

· 基础研究 ·

WFS1 突变致聋家系的鉴定及斑马鱼同源基因时空表达谱分析

黄啸博¹, 陈智斌¹, 曹 新², 魏钦俊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南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:对2个遗传性耳聋家系进行分子病因学鉴定,并应用斑马鱼对致聋基因WFS1进行初步功能分析。方法:利用靶向捕获测序技术,对2个家系进行外显子测序分析,确定候选致病基因。生物信息学预测人WFS1基因的功能以及模式生物斑马鱼与人类WFS1基因的同源性;采用整胚原位杂交和定量PCR法分析斑马鱼wfs1a和wfs1b的时空表达特征。结果:外显子测序及家系遗传共分离分析确定WFS1基因c.2036~2038delAGG(p.680delE)和c.1957C>T(p.653R>C)突变分别是2个家系的分子病因。定量PCR和全胚原位杂交结果显示斑马鱼wfs1a和wfs1b在胚胎发育不同时期呈现不同的时空表达特征。生物信息学分析提示wfs1b与人WFS1基因的进化距离更近,同源性更高。结论:2个遗传性耳聋家系均由WFS1突变所致,拓展了遗传性耳聋的基因突变谱。斑马鱼胚胎发育过程中wfs1a和wfs1b具有明显的时空表达特异性,wfs1b是人类WFS1的直系同源基因。研究结果既为耳聋分子诊断提供了支持,也为后续深入研究WFS1的突变致聋机制奠定了基础。

[关键词] 靶向捕获测序;耳聋;WFS1;斑马鱼;整胚原位杂交;时空表达

[中图分类号] Q344

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)09-1266-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20190902

Identification of deafness - causative mutations of WFS1 in two families and spatio - temporal expression profiles of its homologous genes in zebrafish

Huang Xiaobo¹, Chen Zhibin¹, Cao Xin², Wei Qinjun², Xing Guangqian^{1*}¹Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029;²Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to identify the molecular etiology of two non-syndromic hearing loss families, and to use zebrafish to analyze the function of WFS1 on the occurrence of hearing loss. **Methods:** By using targeted capture sequencing technology, exon sequencing analysis was performed on two families to identify candidate pathogenic genes. The function of human WFS1 gene and the homology of WFS1 gene between zebrafish and human were analyzed by bioinformatics. The temporal and spatial expression characteristics of zebrafish wfs1a and wfs1b were analyzed by whole-embryo *in situ* hybridization and quantitative PCR. **Results:** Exon sequencing and co-segregation analysis of two families suggested that the heterozygous mutation of the WFS1 c.2036~2038delAGG(p.680delE) and c.1957C>T(p.653R>c) was the molecular pathogenesis basis of the pedigree JSNY-021 and JSNY-033, respectively. Quantitative PCR and whole-embryo *in situ* hybridization results showed that zebrafish wfs1a and wfs1b showed different spatio-temporal expression characteristics at different embryonic development stages. Bioinformatics analysis suggested that wfs1b had a closer evolutionary distance and higher homology with human WFS1. **Conclusion:** This study confirmed that the molecular etiology of two autosomal dominant non-syndrome hearing loss families are WFS1 mutations, which expanded the gene mutation spectrum of hereditary hearing loss. The expression of wfs1a/wfs1b in the embryonic development of the zebrafish model has obvious spatio-temporal specificity. Wfs1b is the direct homologous gene of human WFS1. The results of this study not only provide support for the molecular diagnosis of hearing loss, but also lay a foundation for further study on the mutagenesis mechanism of WFS1.

[Key words] target sequencing; hearing loss; WFS1; zebrafish; whole-embryo *in situ* hybridization; spatio-temporal expression

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1266-1273]

[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: xing-gq@163.com

耳聋是人类最常见的感觉障碍性疾病,超过60%的患者是由基因突变造成的^[1]。按照患者有无耳聋以外的症状,可分为综合征型耳聋(syndromic hearing loss, SHL)和非综合征型耳聋(non-syndromic hearing loss, NSHL)2类,其中NSHL以耳聋为唯一症状,有常染色体隐性、常染色体显性、X连锁和线粒体遗传等不同的遗传方式^[2]。据估计,遗传性耳聋中80%是常染色体隐性遗传,其余20%是常染色体显性遗传。常染色体显性非综合征型耳聋(autosomal dominant non-syndromic hearing loss, ADNSHL)具有不同的遗传和临床特征,目前已报道的与ADNSHL相关的基因位点(DFNA)有64个,已鉴定的基因有38个^[3]。其中Wolfram综合征1型(Wolfram syndrome type 1, WFS1)基因突变主要与低频听力损失有关。WFS1基因定位于4p16.1,由8个外显子组成,编码一种由890个氨基酸组成的跨膜蛋白。该蛋白在胰腺、大脑、心脏和肌肉中均有表达,其功能缺失主要与常染色体隐性遗传的Wolfram综合征和低频听力障碍性ADNSHL(DFNA6/14/38)相关^[4]。

本研究利用靶向捕获测序技术,对2个中国ADNSHL家系(JSNY-021、JSNY-033)进行分子病因的探索,鉴定候选致病基因WFS1,利用斑马鱼作为动物模型,比较分析斑马鱼wfs1a和wfs1b与人WFS1基因的同源性,并通过定量PCR和全胚原位杂交技术(whole-mount *in situ* hybridization, WISH)检测斑马鱼早期胚胎不同阶段wfs1a和wfs1b的时空表达谱,旨在为后续深入研究WFS1基因的致聋机制提供实验基础。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 耳聋家系采集

ADNSHL家系(JSNY-021、JSNY-033)由南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科门诊收集,JSNY-021来自江苏盐城,JSNY-033来自江苏镇江。所有患者及其家庭成员均接受耳科学检查和听力学测试,包括纯音测听、声导抗、听性脑干反应和畸变产物耳声发射。详细询问耳聋患者的既往病史,包括听力损失程度、发病年龄、单侧/双侧发病、是否配带助听器、噪声接触史,以及其他相关临床表现。所有家庭成员均采集2 mL 静脉外周血,利用血液基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化公司)分离基因组DNA,测定浓度和纯度后,保存于-20℃备用。同时选取235例正常个体作为对照。本研究经南京医科

大学伦理委员会批准,所有家庭成员均已签署知情同意书,符合赫尔辛基宣言的所有原则。

1.1.2 实验动物

实验用野生型斑马鱼品系均为Tubingen(简称TU)。斑马鱼养殖参考文献[5],实验用胚胎或幼鱼由成鱼配卵孵育获得,收集鱼卵前1 d挑选7~8月龄的成年雌、雄斑马鱼(雄性:雌性=1:2),放置于安装有挡板的配鱼专用缸中,雌、雄斑马鱼用挡板隔开。次日早晨打开光源后,撤除培育缸内的挡板,斑马鱼受光照刺激会出现“追尾”现象,随后雌鱼产卵。将雌雄斑马鱼交配后30 min内产生的受精卵吸出,系统水清洗干净后放入盛有系统水(加美蓝)的培养皿中,置于28.5℃孵箱中,每天更换培养液并移除坏死的鱼卵,直至胚胎发育至所需发育阶段。按Kimmel等^[6]描述的形态特征确定胚胎发育阶段。为方便观察原位杂交结果,超过受精后24 h(24 hpf)的胚胎给予0.003%苯硫脲(PTU)处理防止黑色素形成,收集后的胚胎经固定、脱水后保存于-20℃备用。

1.2 方法

1.2.1 靶向捕获测序及候选突变的鉴定与分析

使用QIAamp DNA Mini试剂盒(Qiagen公司,美国),从2个家系先证者外周血提取基因组DNA,利用遗传性耳聋panel-V3检测平台(北京迈基诺公司),靶向与遗传性耳聋相关的共计181个基因,对先证者进行基因组DNA捕获测序分析。测序结果对比数据库中常见的与耳聋相关的突变热点,找到是否有明确致病的耳聋热点基因突变,进一步筛选后最终确定候选致病基因及其突变位点。

收集2个家系所有可用家族成员静脉外周血,提取基因组DNA,用于Sanger测序。根据靶向捕获测序所鉴定的WFS1基因的2个突变位点,利用GeneTool软件设计PCR扩增引物,引物序列见表1。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,ABI PRISM 3730遗传分析仪进行Sanger测序。所测出的DNA序列与GenBank中人WFS1基因参考序列(NG_011700.1)进行比对以鉴定突变位点。最终根据两个家系患者与正常对照的WFS1基因的测序验证结果,对候选突变进行遗传共分离分析。同时使用PhyloP、Mutation Taster、PROVEAN和SIFT突变有害性分析软件预测2种突变的致病性。

利用在线资源(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)SMART(Simple module architecture research tool)软件分析人WFS1蛋白的结构域。从<http://asia.en->

表 1 WFS1 基因 2 个候选突变验证用 PCR 引物
Table 1 PCR primers for the two suspected variants of WFS1 gene

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物大小(bp)
WFS1_021	上游 TCGTGCTGTTCTGCTGGTTCT	58.5	414
	下游 TGCCACGGTAATCTCAAAC		
WFS1_033	上游 GTCTGTAGTGTGCCCCTGCT	57.7	678
	下游 GATGGTGCTGAACTCGATGA		

sembl.org/分别获取人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、猫(*Felis catus*)、牛(*Bos taurus*)、马(*Equus caballus*)、婴猴(*Otolemur garnettii*)、八齿鼠(*Octodon degus*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、鸡(*Gallus gallus*)和非洲爪蟾(*African clawed frog*)的WFS1蛋白序列,利用CLC Sequence Viewer 6.1软件对WFS1突变进行进化保守性分析。

1.2.2 斑马鱼 wfs1a、wfs1b 基因与人 WFS1 基因的同源性分析及功能预测

从 <http://asia.ensembl.org/> 获取人 WFS1 和斑马鱼 wfs1a、wfs1b 蛋白的氨基酸序列,利用 CLC Sequence Viewer 6.1 软件进行序列比对,并构建系统进化树,以分析比较 wfs1a、wfs1b 蛋白与人 WFS1 蛋白的同源性。应用 STRING(<https://string-db.org/>) 对 WFS1 蛋白的功能及相互作用的蛋白分子进行分析。

1.2.3 定量 PCR 分析斑马鱼不同发育时期 wfs1a、wfs1b 基因 mRNA 表达水平及变化

收集 2 hpf、3~4 hpf、5.25 hpf、16.5 hpf、36 hpf、48 hpf、60 hpf、72 hpf 和受精后 7 d(7 dpf) 共 9 个时期的野生型斑马鱼胚胎各 50 枚(或幼体 15 条),TRIzol 法提取组织总 RNA,定量鉴定 RNA 质量和浓度后反转录成 cDNA。查询斑马鱼 wfs1a 基因 mRNA 序列(XM_690160.9)、wfs1b 基因 mRNA 序列(XM_679418.7),利用 GeneTool 软件合成定量 PCR 引物,wfs1a 上游:5'-TCTGGGGGAATCATTTGGTGTT-3';下游:5'-CCGAAGCAGAACCACAGAGAA-3';wfs1b 上游:5'-GGAAGGGGTAGCAGGGGATGA-3';下游:5'-AGGGCGCTAATCCACTGCATG-3'。以上述 9 个时期的 cDNA 为模板,定量 PCR 检测不同发育时期 wfs1a、wfs1b 基因 mRNA 表达水平及变化。

1.2.4 斑马鱼全胚原位杂交

按照 Thisse 等^[7]的方法进行 WISH 实验。提取斑马鱼胚胎总 RNA,反转录成 cDNA。查询斑马鱼 wfs1a、wfs1b 基因 mRNA 序列,设计斑马鱼 wfs1a、wfs1b 基因的 PCR 扩增引物,wfs1a 上游 5'-CGTTTTGACAGTTACCGTTTC-3',下游 5'-GTAATACGACT-

CACTATAGGGCACATGACC-TACC-CACGTAA-3',划线碱基为 T7 启动子序列。wfs1b 上游 5'-CGTCAATC-TTCTACCAGTCTT-3',下游 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCAAATAGGAAATGGACAAAAC-3',划线碱基为 T7 启动子序列。以 cDNA 为模板,PCR 扩增斑马鱼 wfs1a 和 wfs1b 基因片段,产物大小分别为 550 bp 和 687 bp。产物经切胶纯化后,作为反义 RNA 探针合成模板。

利用 T7 RNA 体外转录试剂盒,体外转录合成反义 RNA 探针。体外转录反应体系:模板 DNA 5.0 μL;5×转录缓冲液 2.0 μL;DTT(0.1mol/L)1.0 μL;DIG-RNA 标记混合液(10×)1.0 μL;RNAsein 0.5 μL;T7 RNA 聚合酶(20 U/μL)0.5 μL。产物经纯化得到 DIG-wfs1a 和 DIG-wfs1b 反义 RNA 探针。

收集斑马鱼 2 hpf、3~4 hpf、5.25 hpf、16.5 hpf、36 hpf、48 hpf、60 hpf、72 hpf 和 7 dpf 共 9 个时期的胚胎各 30 枚,多聚甲醛固定,梯度脱水后-20℃保存备用。原位杂交第 1 天在室温下用 1×PBST 洗去多聚甲醛溶液,将胚胎移入 68℃杂交炉中预杂交 1 h,然后加入 wfs1a、wfs1b 基因反义 mRNA 探针后,68℃杂交过夜。第 2 天洗去多余探针后,加入 anti-DIG-AP 与 wfs1a、wfs1b 基因反义 mRNA 探针结合过夜。第 3 天用 1×PBST 洗去未结合的抗体,再加入 BCIP/NBT 溶液显色,在体视显微镜下观察并拍照。

2 结 果

2.1 家系系谱图及先证者听力纯音测听结果

2 个耳聋家系 JSNY-021 和 JSNY-033 的系谱遗传方式为常染色体显性遗传(图 1A)。家系所有患者听力学检查结果均表现为双侧中度到重度听力下降,呈双侧对称性,诊断为感音神经性非综合征型耳聋。患者年幼时发病,最初主要以低频听力损失为主(图 1B),随着年龄增长,症状呈进行性加重并累及多个频率。所有家庭成员均未出现耳鸣和眩晕症状。

2.2 WFS1 基因突变分析与有害性预测

靶向捕获测序结果如表 2 所示,JSNY-021 和

JSNY - 033 分别检测出 WFS1 基因 c.2036~2038delAGG(p.680delE)和 c.1957C>T(p.653R>C)的杂合突变,Phylop、Mutation Taster、PROVEAN 和 SIFT 4种突变有害性分析软件预测结果提示这2种突变均为致病性突变。遗传共分离分析结果显示 JSNY-021 和 JSNY-033 中,WFS1 基因 c.2036~2038 delAGG(p.680delE)和 c.1957C>T(p.653R>C)突变呈显著的遗传共分离(图 2A),而在 235 例正常人对照中均未检测到 WFS1 基因的上述 2 种类型突变。在线软件 SMART 预测的 WFS1 蛋白的结构域中,p.680delE 突变处于该蛋白的第 9 个跨膜区,而 p.653R>C 则处于相近的未知功能区(图 2B)。CLC Sequence Viewer 6.1 软件对 2 个候选致病突变的进化保守性分析也显示,WFS1 蛋白 p.653R 和 p.680E 在生物进化过程中高度保守(图 2C)。

2.3 人/斑马鱼的 WFS1/wfs1 蛋白序列的同源性比较及生物学功能预测

查询 NCBI,获得斑马鱼 wfs1a 和 wfs1b 基因、人 WFS1 基因所编码的蛋白质氨基酸序列,利用 CLC Sequence Viewer 软件将斑马鱼 wfs1a、wfs1b 蛋白序列与人 WFS1 蛋白序列进行比对,结果显示,斑马鱼 wfs1a 蛋白序列全长为 1 061 个氨基酸,而 wfs1b 蛋白序列全长为 895 个氨基酸,后者更接近人 WFS1 蛋白

(890个氨基酸),经同源比对也提示斑马鱼 wfs1b 蛋白序列与人 WFS1 蛋白序列的同源性比 wfs1a 更高(图 3A)。进一步构建的系统进化树也显示斑马鱼 wfs1b 与人 WFS1 的进化距离更近(图 3B)。

利用 STRING 在线软件分析人 WFS1 蛋白的功能,结果显示 WFS1 蛋白可作为核心蛋白分子,主要与 ATF6 和 EIF2AK3 相互作用形成功能交互(图 3C),而 ATF6 和 EIF2AK3 在细胞内质网应激反应中发挥重要功能,由此可预测 WFS1 蛋白在细胞中可能也主要与内质网应激反应相关,这为后续在体内外研究 WFS1 基因的功能提供了基础。

2.4 斑马鱼 wfs1a 和 wfs1b 基因在胚胎不同发育阶段表达水平及变化

为了分析 wfs1a 和 wfs1b 基因的时空表达模式,本研究选择斑马鱼早期胚胎发育过程中的 2 hpf、3~4 hpf、5.25 hpf、16.5 hpf、36 hpf、48 hpf、60 hpf、72 hpf 和 7 dpf 共 9 个时期进行了定量 PCR 分析。结果显示,斑马鱼 wfs1a 基因在胚胎发育早期(2 hpf~16.5 hpf)表达水平很低,至 36 hpf 时表达水平才显著升高并维持稳定的表达水平。而 wfs1b 基因在胚胎发育早期(2 hpf~5.25 hpf)即有着相对较高的表达水平,直至 16.5 hpf 后表达才显著降低并维持一定的表达水平(图 4)。

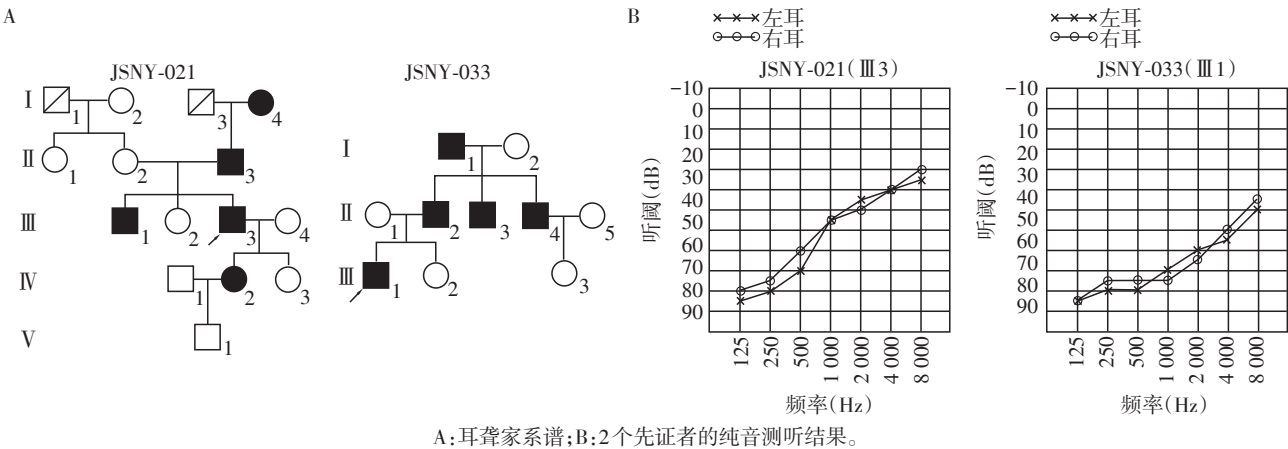
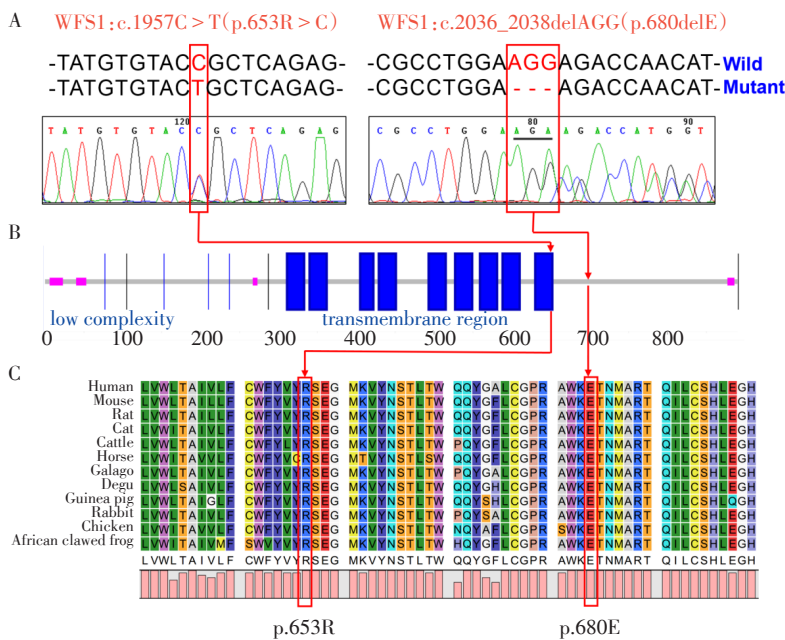


图1 家系 JSNY-021 和 JSNY-033 系谱图及先证者听力纯音测听结果图

Figure 1 Pedigrees of families(JSNY-021,JSNY-033)and pure-tone audiograms of 2 probands

表2 两个家系的 WFS1 基因突变及有害性预测							
Table 2 The mutations and pathogenicity prediction of WFS1 gene in two families							
家系	碱基变异	突变类型	氨基酸改变	Phylop 评分 ^a	Mutation Taster	PROVEAN(评分) ^b	SIFT 评分 ^c
JSNY-021	c.2036~2038delAGG	整码缺失	p.680delE	N/A	DC	—	—
JSNY-033	c.1957C>T	错义突变	p.653R>C	1.107	DC	Deleterious(-3.501)	0.98

a:得分范围从-14分(不保守)到6分(保守);b:阴性和阳性分值分别表示有害和中性,分值为-1.3分;c:评分范围从0分(有害)到1分(中性),分界值设为0.05分;DC:Disease-causing(致病可能)。



A: WFS1 基因 c.2036~2038delAGG(p. 680delE) 和 c.1957C>T(p.653R>C) 突变测序结果; B: 2 种突变位点的蛋白结构域定位; C: 2 种突变位点的进化保守性分析。

图2 WFS1 基因突变的 DNA 测序验证、蛋白结构域定位及保守性分析

Figure 2 Sanger sequencing, protein domain localization and conservation analysis results of the WFS1 gene mutations of the two families



A: 斑马鱼 wfs1a、wfs1b 与人 WFS1 同源比对; B: 斑马鱼 wfs1a、wfs1b 与人 WFS1 系统进化树; C: 在线软件 STRING 预测 WFS1 蛋白功能。

图3 斑马鱼 wfs1a、wfs1b 与人 WFS1 同源性比较及 WFS1 蛋白功能预测分析

Figure 3 Homologous comparison of zebrafish wfs1a, wfs1b and human WFS1, and function analysis of WFS1 protein

2.5 WISH 检测斑马鱼 9 个时期 wfs1a、wfs1b 基因 mRNA 的时空表达

斑马鱼上述 9 个时期的胚胎应用 WISH 法检测 wfs1a 基因的时空表达,结果显示:wfs1a 基因呈非母源性表达,在斑马鱼早期胚胎 2~5.25 hpf 时仅有微弱、弥漫性的表达。直至 16.5 hpf 时期,wfs1a 基因表达水平才有所升高,主要在头部和尾部组织中表达。发育至 36~60 hpf 时,表达水平显著升高并维持稳定(图 5)。而 wfs1b 基因呈现较明显的母源性表达,在斑马鱼 2~5.25 hpf 时期表达水平高,为弥漫性、全身性表达。在 16.5 hpf 期斑马鱼胚胎中,wfs1b 基因在头部神经系统、内耳听囊组织中均可见表达。48~60 hpf 时期 wfs1b 基因在头部神经组织、内耳听囊和侧线系统毛细胞中可见表达。发育至 72 hpf 以后,wfs1b 母源性表达信号明显减弱(图 6)。

3 讨 论

遗传性耳聋具有高度遗传异质性,目前已定位了 150 多个与 NSHL 相关的致病位点,克隆了 90 多个相关的致病基因,其中包括 35 个常染色体显性 NSHL 基因 (<http://hereditaryhearingloss.org>)^[8],许多未知基因仍有待发现。近年来随着新一代测序技术 NGS(next generation sequencing)的发展及其在耳聋研究中的应用,极大推动了遗传性耳聋基因研究的技术进步^[9]。本研究通过商业化的耳聋 panel-V3 检测平台(北京迈基诺公司),靶向 181 个耳聋相关基因的外显子区域进行高通量测序,经一系列数据过滤和生物信息学分析后,从 2 个 ADNSHL 家系鉴定出 WFS1 基因 c.2036~2038delAGG (p.680delE) 和 c.1957C>T (p.653R>C) 突变与患者耳聋表型的相关性。

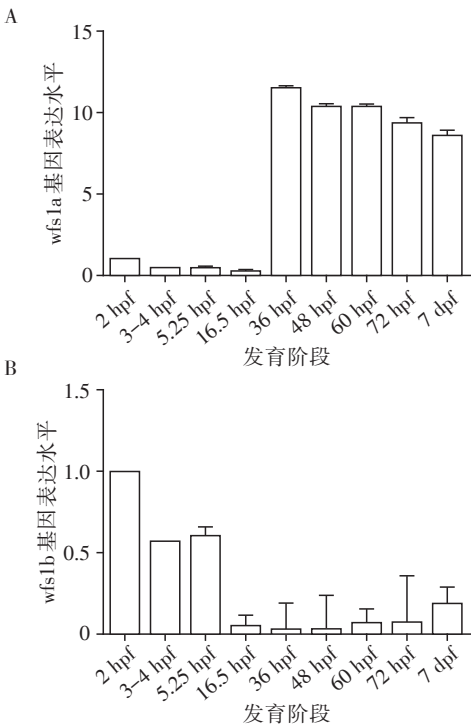
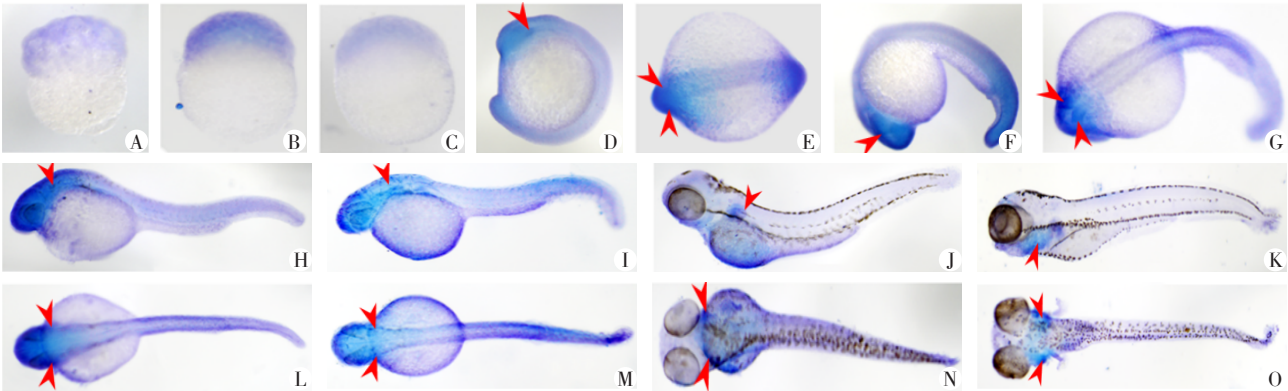


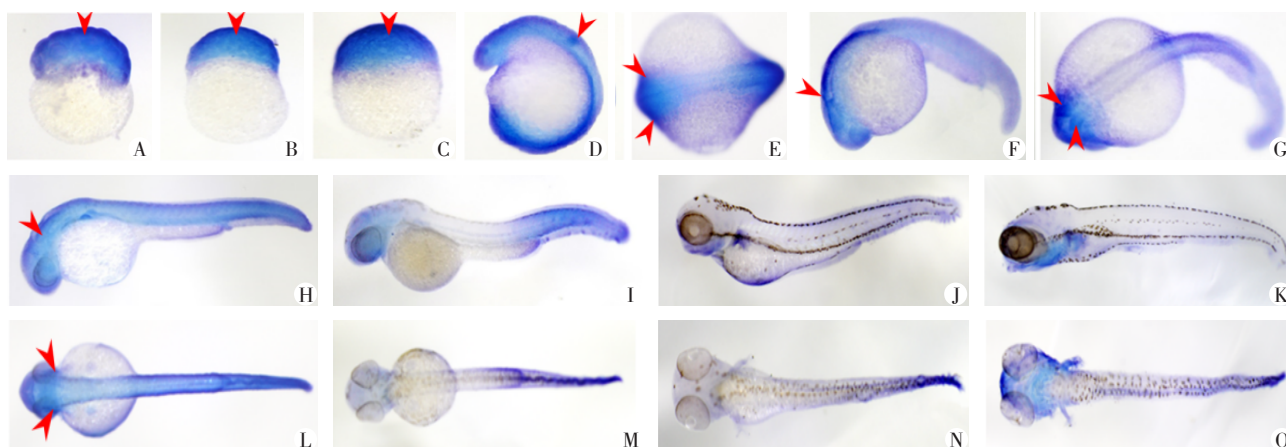
图 4 斑马鱼胚胎不同发育阶段 wfs1a(A)和 wfs1b(B)基因表达水平及变化
Figure 4 Temporal expression of wfs1a(A) and wfs1b(B) in different developmental stages of zebrafish embryos

人类 WFS1 基因共有 8 个外显子,第 1 外显子无编码功能,编码 890 个氨基酸组成跨膜蛋白 wolframin。该蛋白在内质网中组成四聚体,包含 9 个跨膜区域,具有亲水性氨基和羧基末端^[10]。wolframin 主要作为一种膜嵌入蛋白定位于内质网膜,在膜运输、蛋白质加工和内质网钙离子稳态等方面起着重要作用。一旦这些功能发生干扰或过载,就会诱发内质



A: 2 hpf; B: 3~4 hpf; C: 5.25 hpf; D: 16.5 hpf; E: 36 hpf; F: 48 hpf; G: 60 hpf; H: 72 hpf; I: 7 dpf; J: 7 dpf; K: 7 dpf. A~K 均为侧面观。E: 16.5 hpf; G: 36 hpf; L: 48 hpf; M: 60 hpf; N: 72 hpf; O: 7 dpf。E~O 均为背面观。箭头所指为杂交信号较明显部位。

图 5 WISH 检测斑马鱼早期胚胎不同阶段 wfs1a 表达
Figure 5 Expression of wfs1a during embryonic development of zebrafish detected by WISH



A: 2 hpf; B: 3~4 hpf; C: 5.25 hpf; D: 16.5 hpf; E: 36 hpf; F: 48 hpf; G: 60 hpf; H: 72 hpf; I: 7 dpf。A~K均为侧面观。E: 16.5 hpf; G: 36 hpf; L: 48 hpf; M: 60 hpf; N: 72 hpf; O: 7 dpf。E~O均为背面观。箭头所指为杂交信号较明显部位。

图6 WISH检测斑马鱼早期胚胎不同阶段wfs1b表达

Figure 6 Expression of wfs1b during embryonic development of zebrafish detected by WISH

网应激反应,最终可引起细胞凋亡^[11]。WFS1最初被鉴定为常染色体隐性遗传的 Wolfram 综合征 (Wolfram syndrome, WS) 1 型、Wolfram 样综合征 (Wolfram-like syndrome, WLS) 和低频听力障碍型非综合征型耳聋 (non-syndromic low-frequency sensorineural hearing loss, LFNSHL)^[12]。WS 也被称为 DIDMOAD [diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and (nerve) deafness (尿崩症、糖尿病、视神经萎缩和耳聋)], 是一种罕见的常染色体隐性神经退行性疾病。糖尿病和视神经萎缩是 WS 的诊断标准^[13]。到目前为止,仅有 31 种 WFS1 基因的杂合突变被报道可能与常染色体显性遗传的 LFNSHL (DFNA6/14/38) 相关 (<http://deafnessvariationdatabase.org>), 而所有这些已知的 WFS1 突变都倾向于非功能性灭活, 表明这些特定的突变并不完全破坏蛋白质功能。这种基因型和表型的关联提示 WS 是由于 WFS1 功能丧失造成的^[14]。

WFS1 突变导致的 DFNA6/14/38 患者的听力学特征为双侧对称性、低频听力障碍的感音神经性聋, 可进行性加重或无进展, 发病年龄不一, 从习语前到 30 岁均可发生^[15]。本研究中由 WFS1 两种突变所导致的 ADNSHL 家系中, 所有患者均表现为以感音神经性聋为唯一症状的 NSHL, 年幼时发病 (约 7 岁左右), 最初以低频听力损失为主, 随着年龄增长, 听力损失进行性加重并累及多个频率, 但不会发展成严重耳聋。而进一步功能预测提示 WFS1 蛋白可作为核心分子, 与细胞内质网应激反应相关的关键蛋白分子 ATF6 和 EIF2AK3 相互作用形成功能交互, 为后续在体内外水平研究 WFS1 基因的突变致

聋机制提供了方向和策略。

对于已知遗传性耳聋相关基因的致聋机制研究, 目前除了对中国人最常见的致聋基因如 GJB2、GJB3、GJB6 和 SLC26A4 进行了初步研究外, 其他耳聋基因的致病机制研究目前还未能广泛而深入地开展, 其主要原因是耳聋发病机制研究的可用动物模型比较局限^[16]。近年来, 低等脊椎动物斑马鱼被越来越多地作为模式动物应用于脊椎动物内耳发育及功能的研究^[17]。斑马鱼基因序列与人类拥有 87% 的相似性, 斑马鱼的很多突变体和人类基因突变产生的表型相似, 虽然没有外耳、中耳和脊椎动物耳蜗相当的结构, 但具有脊椎动物典型的内耳结构, 且行使着前庭和听觉功能。内耳的毛细胞在结构、功能及分子水平上与哺乳动物的内耳毛细胞非常相似, 进化上某些保守基因的突变在斑马鱼和哺乳动物中会引起毛细胞相同的损伤, 且在分子水平上存在相同的信号通路。此外, 沿斑马鱼的体表侧线系统上的神经丘由毛细胞和围绕在周围的支持细胞构成, 神经丘呈线型排列, 便于进行活体染色和观察检测。相对于鼠类胚胎需在母体子宫内发育, 斑马鱼卵子在体外进行受精, 故斑马鱼胚胎发育的所有时期均可在体外进行研究。加之内耳位于胚胎近表面处, 斑马鱼胚胎早期通体透明, 这就使内耳解剖结构的观察变得简单, 也能直接观察和描述到突变体导致的斑马鱼内耳结构的异常^[18]。

基于如上应用研究的优势, 本研究也首次证实斑马鱼 wfs1b 是人类 WFS1 的直系同源基因, 提示使用斑马鱼 wfs1b 模拟研究人类同源基因 WFS1 的生物学功能及致聋分子机制更为合理。本文获得

wfs1a/wfs1b的时空表达模式,也为进一步利用斑马鱼作为动物模型研究WFS1基因的致聋机制奠定了重要的实验基础。

综上所述,本研究结合靶向捕获与高通量测序技术,在2个ADNSHL家系中鉴定出WFS1基因突变与低频听力障碍性耳聋的相关性,扩展了中国人遗传性耳聋WFS1基因的突变谱。进一步利用斑马鱼作为模式动物,初步发现斑马鱼wfs1b基因是人类WFS1基因的直系同源基因,并获得其在胚胎发育不同时期的时空表达规律,特别在听囊内耳毛细胞和侧线系统中的特征表达,可为后续利用斑马鱼作为动物模型深入研究WFS1基因在胚胎发育中的作用及其突变致聋机制奠定重要的实验基础。

【参考文献】

- [1] Looi LM, Ganten D, McGrath PF, et al. Hearing loss: a global health issue [J]. Lancet, 2015, 385 (9972) : 943-944
- [2] Meena R, Ayub M. Genetics of human hereditary hearing impairment [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2017, 29 (4) : 671-676
- [3] Egilmez OK, Kalcioğlu MT. Genetics of nonsyndromic congenital hearing loss [J]. Scientifica (Cairo), 2016, 2016: 7576064
- [4] Young TL, Ives E, Lynch E, et al. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1 [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(22):2509-2514
- [5] Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio) [M]. 5th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007:231-236
- [6] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stage of embryonic development of the zebrafish [J]. Dev Dis, 2003, 130:121-129
- [7] Thisse C, Thisse B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos [J]. Nat Protoc, 2008, 3(1):59-69
- [8] Meena R, Ayub M. Genetics of human hereditary hearing impairment [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2017, 29 (4):671-676
- [9] Cheng H, Zhang Q, Wang W, et al. Whole exome sequencing identifies a pathogenic mutation in WFS1 in two large Chinese families with autosomal dominant all-frequency hearing loss and prenatal counseling [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2018, 106:113-119
- [10] Lesperance MM, Hall JW 3rd, San Agustin TB, et al. Mutations in the Wolfram syndrome type 1 gene (WFS1) define a clinical entity of dominant low-frequency sensorineural hearing loss [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129(4):411-420
- [11] Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C. Wolfram syndrome and WFS1 gene [J]. Clin Genet, 2011, 79(2):103-117
- [12] Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. Missense variations of the gene responsible for Wolfram syndrome (WFS1/wolframin) in Japanese: possible contribution of the Arg456His mutation to type 1 diabetes as a nonauto-immune genetic basis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(2):612-616
- [13] Tsygankova P, Zakharova EY, Stepina DP. Gene symbol: WFS1. Disease: Wolfram syndrome [J]. Hum Genet, 2008, 123(1):113
- [14] Rigoli L, Bramanti P, Di Bella C, et al. Genetic and clinical aspects of Wolfram syndrome 1, a severe neurodegenerative disease [J]. Pediatr Res, 2018, 84(5):787
- [15] Kobayashi M, Miyagawa M, Nishio SY, et al. WFS1 mutation screening in a large series of Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis [J]. PLoS One, 2018, 13(3):e0193359
- [16] Meena R, Ayub M. Genetics of human hereditary hearing impairment [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2017, 29 (4):671-676
- [17] He Y, Bao B, Li H. Using zebrafish as a model to study the role of epigenetics in hearing loss [J]. Expert Opin Drug Discov, 2017, 12(9):967-975
- [18] Ernest S, Rauch GJ, Haffter P, et al. Mariner is defective in myosin V II A: a zebrafish model for human hereditary deafness [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(14):2189-2196

[收稿日期] 2018-10-17