

· 临床研究 ·

# 一遗传性耳聋家系临床特征分析及候选致病基因的突变筛查

韩慕天,王改改,沈丽燕,王家雄,杨慎敏,程洪波\*

南京医科大学附属苏州医院(苏州市立医院本部)生殖与遗传中心,江苏 苏州 215002

**[摘要]** 目的:分析一遗传性耳聋大家系的听力学特征及对候选致聋基因进行筛查。方法:通过家系调查,整理分析家系资料,绘制系谱图;对家系成员行听力学检测及全身体格检查并抽取外周血。对2例家系患者进行已知致聋基因的全外显子测序及线粒体DNA测序。结果:该家系可追溯6代97人,耳聋患者18例。系谱特征表现为世代连续传递,男女均可发病。家系分支Ⅲ<sub>2</sub>及其后代、Ⅲ<sub>4</sub>、Ⅳ<sub>20</sub>听力学表现为迟发性、渐进性的听力损失,发病年龄均在28岁左右,逐渐加重。Ⅳ<sub>20</sub>子女(V<sub>36</sub>、V<sub>37</sub>、V<sub>38</sub>、V<sub>39</sub>)幼时听力言语正常,3、4岁左右表现出听力损失,非进行性,氨基糖甙类抗生素用药史不详。经纯音测听、声导抗、听性脑干反应、耳声发射等检查,发现该家系患者均表现为中重度感音神经性听力损失(V<sub>10</sub>、V<sub>35</sub>除外,其言语交流正常,听力检测表现为高频感音神经性听力损失)。对该家系进行已知的耳聋致病基因全外显子及线粒体DNA测序结果分析发现Ⅳ<sub>21</sub>及其后代为线粒体DNA A1555G突变携带者,其余患者均无阳性发现。结论:该耳聋家系为一个非综合征型、双耳对称性感音神经性听力损失;初步分子遗传学筛查提示该家系致病基因复杂,可能为新基因突变或多基因协同作用致病。

**[关键词]** 耳聋;听力检测;常染色体显性遗传;家系;目标区域测序

**[中图分类号]** R764.43

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)07-988-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190708

## Clinical and genetic characteristics of a large pedigree with non-syndromic hearing impairment

Han Mutian, Wang Gaigai, Shen Liyan, Wang Jiaxiong, Yang Shenmin, Cheng Hongbo\*

Center for Reproduction and Genetics, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the clinical characters of a large family with non-syndromic hereditary hearing loss, and to find the mutational genes. **Methods:** Clinical and audiological examinations were performed to rule out syndromic hearing impairment, and the inheritance mode of the family was evaluated. The known deafness-associated genes were sequenced by targeted next-generation sequencing. **Results:** The family has 97 members in 6 generations, of whom 18 persons were affected. The mode of inheritance should be autosomal dominant according to the pedigree. Audiograms showed the Ⅲ<sub>4</sub>, Ⅳ<sub>20</sub>, Ⅲ<sub>2</sub> and his offspring of this family were late-onset, progressive non-syndromic sensorineural hearing loss. The age of onset was about 28-year-old. V<sub>10</sub> and V<sub>35</sub> exhibit hearing impairment in high frequencies. Ⅲ<sub>4</sub> and her children (V<sub>36</sub>, V<sub>37</sub>, V<sub>38</sub>, V<sub>39</sub>) showed non-progressive hearing impairment at 3 and 4 year-old. We did not find any known deafness-associated gene mutations by target sequence capture sequencing technology except mitochondrial A1555G mutation in Ⅲ<sub>4</sub> and her children (V<sub>36</sub>, V<sub>37</sub>, V<sub>38</sub>, V<sub>39</sub>). **Conclusion:** Pedigree analysis showed an autosomal dominant hereditary pattern in this family. Hearing loss was congenital, bilateral symmetric, and sensorineural. The known deafness genes seem not contribute to the pathogenesis of the hearing loss in this family, suggesting new gene(s) involvement.

**[Key words]** hearing loss; hearing test; autosomal dominant inheritance; pedigree; targeted whole exome sequencing

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07):988-992]

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(BK20141177);江苏省医学创新团队项目(CXTDB2017013);苏州市男性生殖研究重点实验室(SZ201718);苏州市临床医学专家团队引进项目(SZYJTD201708)

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

遗传性非综合征型耳聋是最常见的感觉神经性遗传病之一<sup>[1]</sup>,根据遗传模式可分为常染色体隐性遗传(DFNB)、常染色体显性遗传(DFNA)、X染色体连锁遗传(DFNX)和线粒体母系遗传。随着新技术的发展特别是全外显子测序技术的应用<sup>[2-3]</sup>,越来越多的新基因被定位克隆,如DMXL2基因<sup>[4]</sup>、NL-RP3基因<sup>[5]</sup>、GPSM2基因<sup>[6]</sup>、DNMT1基因<sup>[7]</sup>、SMPX基因<sup>[8]</sup>、TSPEAR基因<sup>[9]</sup>、KARS基因<sup>[10]</sup>。耳聋大家系是定位克隆耳聋致病新基因的宝贵遗传资源,本课题组对1个DFNA耳聋大家系进行了系谱调查、听力检测及全面的体格检查,并采用目标区域捕获测序技术对目前已知的遗传性耳聋致病基因进行了筛查,初步排除了已知基因致聋的可能。现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本次调查由苏州市立医院生殖遗传中心完成,并得到苏州市立医院伦理委员会的论证批准。该家系位于山东省某市,在所有受调查者签署知情同意后,本项目组对该家系进行了病史采集、听力学检测和全身体格检查,抽取外周静脉血5~10 mL冷冻保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 临床听力学检测

项目组成员携带 Audio tone 便携式听力计对家系成员进行了纯音测听,家系患者还接受了声导抗、听性脑干反应(auditory brainstem response,

ABR)、诱发性耳声发射及颞骨CT的扫描检查。

本研究的听力损失程度诊断参考国际卫生组织(WHO-1997)标准。<20 dB为正常;26~40 dB为轻度;41~55 dB为中度;56~70 dB为中重度,71~90 dB为重度;>90 dB为极重度。

#### 1.2.2 候选致病基因突变筛查

DNA提取:抽取受调查者外周静脉血(EDTA抗凝),用美国 Qiagen 公司基因组 DNA 提取试剂盒抽提 DNA,方法参照试剂盒说明。经 NanoDrop 2000 超微量分光光度计对 DNA 定量和纯度检测,-80 °C 保存备用。候选耳聋基因的筛查:本项目组筛选了先证者 V<sub>13</sub> 及 V<sub>35</sub> 2 例患者进行了检测。根据表型-基因型筛选方法对TECTA 等候选基因进行了测序分析,但候选基因分析法费时费力低效率<sup>[11]</sup>,后期采用目标区域捕获测序技术针对包括38个DFNA基因在内的所有已知的致聋基因进行了筛查。测序仪为美国 Illumina 公司的 Hiseq-2000 测序仪。测序步骤参见 Hiseq-2000 操作手册。

## 2 结果

### 2.1 家系基本资料

系谱图显示,该家系共6代,可追溯的有97人,耳聋患者18例,包括13例男性,5例女性,现存11例(男9例,女2例)。患者年龄最大74岁,最小28岁;该家系5代连续发病,男女均可患病并遗传给后代,符合常染色体显性遗传特征,为常染色体显性遗传病(图1)。

该家系部分成员在28岁以后表现出听力损失,

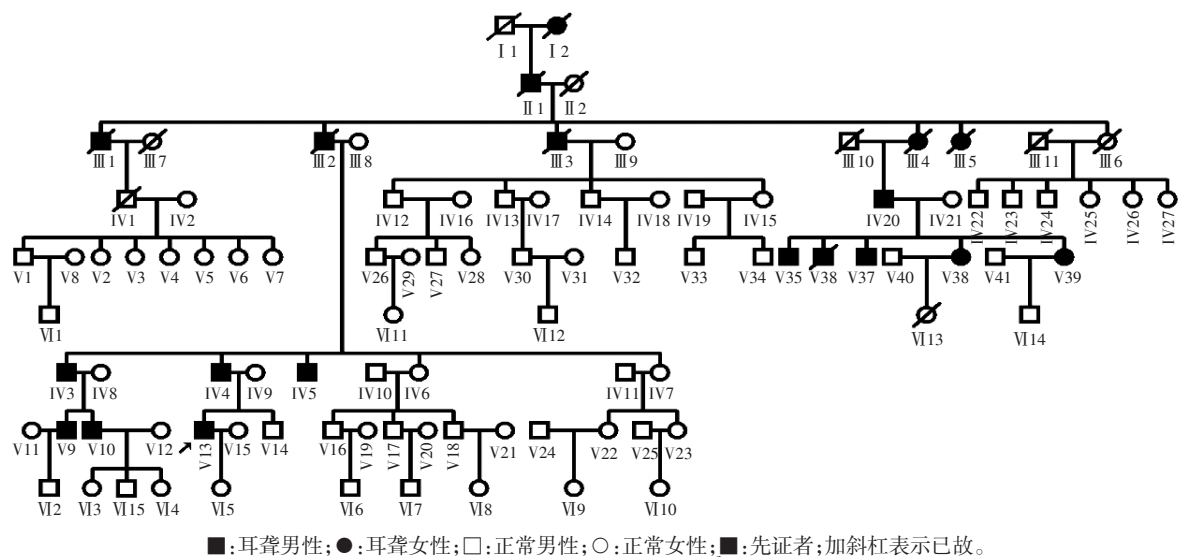


图1 耳聋家系系谱图

Figure 1 The pedigree of the family

进行性加重,无耳鸣,语言功能正常,无明确的氨基糖甙类药物应用史及噪声接触史;临床体格检查未见其他器官系统的异常,故该家系为非综合征型进行性感音神经性耳聋。

2.2 听力学测试结果

对图1中所有患者及其直系亲属均进行了纯音测听,所有配偶、表型正常者及其后代直系亲属听力均正常,11例耳聋患者表现为中重度的双耳对称性、感音神经性听力损失(表1),在排除其他致聋因

素后确诊为遗传聋。颞骨CT扫描示内耳及前庭结构未见异常,全身体格检查未见异常。纯音测听、声导抗、听性脑干反应、耳声发射等检查确认该家系患者(V<sub>10</sub>、V<sub>35</sub>除外)为全频的听力损失,中重度聋,听力曲线为平坦型(图2A、B)。患者V<sub>10</sub>、V<sub>35</sub>,其言语交流正常,听力检测表现为高频感音神经性听力损失,听力曲线为高频陡降型曲线(图2C、D)。

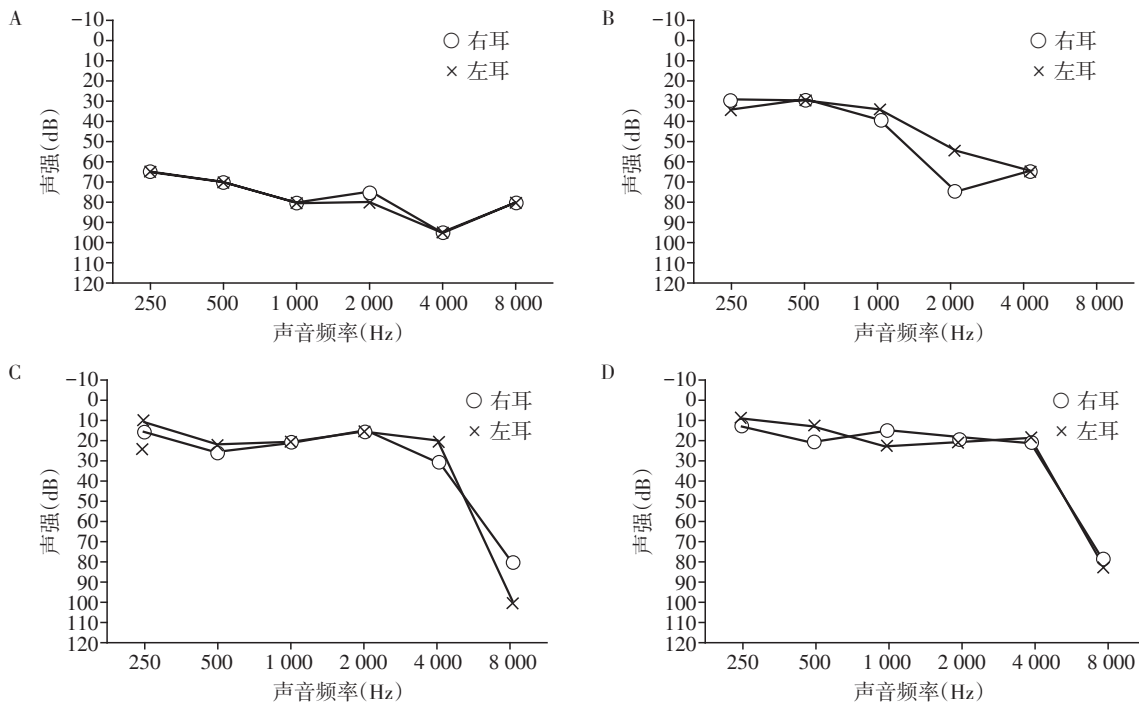
2.3 候选基因突变筛查结果

选择家系先证者V<sub>13</sub>及患者V<sub>35</sub>,然后采用目标

表1 家系患者临床表现

Table 1 The clinical characters of the patients of the family

代系	性别	年龄(岁)	平均听阈(dB HL)		听力损失程度	耳鸣	眩晕
			右耳	左耳			
IV <sub>3</sub>	男	62	80	82	重度	无	无
IV <sub>4</sub>	男	58	82	86	重度	无	无
IV <sub>5</sub>	男	54	74	76	重度	无	无
IV <sub>20</sub>	男	62	86	82	重度	无	无
V <sub>9</sub>	男	45	68	100	中度	无	无
V <sub>10</sub>	男	43	高频听力损失		—	无	无
V <sub>13</sub>	男	36	52	46	中度	无	无
V <sub>35</sub>	男	42	高频听力损失		—	无	无
V <sub>37</sub>	男	38	78	75	重度	无	无
V <sub>38</sub>	女	40	72	83	重度	无	无
V <sub>39</sub>	女	36	88	83	重度	无	无



A:IV<sub>3</sub>,男,62岁;B:V<sub>13</sub>,男,36岁;C:V<sub>35</sub>,男,42岁;D:V<sub>10</sub>,男,43岁。

图2 耳聋患者典型听力图

Figure 2 The audiogram of the patients

区域捕获结合二代测序技术对已知的耳聋致病基因包括常染色体显性、常染色体隐性、X连锁等相关耳聋基因组成的 panel 进行了测序,测序质量以 COL11A2 基因外显子捕获测序质量为代表(图3,基因上一共63个外显子的测序覆盖度都达到了99%以上。各外显子上的平均测序深度,与测序深度中位数均比较接近,说明测序的随机性比较好),测序获得的

数据进行统计学分析后,存在多个错义、同义变异,均为多态性位点,未发现其相关基因存在大片段缺失或重复,未发现非综合征型耳聋相关基因编码区存在可疑致病性突变,从而排除了已知的耳聋致病基因与该家系表型的相关性。同时线粒体全序列测序结果分析发现IV<sub>21</sub>及其子女为线粒体DNA A1555G突变携带者(图4),其余患者均未发现致病突变。

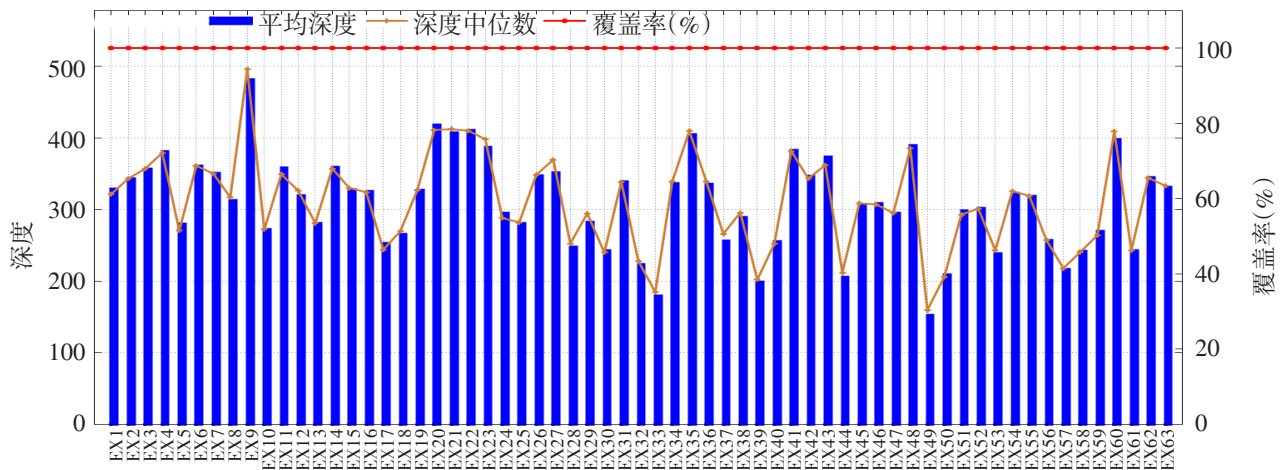


图3 COL11A2 基因外显子捕获测序质量报告图  
Figure 3 The quality of the exons of COL11A2 gene

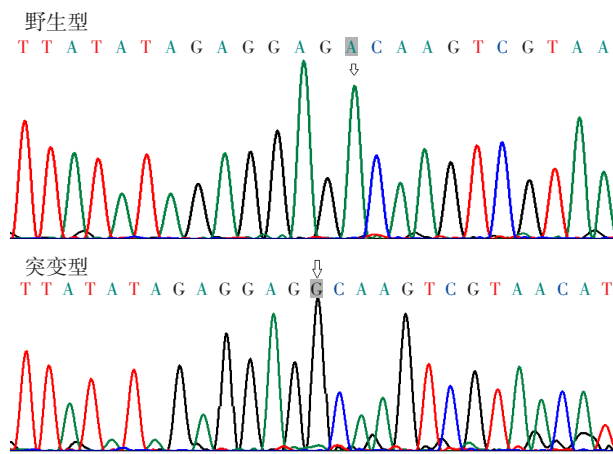


图4 线粒体DNA A1555G突变测序峰图  
Figure 4 The mutation of mitochondrial DNA A1555G

### 3 讨论

通过对家系成员的病史调查和听力学检测发现,该家系的耳聋表型均为双耳对称性、非综合征型耳蜗性中重度听力损失,不伴耳鸣,智力正常。颞骨CT扫描显示内耳结构未见异常。该家系5代耳聋连续传递(第6代年龄尚小未到发病年龄,患病与否不详);耳聋患者双亲中必有一方为患者,男女

发病比例为13:5,但男女均可发病;双亲听力均正常者,子女听力均未见异常。家系系谱遗传特征分析符合孟德尔常染色体显性遗传特征。因此,该家系为非综合征型常染色体显性遗传性耳聋。

截至2018年2月,遗传性耳聋网站([https://hereditaryhearing loss.org/](https://hereditaryhearingloss.org/))报道161个非综合征型耳聋位点,已成功克隆非综合征型耳聋基因112个,包括38个DFNA基因。遗传性耳聋不但具有高度的遗传异质性,而且其表现型与基因型之间存在一定的对应关系,鉴于以往表型-基因型分析的效率低下、费时费力及结果的阳性率不尽如人意,本课题组采用效率更高的目标区域捕获测序技术对已知的常染色体显性致聋基因进行测序,结果未发现致病突变,同时也对该家系进行了常染色体隐性、X连锁等遗传方式致病的已知基因进行了目标区域捕获测序,同样未发现致聋变异,但线粒体测序发现IV<sub>21</sub>及其后代为线粒体DNA A1555G突变携带者,其余患者未见致病变异。线粒体A1555G突变携带者其临床表型具有较强异质性,不论有无应用氨基糖苷类等耳毒性药物,携带者均可发生语前极重度感音神经性聋,亦可终身听力正常<sup>[12-14]</sup>。线粒体



DNA A1555G 是致病机制明确的药物性耳聋突变热点<sup>[15-16]</sup>, IV<sub>21</sub>及其后代携带 A1555G 致病突变, 考虑以下2个原因: ①IV<sub>21</sub>子女为单纯的 A1555G 致聋突变, 其耳聋为线粒体母系方式遗传。IV<sub>21</sub>携带者未接触氨基糖甙类抗生素, 听力未受到药物性损伤。IV<sub>21</sub>丈夫 IV<sub>20</sub>及其婆婆 III<sub>4</sub>可能同 III<sub>3</sub>情况一样, 病史追寻均为 28 岁左右逐渐表现为进行性听力损失, 但听力损失未遗传给后代; ②IV<sub>20</sub>及母亲 III<sub>4</sub>的致聋基因同时传递给了后代 V<sub>36</sub>、V<sub>37</sub>、V<sub>38</sub>、V<sub>39</sub>、V<sub>36</sub>、V<sub>37</sub>、V<sub>38</sub>、V<sub>39</sub>, 同时又遗传了母亲 IV<sub>21</sub>线粒体 DNA A1555G 致病突变, 双基因或多基因复合突变共同作用表现出比 III<sub>2</sub>后代更加严重的听力损失, 其可能存在的进行性听力损失被 A1555G 致聋效应所掩盖, 因此其均表现为 3~4 岁以后重度听力损失。

综上, 针对此临床表型复杂的遗传性耳聋大家系, 我们对已知的耳聋致病基因进行了目标区域捕获扩增测序, 结果未检测到能够解释整个家系耳聋的致病突变, 初步检测结果提示本家系的耳聋可能为新的基因突变或者基因非编码区突变致病, 或者为新的致聋基因和线粒体 DNA A1555G 协同作用。进一步连锁分析结合全外显子组测序技术, 结合功能验证, 有望寻找到该家系新的致病变异或基因协同致病机制。

#### [参考文献]

- [1] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics[J]. *Mutat Res*, 2009, 681(2-3):189-196
- [2] 苏 钰, 汤文学, 代志瑶, 等. 目标序列捕获及平行测序在临床耳聋基因诊断中的应用[J]. *中华耳科学杂志*, 2014, 12(1):45-49
- [3] Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(4):441-450
- [4] Chen DY, Liu XF, Lin XJ, et al. A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss[J]. *Genet Med*, 2017, 19(5):553-558
- [5] Nakanishi H, Kawashima Y, Kurima K, et al. NLRP3 mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(37):E7766-E7775
- [6] 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
- [7] Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(6):595-600
- [8] Schraders M, Haas SA, Weegerink NJ, et al. Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(5):628-634
- [9] Delmaghani S, Aghaie A, Michalski N, et al. Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(17):3835-3844
- [10] Santos-Cortez RL, Lee K, Azeem Z, et al. Mutations in KARS, encoding lysyl-tRNA synthetase, cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB89[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(1):132-140
- [11] 刘金枝, 程洪波, 杨 念, 等. 一常染色体显性遗传性耳聋家系基因的突变筛查及分析[J]. *中华耳科学杂志*, 2013, 11(4):571-574
- [12] Shen SS, Liu C, Xu ZY, et al. Heteroplasmy levels of mtDNA1555A>G mutation is positively associated with diverse phenotypes and mutation transmission in a Chinese family [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(4):907-912
- [13] 魏钦俊, 曹 新, 邢光前, 等. 氨基糖甙类抗生素致聋家系线粒体基因突变的分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2004, 24(6):626-629
- [14] 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 12SrRNA A1555G 突变筛查报告[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(1):1-5
- [15] 赵立东, 王秧菊, 郭维维, 等. 与线粒体 DNA A1555G 突变有关的非综合征型耳聋[J]. *中华耳科学杂志*, 2004, 42(2):59-64
- [16] 张雪溪, 张 杰, 陈 敏, 等. 线粒体 DNA 突变与遗传性耳聋[J]. *中华耳科学杂志*, 2015, 13(3):454-457

[收稿日期] 2018-09-30