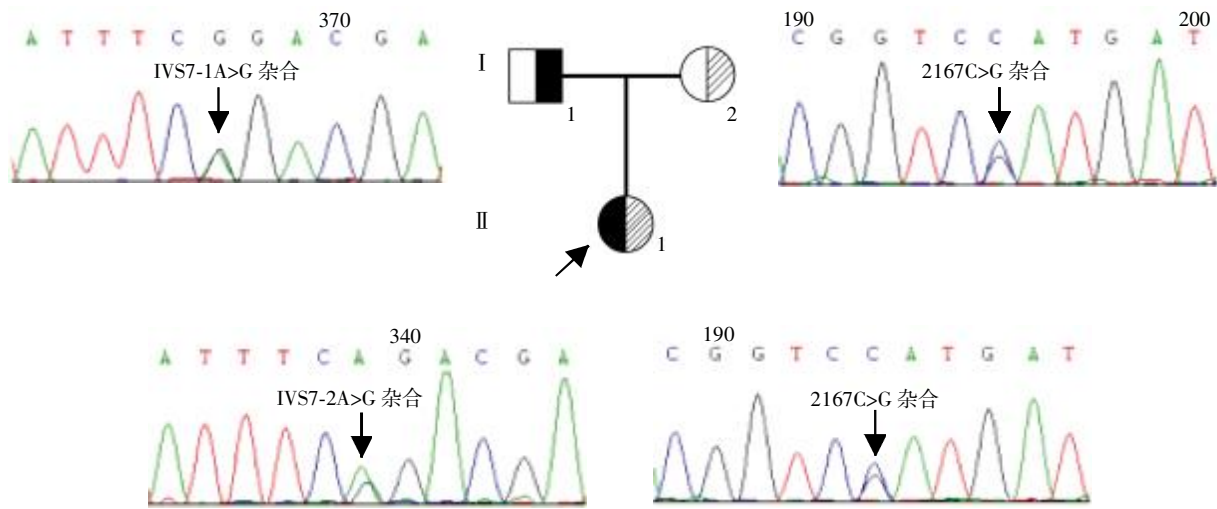


图1 1例携带 SLC26A4 基因突变的家系图及杂合突变的序列分析结果

Figure 1 Pedigree of a family with SLC26A4 gene mutations and the sequence of heterozygous SLC26A4 gene mutations

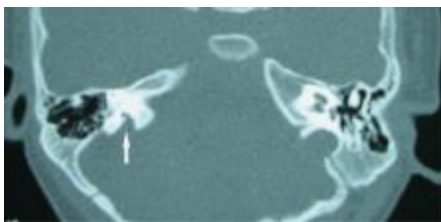


图2 颞骨 CT 显示前庭导水管扩大

Figure 2 Temporal bone axial computed tomography(CT) scan shows enlarged vestibular aqueduct

项遗传性耳聋基因检测试剂盒已在国内少数医疗中心应用,为快速诊断遗传性耳聋提供了极大的便利。该试剂盒检测指标包括国人4个常见耳聋基因(GJB2、SLC26A4、mtDNA 12S rRNA 和 GJB3)的9个突变热点,初步的经验表明,其可对先天性耳聋、大前庭导水管综合征、药物性耳聋等的致病原因进行快速、准确的诊断^[10-12]。该技术大大简化了耳聋基因诊断的程序,在耳聋临床病因学诊断中显示了良好的应用前景。

我们自2009年1月开始将基因芯片技术用于临床NSHL患者基因突变的检测^[13],迄今在经过全面评估排除了已知环境因素致聋的200例门诊患者中,发现有高达39.0%(78例)的患者携带常见耳聋基因突变,4个基因按突变频率由高到低排列依次为GJB2(18.5%)、SLC26A4(14.0%)、mtDNA 12S rRNA(5.5%)和GJB3(1.0%)。如果排除19例GJB2和SLC26A4单杂合突变者,则该组患者中经芯片检测可以明确为遗传因素致聋者达59例,换

言之,近30%的原因不明的门诊NSHL患者有遗传因素参与,提示基因检测在耳聋病因学诊断中具有不可忽视的地位。如能在明确致聋基因的基础上,针对性地开展遗传咨询和产前干预,则可望大大降低我国耳聋出生缺陷及氨基糖甙类药物性耳聋的发生率。

本研究再次证明了GJB2和SLC26A4突变是导致我国NSHL最常见的遗传学病因^[14],而两基因的235delC和IVS7-2A>G突变在所有受检位点中拥有最高的等位基因频率。已知高加索人中最常见的GJB2突变是35delG^[6],而本组人群中仅发现1例35delG突变携带者,且为35delG/235delC复合突变,提示在不同种族间GJB2基因的突变热点具有差异性。

显然,现有的耳聋基因诊断芯片仍有其局限性。一方面,由于没能覆盖所有NSHL的致病基因,致使约1/3的遗传性NSHL患者不能据此明确致病原因,因此,今后有必要进一步加强耳聋分子流行病学研究,在此基础上开发出更完善的耳聋基因检测芯片或检测技术,以更好地服务于临床需求。另一方面,现有的基因芯片仅包括了4个基因的9个突变热点,少数由上述基因的少见或罕见突变致聋的患者应用此芯片易被漏检,导致假阴性。如本组1例患者应用基因芯片检测出SLC26A4 IVS7-2A>G杂合突变,据此结果只能认定其为该致病基因携带者,而通过对该患者进行SLC26A4基因全部外显子序列的分析,发现其为IVS7-2A>G与2167C>G双重杂合突

变,对其父母的 SLC26A4 基因相关位点检测,证实他们分别是 IVS7-2A>G 与 2167C>G 突变携带者,结合临床表现,能够予以分子诊断。由此提示,对芯片检测为单杂合突变的耳聋患者,有必要进行相应基因的全序列分析,以寻找可能存在的其他致聋突变位点。

[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] 赵 辉, 杨伟炎, 管敏鑫. 线粒体 DNA 突变与氨基糖甙类药物性聋的研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2005, 3 (2): 144-149

[3] 刘学忠, 欧阳小梅, Yan D, 等. 中国人群遗传性耳聋研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(2): 81-89

[4] 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 A1555G 突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 1(1): 1-5

[5] Lu Y, Dai D, Chen Z, et al. Molecular screening of patients with nonsyndromic hearing loss from Nanjing city of China[J]. J Biomed Res, 2011, 25(5): 309-318

[6] Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment; which one should be analyzed in DNA diagnostics? [J]. Mutat Res, 2009, 681(2-3): 189-196

[7] Park HJ, Hahn SH, Chun YM, et al. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss[J]. Laryngoscope, 2000, 110(9): 1535-1538

[8] Coyle B, Reardon W, Herbrick JA, et al. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(7): 1105-1112

[9] Estivill X, Fortina P, Surrey S, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness[J]. Lancet, 1998, 351(9100): 394-398

[10] 王国建, 戴 朴, 韩东一, 等. 基因芯片技术在非综合征性耳聋快速基因诊断中的应用研究[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(1): 61-66

[11] 张 华, 刘宇清, 王幼勤, 等. 遗传性耳聋基因芯片检测及其临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 23(22): 1032-1035

[12] 梁 爽, 孙喜斌, 韩 睿, 等. 非综合征型聋患者耳聋相关基因检测结果分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 19(1): 10-13

[13] 张 艳, 卞颖华, 许鹏飞, 等. 应用基因芯片技术检测非综合征型耳聋基因突变[J]. 生物技术通讯, 2010, 21 (1): 22-26

[14] Yuan Y, You Y, Huang D, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China[J]. J Transl Med, 2009, 7: 79

[收稿日期] 2012-07-16

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³, 30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)