

## 一个遗传性耳聋伴前庭功能障碍家系的分子病因学研究

吴玲心<sup>1</sup>, 鲁雅洁<sup>2</sup>, 魏钦俊<sup>2</sup>, 邢光前<sup>1</sup>, 陈智斌<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学生物技术系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:对 1 个遗传性耳聋伴前庭功能障碍家系进行遗传方式、表型特征及致病基因的分析,以研究其分子病因。方法:对门诊 1 例遗传性聋伴眩晕患者进行家系调查、病史收集及相应的听力学和前庭功能检查。利用目标基因捕获和大规模平行测序技术,对家系先证者进行可能致病突变筛查,包括靶向 104 种与遗传性听力损失相关的基因和 3 个 microRNA 分子。进一步对获得的候选突变基因进行编码区序列验证分析。结果:目标基因捕获测序结果发现先证者 COCH 基因第 11 外显子上存在 c.1458C>G(p.T352S)的杂合突变。进一步对家系中所有患者和有血缘关系的正常个体进行了遗传共分离分析,发现该杂合突变在该家系中仅有 I<sub>2</sub>、II<sub>1</sub>、II<sub>5</sub>、II<sub>9</sub>、II<sub>13</sub> 和 IV<sub>1</sub> 存在相同的杂合突变,而 II<sub>11</sub> 和 III<sub>1</sub> 表现为该突变的纯合子,表明该杂合突变不存在共分离现象,因此可以排除其为该家系致病突变的可能性。对先证者 III<sub>14</sub> COCH 基因全部 12 个外显子的序列测定结果未发现其他突变。结论:此家系为常染色体显性遗传性非综合征型耳聋伴前庭功能障碍,但初步筛查结果未发现已知耳聋相关基因,包括 COCH 基因的可疑致病突变。因此,该家系的分子病因可能存在一新基因的突变。

**[关键词]** 耳聋;前庭;COCH 基因;突变

**[中图分类号]** R394.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-340-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160317

## Analysis of gene mutation in a hereditary hearing loss family associated with vestibular dysfunction

Wu Lingxin<sup>1</sup>, Lu Yajie<sup>2</sup>, Wei Qinjun<sup>2</sup>, Xing Guangqian<sup>1</sup>, Chen Zhibin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the molecular etiology of a hereditary hearing loss family associated with vestibular dysfunction by analyzing genetic pattern, phenotypic characteristics and pathogenic gene. **Methods:** Clinical data (medical history, audiological and vestibular function examination, as well as imaging examination) were collected. By target gene capture and massively parallel sequencing technologies, 104 species and genes related to hereditary hearing loss and 3 microRNAs in probands of the pathogenic mutation were screened. Furthermore, we analyzed the gene coding region sequence of candidate mutations. **Results:** C.1458C>G (p. T352S) heterozygous mutations were found in the exon 11 of the COCH gene. I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>5</sub>, II<sub>9</sub>, II<sub>13</sub> and IV<sub>1</sub> showed the same heterozygous mutation. II<sub>11</sub> and III<sub>1</sub> showed that the mutation was homozygous for this mutation, which means that there was no cosegregation, therefore, the possibility of pathogenic mutation in the family could be eliminated. No other mutations were found in the sequence of all 12 exons of the III<sub>14</sub> COCH gene. **Conclusion:** This family has an autosomal dominant disorder associated with vestibular dysfunction. However, the initial screening results were not found to be associated with the known deafness genes, including the COCH gene. Therefore, the molecular etiology of this family may be a new gene mutation.

**[Key words]** deafness; vestibule; COCH gene; mutation

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03): 340-344, 364]

**[基金项目]** 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: czbnj@163.com

遗传性非综合征型耳聋约占所有遗传性听力损失的 70%,并以听力下降为唯一表现。近年来随着人类基因组计划的完成,遗传性耳聋相关基因的研究也随之快速进展,迄今共有 134 个基因座和 80 个

基因被证实与非综合征型耳聋相关<sup>[1]</sup>。但在这些基因中,证实与耳聋伴前庭功能障碍相关的基因为数不多,仅包括 COCH、POU3F4、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 基因等<sup>[2-4]</sup>。COCH 基因是人类发现的第 1 个可导致常染色体显性遗传性非综合征感音神经性耳聋(DFNA9)伴前庭功能障碍的基因,患者可出现一系列耳蜗、前庭功能障碍症状<sup>[5-6]</sup>。POU3F4 基因是第 1 个被发现的遗传性非综合征型耳聋相关基因,POU3F4 基因突变可导致后天进行性听力下降伴平衡功能障碍,呈 X-连锁隐性遗传。而 SLC26A4 基因突变可引起大前庭水管综合征,表现为常染色体隐性遗传。线粒体 DNA 12S rRNA 基因突变与氨基糖甙类药物致聋有关,呈母系遗传特征。

新一代测序技术(next-generation sequencing technology,NGS)的发展为探索单基因病提供了新途径<sup>[7-8]</sup>。应用 NGS 技术对遗传性耳聋患者的耳聋相关基因组进行目标区域的捕获测序,结合相应的生物信息学分析,就可以捕获患者可能存在的致病基因的突变信息<sup>[9-11]</sup>。因此,本研究应用商业化的已知耳聋相关基因外显子序列捕获试剂盒(DeafPanelV1.0),靶向遗传性耳聋相关的 104 个基因(包括 COCH、POU3F4、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 基因)和 3 个 microRNA 分子,进行相关突变的筛查。

本研究中,收集了 1 个遗传性聋伴前庭障碍家系(JSNY-055),经系谱和临床表型分析后,首先利用已知耳聋相关基因外显子序列捕获试剂盒对家系先证者进行耳聋相关基因外显子组的捕获测序,进一步对可能相关的 COCH 基因进行了全外显子序列的测序分析,以明确其发病的分子病因。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

家系的先证者来自南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科门诊病例,家系位于江苏省南京市,于 2013 年 8 月由本课题组进行调查。本研究得到南京医科大学伦理委员会的伦理审查通过,所有研究对象均签署了知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床表型鉴定

经知情同意后,首先对所有研究对象进行详细的病史调查,包括耳聋家族史、近亲婚配史、发病年龄、进展、耳毒性药物和噪声接触史等。常规耳科检查,联合全身检查以排除综合征型耳聋。听力学检查包括纯音听阈测试、声导抗、听性脑干反应(audi-

tory brainstem response,ABR)、诱发性耳声发射。影像学检查包括内耳高分辨率 CT 扫描。前庭功能检查为常规眼震电图与冷热试验。

#### 1.2.2 样本采集及 DNA 提取

家系成员各抽取外周静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)抗凝。用基因组 DNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA,方法参照试剂盒说明。用紫外分光光度计进行定量和纯度检测,保存于-20℃备用。

#### 1.2.3 目标区域捕获测序

应用已知耳聋相关基因外显子序列捕获试剂盒,对遗传性耳聋相关基因全部外显子区进行靶向富集,靶向的基因见表 1。

检测及分析流程主要包括:①样本准备及外显子捕获:准备 3~5 μg 基因组 DNA,用自适应高聚焦超声技术将基因组 DNA 随机打断成 150~200 bp 的片段,打断的 DNA 片段进行修复,末端加碱基 A,并接上接头;聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增后进行磁珠纯化,制备杂交文库。文库鉴定合格后的 DNA 片段与 GenCap 耳聋基因捕获试剂盒(GenCap DeafPanel V1)进行杂交。将经过富集的外显子区域 DNA 洗脱下来,PCR 扩增,建成的测序文库。②HiSeq2000 高通量测序:采用 Illumina HiSeq2000 高通量测序系统,主要通过把含有耳聋目标基因组 DNA 的随机片段杂交到含有接头的探针上,对富集到耳聋基因的 DNA 片段通过延长与桥梁扩增,用 4 种末端被封闭的、由不同荧光素标记的碱基进行边合成边测序。此过程覆盖了目标序列碱基中>98%的区域,对碱基位置的检测准确度>99%,平均深度不小于 200X。③数据处理:对比数据库中常见的与耳聋疾病相关的突变热点,找出样本中是否有明确致病的耳聋热点基因突变;过滤掉 dbSNP 基因数据库中的常见单核苷酸多态(single nucleotide polymorphisms,SNP)位点,以缩小可能致病的耳聋基因突变范围;过滤去除千人基因组数据库中出现过的突变位点以及国人 100 人耳聋基因库中出现过的位点,进一步缩小可能致病的基因突变范围。最终确定候选变异。

#### 1.2.4 COCH 基因序列测定

应用 Primer5.0 引物设计软件,针对 COCH 基因编码区外显子序列设计引物,表 2 的 10 对引物覆盖了 COCH 基因编码区和剪切位点序列,引物由北京华大基因合成。以家系成员的基因组 DNA 作

表 1 靶向捕获测序的目的基因  
Table 1 Target gene for target capture and sequencing

分类	基因名	定位	
耳聋相关的核基因	ACTG1、EYA4、MYO6、STRC、ECM1、KRT9、CCDC50、GJB2、	-	
	MYO7A、TECTA、PRPS1、TCOF1、CDH23、GJB3、NF2、TIMM8A、	-	
	FGFR3、GATA3、CLDN14、GJB6、OTOA、TMC1、FGF3、HMX1、	-	
	CLRN1、GPR98、OTOF、TMIE、FOXI1、PABPN1、COCH、GRHL2、	-	
	PAX3、TMPRSS3、FGFR1、GRXCR1、COL11A2、HARS、PCDH15、TRIOBP、	-	
	PROKR2、HGF、CRYM、KCNQ4、PJKV、TRMU、PROK2、MIR96、	-	
	DFNA5、LHFPL5、POU3F4、USH1C、CHD7、DFNB59、DFNB31、MARVELD2、	-	
	POU4F3、USH1G、FGF8、LRTOMT、DIAPH1、MITF、RDX、USH2A、	-	
	IL13、LOXHD1、DSPP、MYH14、SANS、VLGR1、LAMA3、TPRN、	-	
	EDN3、MYH9、SLC26A4、WFS1、HOXA2、KCNQ1、EDNRB、MYO15、	-	
	SLC26A5、WHRN、SIX1、KCNE1、ESPN、MYO1A、SNAI2、SALL4、	-	
	SLC17A8、SALL1、ESRRB、MYO3A、SOX10、FLNA、MYO15A、RPGR、	-	
	FREM1、SIX5、EYA1、ALX3、SEC23A	-	
	耳聋相关的线粒体基因	RNR1	chrM: 601-1680
		TS1	chrM: 7381-7591
CO1		chrM: 5881-7500	
耳聋相关的 microRNA 分子	miR-96	chr7: 129414532-129414609	
	miR-182	chr7: 129410223-129410332	
	miR-183	chr7: 129414745-129414854	

表 2 COCH 基因 PCR 扩增引物  
Table 2 PCR amplification primers of COCH gene

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(°C)
COCH1	FW: GCGAAGCGGACCTGGAAGT	239	62.9
	RV: GGCTGGGAGCGACAAAGAAACA		
COCH2-3	FW: AGCGGGTCTGTCTGTCTCTCT	439	62.6
	RV: AACCTTCGCGCCTTCCTCCTC		
COCH4	FW: CAGGAATGGTATGGAAGGGTA	350	56.2
	RV: CCAGATGGGTAAAGCAGGA		
COCH5	FW: AATAGATACAACCTGGCACT	607	62.1
	RV: TGTAATAGGGTAATGGTGAT		
COCH6	FW: ACTACAATCACCATTACCCTAT	850	57.5
	RV: AACTGCCATCGTCATACAA		
COCH7-8	FW: AATGGCACTCTGTTGTTATGA	528	51.2
	RV: AGGTGATGGATATGCTAATTA		
COCH9	FW: CATTTCACCTTTGTCCCTT	1 251	62.7
	RV: CACCTCCTAGAAGCCTCAC		
COCH10	FW: TGAGTAGCACTACCGTTGA	705	58.7
	RV: AGATAAGAGGCAGTCAGCA		
COCH11	FW: TTTGGACCTCTAAGTGCAGTG	791	56.1
	RV: GATGAGTAGGGCTGCTTTAAC		
COCH12	FW: TCCAGAAATTAGTAAGCAGTT	1 179	51.2
	RV: GAATTTTTACCATATCCTCAG		

为模板,进行 COCH 基因编码区序列的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL, 包括:1×PCR 反应缓冲液,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.25 mmol/L dNTP,0.2 μmol/L 5'端和 3'端 PCR 引物,200~500 ng DNA 模板,1 U

Taq 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 (PTC-200, MJ Research 公司,美国)上进行,反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55~62℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,32 个循环;72℃再延伸 10 min。PCR 产物 4 μL 在 1.5%琼脂糖凝胶电泳,用 100 bp DNA 标记鉴定。

以纯化 PCR 产物制备测序模板,采用双脱氧链终止法在测序仪 (Applied Biosystems 3730, Applied Biosystems 公司,美国)上进行测序。DNA 测序结果与 NCBI 网站公布的 COCH 基因的标准序列 (NG\_008211.2)进行比对,以筛查是否有突变位点的存在。

## 2 结果

### 2.1 家系调查及临床表型

家系图谱见图 1,该家系共 4 代 45 人,男 23 人,女 22 人,其中耳聋患者 9 例,男女性均可发病,无明显性别差异,呈现明显的连续传递现象,患者父母至少有一方为患者,提示该家系为常染色体显性遗传特征。病史特点提示:患者出生时听力正常,5~10 岁时听力开始减退,伴有眩晕、步态失衡。所有患者无明确的耳毒性药物接触史。

所有家庭成员均接受了纯音测听检查,9 例患者被诊断为以感音神经性聋为主的混合性耳聋(表 3)。

I<sub>2</sub>、II<sub>1</sub>、II<sub>9</sub>、III<sub>1</sub>、II<sub>14</sub>、IV<sub>1</sub> 双侧前庭功能丧失, II<sub>5</sub>、II<sub>9</sub>、III<sub>14</sub> 双侧前庭功能低下。

所有听力减退者内耳高分辨率 CT 扫描未见异常。

### 2.2 目标基因靶向捕获测序结果

利用耳聋基因捕获试剂盒,对先证者 III<sub>14</sub> 进行如上耳聋相关基因的变异分析,结果发现 COCH 基因第 11 外显子上存在 c.1458C>G(p.T352S) 的杂合突变,但未见任何已知与耳聋相关基因的变异。对于该突变是否有可能为该家系的致病基因,有待进一步在家系内验证。

### 2.3 COCH 基因测序验证及全外显子序列测定结果

对家系中所有患者和有血缘关系的正常个体进行 COCH 基因 c.1458C>G(p.T352S) 的杂合突变共分离分析(图 2),在家系 I<sub>2</sub>、II<sub>1</sub>、II<sub>5</sub>、II<sub>9</sub>、II<sub>13</sub> 和 IV<sub>1</sub> 检测出与先证者 III<sub>14</sub> 相同的 COCH 基因 c.1458C>G(p.T352S) 的杂合突变,而 II<sub>11</sub> 和 III<sub>1</sub> 则为纯合子突变,表型正常的 II<sub>3</sub> 则为野生型。根据常染色体显性致病基因的遗传特征,患者要成为致病基因的纯合子,其父母应该均为杂合子患者,且纯合子患者的后代应该全部为患者。该家

系中 II<sub>11</sub> 和 III<sub>1</sub> 均为 COCH c.1458C>G(p.T352S) 突变的纯合子,但其父母和子女中均有表型正常的个体,故该突变不符合常染色体显性遗传的传递规律。进一步查询耳聋基因突变数据库(<http://deafnessvariationdatabase.org>) 后发现,COCH 基因 c.1458C>G 属于人类基因组的一种 SNP,无致病性,因此可以排除其为该家系致病突变的可能性。

为进一步确定 COCH 基因与该家系致病的关系,本研究还对先证者 III<sub>14</sub> 进行了 COCH 基因全部编码区和剪接位点的序列测定,结果未发现其他突变的存在,因此可以确定 COCH 基因变异与该家系的致病性无关。

### 3 讨论

耳聋是最常见的遗传异质性疾病之一,大多数遗传性聋是单基因病。迄今所报道的可导致遗传性非综合征型耳聋的相关基因中,COCH 基因是由 Robertson 等<sup>[4]</sup>于 1998 年发现的第 1 个伴前庭功能障碍的常染色体显性遗传非综合征型耳聋相关基因,由此引起的遗传性非综合征型聋称为 DFNA9。

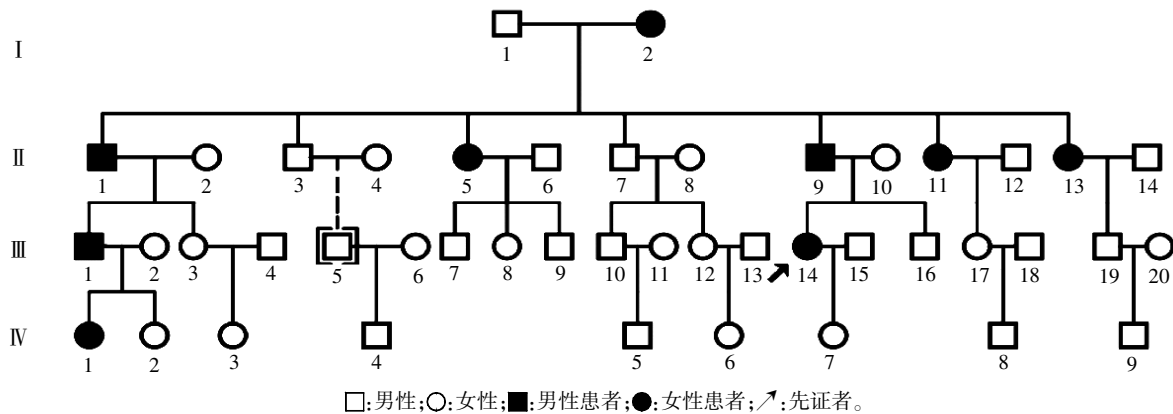


图 1 JSNY-055 家系图

Figure 1 Family tree of JSNY-055

表 3 家系的临床资料

Table 3 Clinical data of family members

成员	性别	发病年龄(岁)	耳毒性药物接触史	纯音测听(dB)		听力下降程度	耳声发射
				右耳	左耳		
I <sub>2</sub>	女	8	无	110	110	极重度	未引出
II <sub>1</sub>	男	6	无	90	80	重度	未引出
II <sub>5</sub>	女	10	无	50	50	中度	未引出
II <sub>9</sub>	男	8	无	80	80	重度	未引出
II <sub>11</sub>	女	9	无	90	90	重度	未引出
II <sub>13</sub>	女	9	无	50	55	中度	未引出
III <sub>1</sub>	女	7	无	60	55	中度	未引出
III <sub>14</sub>	女	5	无	35	35	轻度	未引出
IV <sub>1</sub>	女	4	无	90	90	重度	未引出

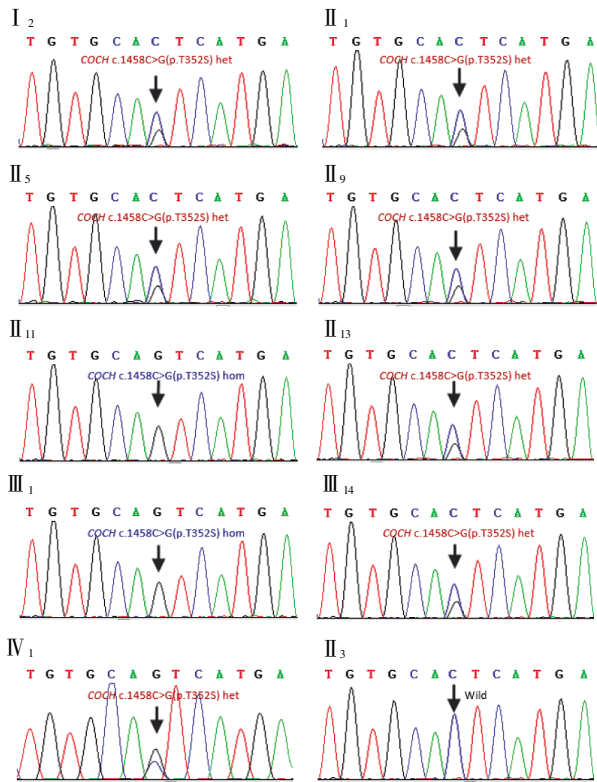


图 2 COCH 基因 c.1458C>G(p.T352S) 突变家系共分离分析  
Figure 2 Total separation analysis of COCH gene c.1458C>G(p.T352S) mutant family

DFNA9 患者有其独特的临床表型,主要表现为伴有前庭症状的常染色体显性遗传非综合征型耳聋,多为家族性发病,而前庭功能障碍程度不一,且并不是所有患者均出现。COCH 突变常导致患者表现为学语后进行性感音神经性听力损失,最初累及高频。随着年龄增长,逐渐波及各个频率,听力可严重受损。前庭症状一般与听力损失同时出现,表现为眩晕、黑暗中平衡不稳、向一侧倒斜、醉酒感,前庭功能检查示前庭功能减退并逐渐丧失。COCH 基因共 2 534 个碱基对,含 12 个外显子,编码由 550 个氨基酸组成的蛋白质 cochlin。cochlin 是一种分泌蛋白,包括 2 种主要结构:1 个含有大量半胱氨酸的区域,也称为 LCCL 区域;2 个与非胶原结构糖蛋白 A 型(vWFA)结构域同源的区域。目前 LCCL 域在蛋白质中的功能尚不完全清楚,而 vWFA 结构域经常存在于各种分泌蛋白中<sup>[12]</sup>。COCH 基因在人类的耳蜗和前庭中高表达,主要分布于螺旋缘、螺旋韧带、耳蜗螺旋板、maculae 和嵴细胞基质中。COCH 基因在内耳的表达部位与 DFNA9 患者颞骨组织病理学发现相符:患者耳蜗、前庭的神经通道和螺旋缘、螺旋板、螺旋韧带嗜酸性黏多糖沉积,神经细胞退化变性和感觉器官不同程度的萎缩。

大量研究表明,不同地区、不同民族的耳聋患者基因突变频率不同,以中国人为例,约 30%左右的遗传性聋患者与 GJB2、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 突变有关,可通过上述耳聋基因筛查以明确诊断。但是,另外约 70%的遗传性聋却无法明确病因,需要进行进一步的遗传分析。新一代测序技术的出现,使得有可能通过高通量的靶向目标序列富集测序技术,检测基因组 DNA 的系列变异,包括 SNPs、碱基的插入和缺失(InDels)。由于该方法只对极少数基因组区域测序,从而可大大降低基因检测的成本,却可以极大提高耳聋个体致病基因突变的检出率,因此已逐渐成为一种新的耳聋致病基因筛查手段<sup>[13-14]</sup>。本研究对 1 个遗传性耳聋伴前庭功能障碍家系(JSNY-055)进行分子病因学的分析研究。根据该家系的病史特点和系谱分析,确定该家系的遗传方式为常染色体显性遗传。患者临床表现为后天渐进性、语后性感音神经性聋,伴眩晕。其后,应用 GenCap 耳聋基因捕获试剂盒,对家系的先证者 III<sub>14</sub> 进行耳聋相关基因的靶向捕获测序,发现 COCH 基因第 11 外显子存在 c.1458C>G(p.T352S)的杂合突变。遗传共分离分析和对 COCH 基因全部编码序列的测定,能够确定 COCH 基因变异与该家系的致病性无关。

综上所述,本研究的结果初步排除了 COCH 基因和其他遗传性耳聋相关基因的突变与 JSNY-055 家系耳聋伴前庭功能障碍发生的关系,该家系是否存在新的耳聋或前庭功能障碍相关基因的致病性变异,有待进一步深入研究。

【参考文献】

[1] Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(10): 1229-1240  
 [2] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening -- a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20): 2151-2164  
 [3] Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment [J]. Ann N Y Acad Sci, 1991, 630(9): 16-31  
 [4] Robertson NG, Lu L, Heller S, et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction[J]. Nat Genet, 1998, 20(3): 299-303  
 [5] De Kok YJ, Bom SJ, Brunt TM, et al. A pro51Ser mutation in the COCH gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss