

常染色体显性遗传性听神经病家系候选致病基因突变筛查*

卢新红¹ 陈睿春¹ 鲁雅洁² 魏钦俊² 陈智斌¹ 曹新² 邢光前¹

[摘要] 目的:了解 DIAPH3 基因以及 25 个已克隆的常染色体显性遗传非综合征型聋(DFNA)基因的已知突变是否与一个中国听神经病家系的发病有关。方法:以一个现存 3 代 9 人的常染色体显性遗传性听神经病核心家系为研究对象,对所有家系成员进行 DIAPH3 基因 5'端非翻译区(5'UTR)的 PCR 扩增,1 例听神经病患者进行 DIAPH3、GJB2 和 GJB3 基因全部编码区以及对其余 23 个 DFNA 基因的 50 个外显子进行 PCR 扩增,扩增产物经纯化后直接测序,筛查致病突变。结果:该家系未发现 DIAPH3 基因 5'UTR 的已知突变 c. -172G>A 和新的致聋突变,对 GJB2、GJB3 基因全部编码区及其余 23 个 DFNA 基因已知突变位点的筛查也无阳性发现。结论:结合前期工作,对照该家系成员 DIAPH3 基因及已克隆的 25 个 DFNA 基因的筛查结果,进一步提示该家系听神经病的发生可能是由新基因所致。

[关键词] 听神经病;DIAPH3 基因;基因突变;常染色体显性遗传

[中图分类号] R764.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2012)10-0455-04

Mutational analysis of candidate genes in a Chinese pedigree with dominantly inherited auditory neuropathy

LU Xinhong¹ CHEN Ruichun¹ LU Yajie² WEI Qinjun² CHEN Zhibin¹
CAO Xin² XING Guangqian¹

(¹Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China; ²Department of Biotechnology, Nanjing Medical University)

Corresponding author: XING Guangqian, E-mail: xing-gq@163.com

Abstract Objective: Three genes including the OTOF, the DFNB59 and the DIAPH3 have been implicated previously in human non-syndromic auditory neuropathy. In this study, we aim to investigate whether DIAPH3 gene or the known deafness loci of 25 cloned autosomal dominant deafness (DFNA) genes contribute to the non-syndromic hearing loss of a Chinese pedigree with dominantly inherited auditory neuropathy (AN). **Method:** Nine members of the kernal pedigree in this family were selected. Genomic DNA was isolated from the peripheral leukocytes of the subjects using the Puregene DNA Isolation Kits. Firstly, the 5'UTR of DIAPH3 gene was PCR amplified in all subjects. Then, the DNA fragments spanning the entire coding regions of DIAPH3, GJB2 and GJB3 genes, and 50 exons in other 23 cloned DFNA genes were amplified using specific primers. Each fragment was purified and analyzed by direct sequencing. The resultant sequence data were compared with the standard sequence to identify deafness-associated mutations. **Result:** PCR amplifications were successfully conducted. We failed to detect the presence either of c. -172G>A mutation in the 5'UTR that have been reported, or any other deafness-associated mutations in the whole DIAPH3 gene, by sequence analysis. We also did not find any known deafness-causing mutations among the 25 cloned DFNA genes. **Conclusion:** The DIAPH3 gene, and the known deafness loci of 25 cloned DFNA genes seem not contribute to the pathogenesis of this Chinese AN family in this study, which suggesting new gene(s) involvement.

Key words auditory neuropathy; DIAPH3 gene; gene mutation; autosomal dominant inheritance

听神经病(auditory neuropathy, AN)因其独特的临床和听力学表现、较高的发病率和危害性而被广泛关注。本病病因学虽不十分明确,但已有的研究显示,它可以涉及免疫、遗传、感染和缺氧等诸

多因素,并与毒性物质代谢性疾病、线粒体疾病和温度敏感性神经病等相关^[1]。随着对其分子病因学研究的深入,遗传因素在 AN 发病中的作用日益受到重视,已证实约 40% 的 AN 患者具有遗传学基础^[1],遗传方式涉及常染色体显性、常染色体隐性、X-连锁和线粒体遗传,该病可独立发生(非综合征型 AN),也可与其他外周神经病伴随存在或先后发生(综合征型 AN)。迄今,国际上已明确 4 个 AN 致病基因,其中,OTOF 基因突变可导致常染

* 基金项目:国家自然科学基金(No:31171217)

¹ 南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科(南京,210029)

² 南京医科大学生物技术系

通信作者:邢光前,E-mail: xing-gq@163.com

染色体隐性遗传非综合征型 AN^[2], DIAPH3 (diaphanous homolog 3) 基因突变导致常染色体显性遗传非综合征型 AN^[3], MPZ 基因突变与综合征型 AN 相关^[4], 而 DFNB59 基因突变可引起常染色体隐性遗传的综合征型和非综合征型 AN 2 种不同的表型^[5]。近年来, 本课题组围绕已收集到的一个常染色体显性遗传非综合征型 AN 家系开展了系统的临床及分子遗传学研究, 先后排除了线粒体 DNA 12SrRNA、OTOF、MPZ 以及 DFNB59 与家系耳聋表型的相关性^[6-9]。为进一步明确该家系是否由已知基因致病, 我们又采用候选基因克隆法, 对最近报道的一个与常染色体显性遗传性 AN 有关的致病基因 DIAPH3 进行了全序列分析, 同时对目前已克隆的 25 个 DFNA 耳聋基因的致病突变位点进行了全面分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

家系共 5 代 38 人(图 1), 7 名耳聋患者集中分布于一个 4 代 11 人(现存 3 代 9 人)的分支家系(核心家系)。现存 6 名患者均呈双耳对称的感音神经性听力损失, 经全身体检及系统听力学检测确诊为非综合征型 AN^[6]。核心家系成员中, 耳聋表型代代相传, 男女均可发病, 结合前期线粒体全序列分析排除母系遗传后, 确定其遗传方式为常染色体显性遗传^[6]。对该家系的分子遗传学研究得到南京医科大学伦理委员会的论证认可和全体家系成员的知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 样本采集及 DNA 提取 取核心家系成员外周静脉血各 5 ml, EDTA 抗凝。用血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取外周血 DNA, 方法参照说明书。DNA 经紫外分光光度计定量和纯度检测, 保存于 -20℃ 备用。

1.2.2 候选耳聋基因的选择及引物设计 在 <http://www.ncbi.nih.gov/> 上查询 DIAPH3 基因组序列及其 mRNA 序列, 应用 Gene Tool 软件, 对其 5'UTR、全部外显子及 3'UTR 序列, 共设计 27 对引物(表 1)。参照 <http://hereditaryhearing-loss.org/> (截止 2011 年 3 月) 已公布的 25 个 DFNA 基因, 同时结合已发表的文献, 进行已知致聋突变的筛查, 对 GJB2 和 GJB3 进行全基因序列分析, 其余 23 个基因共覆盖 50 个外显子约 74 个致病突变位点, 匹配合成了 54 对引物: 41 对引物序列参考发表文献, 余 13 对引物同上软件自行设计(引物序列略)。所有引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 PCR 扩增 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目的片段。反应体系为 25 μl, 其中包括 PCR Master Mix(2×)、DNA 模板、5'端和 3'端 PCR 引物、双蒸水。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 42~52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 34~40 个循环, 72℃ 再延伸 10 min, 采用热启动 PCR 法扩增。2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 bp 的 DNA 标记鉴定。

1.2.4 测序分析 PCR 产物经纯化后, 送北京华大基因科技股份有限公司行序列测定, 测序结果与 <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST> 上提供的标准序列比对分析。

2 结果

2.1 DIAPH3 突变分析

选取 IV₂ 进行 DIAPH3 基因 5'UTR、全部外显子和 3'UTR 的 PCR 扩增, 凝胶电泳分析均可见特异性条带, 部分结果见图 2。全部扩增片段经测序分析, 未发现包括 5'UTR c. -172G>A 致病突变在内的任何有意义的碱基变异(图 3)。随后, 又对核心家系现存所有成员进行 DIAPH3 基因 5'UTR 区域突变检测, 证实致病突变 c. -172G>A 与本研究家系不相关。

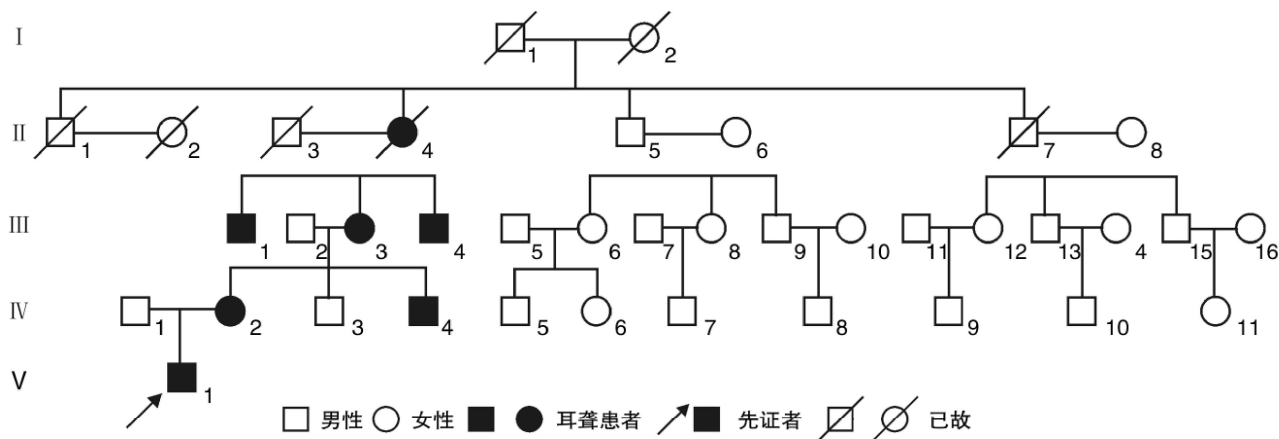
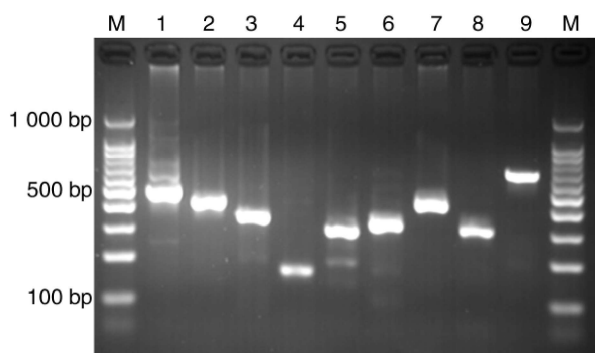


图 1 听神经病家系图谱

表 1 DIAPH3 基因引物序列

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度/bp
5'UTR	GCGCCCCACCTAGCTC	CCGCAAGGCCAATCATGTTT	488
DIAPH3-1	CCACCATTCACCTTACAACCTT	CACGCAGGGTAACTTTTGTC	420
DIAPH3-2	ACCAAAAATGCTTAGAGTTC	GGCCCTCTTTGTTTTTCTC	349
DIAPH3-3	TCGGCAGTATTTTTCAAC	AGGCATTTTAATTGTGTTTT	164
DIAPH3-4	GGCAAAATGAAAAAAGTAT	GCTGCTGTTAGGGAGATTA	297
DIAPH3-5	TGGTGACGGACAAAATACTA	CTGCGTTACTGACAATGTG	313
DIAPH3-6	GCTGCTTAAATATACCTCAAC	CAGCCATGAACTTTTTAGAG	427
DIAPH3-7	TGCAGAGCTTCATAACAAT	GCTGCTTAGGGTATTGACT	305
DIAPH3-8	TGGCTGAGTATTTTGGATTTA	CCTTGAAGTTTACGTTTGTTAC	659
DIAPH3-9	AAGGCAAATATGATGTGAAT	AGTTGTTTGGTGTAGAGTATA	248
DIAPH3-10	GGCGAATAATGTTTTTGTG	AAAGCAAAGTGATGACAAT	450
DIAPH3-11	TTGGGAGTGGGGAGTTAAG	AGCCTTTTTCATTCCAACAT	405
DIAPH3-12	GCTCCCTCACTGTGTTTTTAAT	GGGCCTAGAGAAAGACTGTAAG	328
DIAPH3-13	AGGCATAAATTAATCTCAT	ATGTTCTTAGTTATGTCTCTTAT	444
DIAPH3-14	ACCATTTATTTGCCATTAG	ACCTTAACATCCTGCAGAACT	429
DIAPH3-15	GCAAATAATGAATAATCGGTCTT	GCCCTAACATGGATCTATCT	219
DIAPH3-16	TTGCTTCACTTACAGATTTCTA	CCTTTCTCTCTTTCTCCTTCT	197
DIAPH3-17	TGGCACAGTATAAAAATCCTCTC	GGCTTATTAGGAGGGAGGTTAC	282
DIAPH3-18	CAGGGCTGACATTTAAGA	TGCTGTTTTCTTTTCAATC	323
DIAPH3-19	GTGGAAGTACATACAAATAAA	CTCCCTCCTGTTCTATTTAG	240
DIAPH3-20	TGGTTACACAAAGACATCTA	CGGGCATTTAATATACTCTC	237
DIAPH3-21	GGCCAAAAGGAGAACAAC	GCCCCAAAGCATTACT	395
DIAPH3-22	AAAGCAGCCCATATAAATCT	GCGGGATGAATCACTGGTTA	250
DIAPH3-23	CAGCAGTCTACTAAAATCACAG	CACCATCACCAGTTTTTGTATA	798
DIAPH3-24	GCAATTTTTTCAAGTGTAT	TGCACAGTCCTTGTTAT	398
DIAPH3-25	TGCCTTATGGTCCCCTAGAG	GCCATGCTCTAAACTATAACAC	567
3'UTR	GCACAGTCTATTCTCAGCTTAT	CCAGCACAACATCAAAAAC	580



M:DNA Marker;1~9:样本
图 2 DIAPH3 基因部分 PCR 产物电泳图

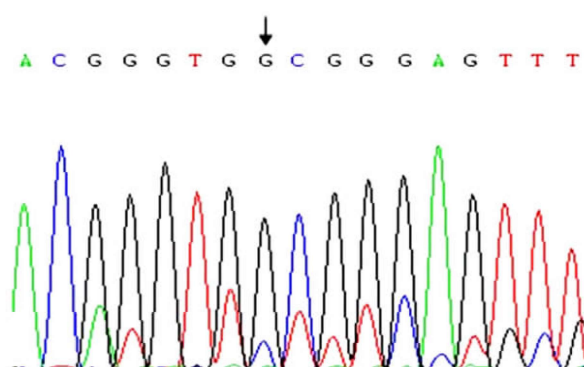


图 3 AN 患者(IV₂)DIAPH3 基因 5' UTR 部分序列, 无 c. -172G>A 突变

2.2 DFNA 基因已知突变位点的筛查

对家系患者 IV₂ 进行 GJB2 和 GJB3 基因全部编码序列及其余 23 个 DFNA 基因共涉及 74 个已知突变位点的基因片断 PCR 扩增,产物经测序分析均未发现有意义的位点突变,从而排除了 25 个 DFNA 基因已知致聋突变位点变异与该家系耳聋表型的相关性。

3 讨论

包括本研究家系在内,国际文献至今共报道了 4 个常染色体显性遗传非综合征型 AN 家系^[6,10-11],其中仅有 1 个家系的耳聋表型最近证实由 DIAPH3 基因 5' UTR 高度保守的 GC 框 c. -172G>A 突变所致^[3],这是首个和至今唯一的与常染色体显性遗传性 AN 相关的致病基因。

DIAPH3位于人类 13q21.1—q21.3, 含有 28 个外显子, 共编码 1 193 个氨基酸。该基因 5' UTR 区 GC 框的高度保守的序列可调节 DIAPH3 基因的转录, 推测 c. -172G>A 突变可能降低了 DIAPH3 基因转录抑制子的结合, 从而导致该基因 mRNA 及蛋白的过表达。DIAPH3 蛋白影响树突棘的功能, 由于螺旋神经节的树突 95% 分布于内毛细胞, 5% 分布于外毛细胞, 当螺旋神经节树突棘存在缺陷时, 起初内毛细胞受的影响更大, 随着时间的推移, 外毛细胞同样也会受累。因此, DIAPH3 基因过表达是通过对内毛细胞突触的直接作用而引起耳聋的。通过对黑腹果蝇的研究亦证实, DIAPH3 突变可导致果蝇听觉器官的声诱发电位下降, 说明 DIAPH3 基因突变可影响听觉器官的功能^[3]。

综合前期研究结果, 本家系是一个十分宝贵的常染色体显性遗传非综合征型 AN 家系。为进一步定位该家系的致病基因, 本文首先采用候选基因克隆法, 对目前惟一的常染色体显性遗传性 AN 致病基因 DIAPH3 进行了筛查, 结果既未发现已知的 c. -172G>A 突变, 也未检测到该基因新的致病位点。结合前期针对该家系患者的线粒体 DNA 12S rRNA、OTOF、MPZ 和 DFNB59 基因的全序列分析均未发现有意义突变^[6-9], 至此, 可排除上述已知 AN 致病基因突变导致本家系耳聋表型的可能性。同时, 基于耳聋具有高度的遗传异质性, 本研究还对目前已克隆的 25 个 DFNA 致病基因的已知突变位点进行了筛查, 其中对 GJB2 和 GJB3 进行全部编码区的序列分析, 也均未检测到已知致病突变。综合上述研究结果, 能够基本确定该 AN 家系中存在新的致病基因。在之前全基因组扫描和连锁分析未能获得有意义结果的情况下(未报道), 课题组拟进一步采取新一代测序技术——外显子组测序, 继续对该家系的致病基因进行定位与克隆, 可望有新的发现。

参考文献

[1] MANCHAI AH V K C, ZHAO F, DANESH A A, et al. The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder(ANSD)[J]. *Inter J Pediatr Otorhinolaryn-*

gol, 2011, 75:151—158.

- [2] VARGA R, KELLEY P M, KEATS B J, et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in otoferlin(OTOF) gene[J]. *Med Genet*, 2003, 40: 45—50.
- [3] SCHOEN C J, EMERY S B, THORNE M C, et al. Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:13396—13401.
- [4] STARR A, MICHALEWSKI H J, ZENG F G, et al. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene(Tyr145→Ser) [J]. *Brain*, 2003, 126: 1604—1619.
- [5] DELMAGHANI S, DELCASTILLO F J, MICHEL V, et al. Mutations in the gene encoding pejkakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy [J]. *Nat Genet*, 2006, 38:770—778.
- [6] XING G, CAO X, TIAN H, et al. Clinical and genetic features in a Chinese pedigree with autosomal dominant auditory neuropathy[J]. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol*, 2007, 69:131—136.
- [7] 徐帅, 邢光前, 曹新, 等. 常染色体显性遗传性听神经病 OTOF 基因突变筛查[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21(16):735—737.
- [8] 周涵, 徐帅, 陈智斌, 等. 常染色体显性遗传性听神经病 MPZ 基因序列分析[J]. *南京医科大学学报*, 2008, 28(24):1113—1115.
- [9] 徐帅, 陈智斌, 鲁雅洁, 等. 常染色体显性遗传性听神经病 DFNB59 基因序列分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(18): 880—882.
- [10] STARR A, ISAACSON B, MICHALEWSKI H J, et al. A dominantly inherited progressive deafness affecting distal auditory nerve and hair cells[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2004, 5:411—426.
- [11] KIM T B, ISAACSON B, SIVKUMARAN T A, et al. A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy(AUNA1) maps to 13q14—21[J]. *J Med Genet*, 2004, 41:872—876.

(收稿日期:2011-10-17)