

基因芯片联合 CT 检查在大前庭水管综合征患者诊断中的临床应用*

周枫¹ 林颖¹ 罗琼¹ 陈小柯² 黄利芬¹ 梁子健¹ 王海涛¹ 于锋¹

[摘要] 目的:探讨基因芯片方法及颞骨 CT 检查诊断大前庭水管的可行性和优越性。方法:选取广州市聋校学生 188 例,采用基因芯片法对 SLC26A4 基因位点进行检测,并对检测出有 SLC26A4 基因突变的 26 例学生行颞骨 CT 影像学检查。结果:检测出的 26 例耳聋患者中 IVS7-2A>G 纯合突变 7 例,杂合突变 17 例,2168A>G 杂合突变 3 例,其中 1 例为 IVS7-2A>G、2168A>G 复合杂合突变。颞骨 CT 检查发现 26 例患者中 25 例确诊为双侧前庭导水管扩大,其中 9 例伴有双侧耳蜗畸形;1 例正常。结论:在 SLC26A4 基因突变中,IVS7-2A>G 位点的突变发生率最高,其次为 2168A>G;CT 检查大多提示为前庭导水管扩大,耳聋基因芯片检测 SLC26A4 基因的热点突变可先于颞骨 CT 检查发现此类患者,用于对耳聋高危人群及产前的筛查,可以做到早期发现,早期诊断,做好防范措施,提前预防语前聋的发生。

[关键词] 非综合征性耳聋;大前庭水管综合征;基因芯片;SLC26A4 基因;颞骨 CT

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1178(2013)19-1073-03

The clinical application of gene chips combined with CT examination in the diagnosis of large vestibular aqueduct syndrome patients

ZHOU Feng¹ LIN Ying¹ LUO Qiong¹ CHEN Xiaoke² HUANG Li fen¹
LIANG Zijian¹ WANG Haitao¹ YU Feng¹

(¹Department of Otolaryngology, Guangzhou Hospital of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Guangzhou, 510620, China; ²Department of Radiology, Guangzhou Hospital of Otolaryngology Head and Neck Surgery)

Corresponding author: YU Feng, E-mail: fishwoo@sina.com

Abstract Objective: To explore the feasibility and superiority of the gene chip method and temporal bone CT in diagnosis of large vestibular aqueduct syndrome. **Method:** One hundred and eighty-eight cases of deaf students in Guangzhou were selected, the microarray detection of the SLC26A4 gene locus was performed, and the 26 cases of students with detected SLC26A4 gene mutations received temporal bone CT imaging. **Result:** Among the detected 26 cases of patients with hearing loss, IVS7-2A>G homozygous mutation was found in 7 cases, 17 cases were heterozygous mutation, 2168A>G heterozygous mutation presented in three cases, including one case of IVS7-2A>G and 2168A>G compound heterozygous mutations. Temporal bone CT findings of 25 cases among the 26 patients showed bilateral large vestibular aqueduct, among which 9 cases exhibited bilateral cochlear malformations, and 1 case was normal. **Conclusion:** Among the different SLC26A4 gene mutations, IVS7-2A>G point mutation rates the highest, followed by 2168A>G. Most of the CT examination prompted the expansion of the vestibular aqueduct. Deafness gene chip hotspot detection of SLC26A4 gene mutations can diagnose such patients before CT examination, which can be used for screening people with high risk of deafness prenatal screening. The early detection and early diagnosis can guide proper precautionary measures in advance to prevent the occurrence of prelingual deafness.

Key words nonsyndromic hearing impairment; large vestibular aqueduct syndrome; gene chip; SLC26A4 gene; temporal bone CT

大前庭水管综合征(large vestibular aqueduct syndrome, LVAS)是前庭水管扩大并伴有感音神经性听力损失,少数患者还伴有眩晕症状。LVAS 是儿童及青少年中较为常见的一种耳聋类型,该病

在患儿出生时可能表现为听力正常或有轻至中重度的听力损失,或又因儿童玩耍、坠床或体育活动中的碰撞或感冒造成明显的听力下降^[1];听力下降程度及发生时间在不同的个体表现差别很大,在我国其发病的普遍性已得到证实^[2-3]。

在基因诊断技术应用于临床之前,颞骨 CT 检查是诊断前庭水管扩大的惟一方法,颞骨 CT 检查提示前庭或内淋巴囊扩大。近年来,国外的多项研

* 基金项目:广东省科技计划粤科规划字[2012]145 号

¹广州市耳鼻咽喉头颈外科医院耳鼻咽喉科(广州,510620)

²广州市耳鼻咽喉头颈外科医院放射科

通信作者:于锋, E-mail: fishwoo@sina.com

究表明 LVAS 与 SLC26A4 基因突变有密切关系。SLC26A4 基因含 21 个外显子,开放阅读框架 2343 bp,编码 780 个氨基酸的蛋白质 Pendrin^[4]。Pendrin 主要由疏水性氨基酸组成,属于离子转运体家族,研究表明其功能主要是与碘或氯离子转运有关^[5]。本研究采用基因芯片联合颞骨 CT 检查对 26 例有 SLC26A4 基因突变的学生进行比较,分析该病在广州地区患者中的分子流行病学特点,探讨上述 2 种方法对该病诊断的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取广州市聋校学生 188 例,男 98 例,女 90 例;年龄 7~18 岁,平均 13 岁。病史资料采集由学生家长填写遗传性耳聋基因检测登记表,以获取耳聋的相关信息,包括患者的一般信息、家族史、个人史(遗传性疾病史、耳毒性药物应用情况、头部外伤史等)、耳聋发病年龄、患者母亲孕期情况等组成。

1.2 检测方法

1.2.1 主要仪器和试剂 血液基因组 DNA 提取系统购自天根生物工程有限公司,晶芯 BioMixer™ II 芯片杂交仪、晶芯 SlideWasher™ 芯片洗干仪、晶芯 LuxScan™10K-B 微阵列芯片扫描仪由北京博奥生物工程有限公司提供。

1.2.2 DNA 提取 采用天根生化科技有限公司生产的《血液基因组 DNA 提取系统(非离心柱型)》(货号:DT319-02),从耳聋患者外周血中提取基因组 DNA,用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,其余保存于一 70℃ 冰箱备用。

1.2.3 基因学检测方法 通过以人基因组 DNA 为模板,采用带有 Tag 标签序列的基因位点特异性引物对相关基因位点所在的基因片段进行扩增和荧光标记,然后与能够识别相应标签序列的通用基因芯片进行杂交。使用 LuxScan™10K-B 微阵列芯片扫描仪和相应的遗传性耳聋基因检测芯片判别系统进行 GJB2 基因、GJB3 基因、SLC26A4 基因、线粒体 12SrRNA 基因突变的检测,操作按试剂盒说明书步骤进行。

1.3 颞骨 CT 检查及诊断标准

对检测出有 SLC26A4 基因突变的 26 例学生行颞骨 CT 影像学检查;颞骨 CT 检查由广州市耳鼻咽喉头颈外科医院影像科完成。扫描条件:听眦线,层厚 1 mm,间隔 1.5 mm,窗宽 3 000,窗位 500;大前庭水管扩大的 CT 诊断标准^[6]:前庭水管外口与前庭总脚或峡部后中点直径 >1.5 mm。

2 结果

26 例耳聋患者 SLC26A4 基因中有 IVS7-2A >G 纯合突变 7 例(图 1a),杂合突变 17 例(图 1b),2168A >G 杂合突变 3 例(图 1c),其中 1 例为 IVS7-2A >G、2168A >G 复合杂合突变(图 1d)。颞骨高分辨率 CT 显示:25 例确诊为前庭导水管扩大,其中 9 例患者双侧前庭水管扩大并伴有 Mondini 畸形。同一例患者的不同断层 CT 扫描结果见图 2a、b;单纯的前庭导水管扩大患者 CT 结果见图 2c。

3 讨论

基因芯片诊断技术是近年来在基因诊断中逐

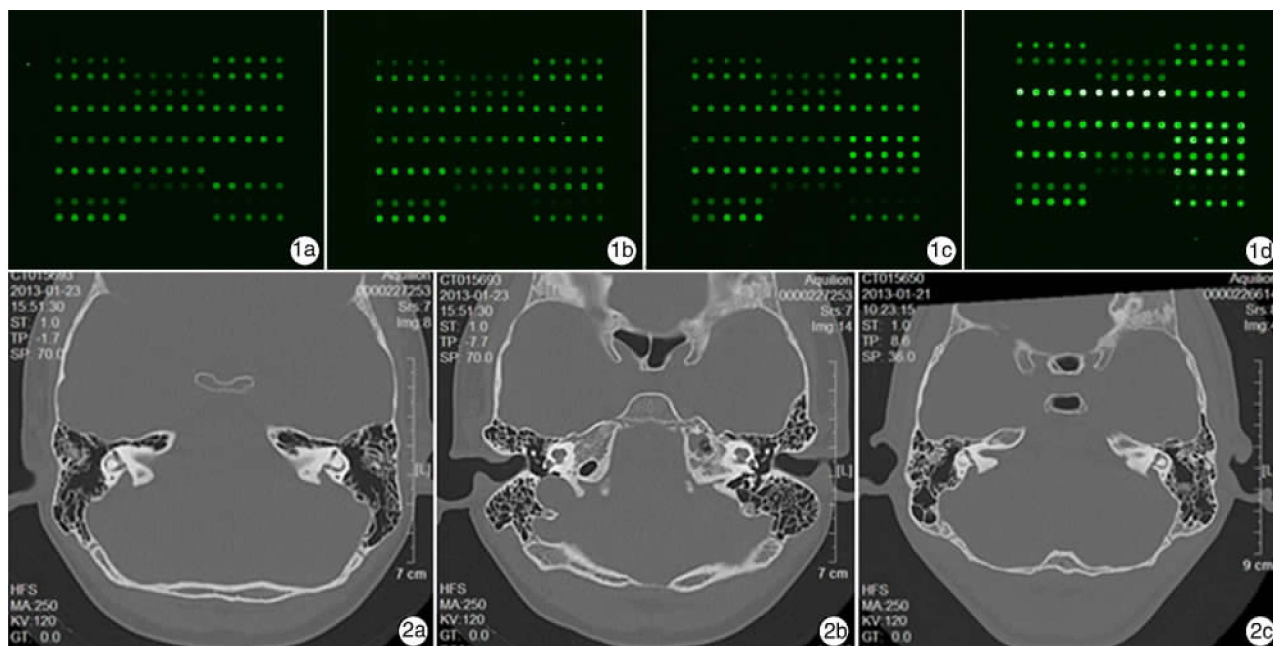


图 1 基因突变检测 1a:PDS(IVS7-2 A>G)纯合突变; 1b:PDS(IVS7-2 A>G)杂合突变; 1c:PDS(2168 A>G)杂合突变; 1d:PDS(IVS7-2 A>G)和(2168 A>G)复合杂合突变。图 2 CT 所示 2a:双侧前庭导水管扩大,呈喇叭口状; 2b:Mondini 畸形:双侧耳蜗中圈及顶圈融合,稍扩大; 2c:双侧前庭导水管扩大,呈喇叭口状

渐得到广泛应用的新兴技术,其原理是将已知探针分子固定在支持物上,与标记的待检测分子进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取待检测分子序列和数量信息^[7]。基因芯片诊断技术是一种高效率、高准确性、低成本的检测方法,已广泛应用于生物科学的众多领域^[8]。

LVAS 与 SLC26A4 基因突变关系密切,在 SLC26A4 基因中,国外报道有 IVS7-2A>G、2168A>G、L676Q、M147V、IVS15+S G>A 和 R40gH 突变,而在中国人非综合征型耳聋中聋病分子流行病学调查显示,主要热点突变是 IVS7-2A>G 和 2168A>G^[9-11]。戴朴等^[12]报道 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 突变是中国人 LVAS 中的高发突变。本研究结果与此报道相一致,以 IVS7-2A>G 突变最为常见,约在 80% 的 LVAS 患者中可以发现此突变^[13],1% 的正常人携带此种突变,因此针对此突变的筛查可以快速地发现 LVAS 患者。

本研究中的 188 例耳聋患者中 SLC26A4 基因的总检出率为 13.83%,高于全国平均水平 12.38%^[14],差异无统计学意义。26 例 SLC26A4 突变基因中 24 例出现 IVS7-2A>G 位点突变,其次是 2168A>G;颞骨 CT 检查发现 26 例患者中 25 例确诊为双侧前庭导水管扩大,其中 9 例伴有双侧先天性耳蜗畸形,又称 Mondini 内耳发育不全,是最常见的一种内耳畸形。1 例为携带良性多态的耳聋患者未发现内耳结构异常,此类携带 SLC26A4 单杂合突变但内耳影像学未表现出异常的耳聋患者病因还有待进一步研究,SLC26A4 基因的不同突变类型是否与不同表型相关,如前庭水管扩大、内耳畸形、Pendred 综合征等表型是否由特有突变引起还有待大规模的研究证实^[15]。

LAVS 患者的发病时间不确定,有的发病时间较晚,通过询问病史,有 1/3 的患儿耳聋发病多与感冒或头部外伤有关。因此,对高危人群检测耳聋基因可尽早诊断 LAVS,早期发现病情,可通过适当的指导和严格的活动限制措施来保护儿童,防止感冒或头部外伤,尽可能使患者发病时间延迟及避免语前聋的发生。

SLC26A4 基因突变筛查为临床开展 LVAS 的基因诊断和产前诊断提供理论依据,新生儿听力筛查结合基因诊断可以提早检测出 LAVS 患者,并可以减少患儿接受放射线辐射的机会,更易为患儿家属接受。基因芯片诊断技术可对大规模耳聋患者进行筛查,做到早期发现、早期预防,还可为遗传咨询与婚育指导提供理论依据及科学手段,从而有效地防止聋儿后代出生。

参考文献

[1] CAMPBELL C, CUCCI R A, PRASAD S, et al. Pen-

dred Syndrome, DFNB4 and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype-correlations [J]. Hum mutat, 2001, 17: 403-411.

- [2] 杨伟炎,张素珍,赵承军,等. 95 例大前庭水管综合征的临床分析[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2003, 38(3): 191-194.
- [3] 刘博,刘中林,廉能静,等. 大前庭导水管综合征的临床特点[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2004, 11(4): 213-215.
- [4] SCOTT D A, WANG R, KREMAN T M, et al. Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4)[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9: 1709-1715.
- [5] 赵亚丽,李庆忠,翟所强,等. 国人前庭水管扩大患者 SLC26A4 基因的特异性突变[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2006, 14(2): 93-96.
- [6] 沈新平,齐旭红,沈比先. 大前庭水管综合征的影像诊断[J]. 中国医学影像技术, 2001, 17(8): 511-513.
- [7] GARDNER P, OITAMAA E, MESSNER A, et al. Simultaneous multigene mutation detection in patients with sensorineural hearing loss through a novel diagnostic microarray: a new approach for newborn screening follow-up[J]. Pediatrics, 2006, 118: 985-994.
- [8] SIEMERING K, MANJI S S, HUTEHISON W M, et al. Detection of mutations in genes associated with hearing loss using a microarray based approach[J]. J Mol Diagn, 2006, 8: 483-489.
- [9] 席宏,张岑娜. 大前庭水管综合征 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(4): 103-106.
- [10] TSUKAMOTO K, SUZUKI H, HARADA D, et al. Distribution and frequencies of PDS(SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese[J]. Eur J Hum Genet, 2003, 11: 916-922.
- [11] 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]. 中国耳科学杂志, 2008, 6(1): 61-66.
- [12] 戴朴,黄德亮,王嘉陵,等. PDS 基因检测-诊断大前庭水管综合征的新方法[J]. 中华耳科学杂志, 2005, 3(4): 241-244.
- [13] 戴朴,韩东一,冯勃,等. 大前庭水管的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(5): 303-307.
- [14] 赵钢涛,杨凡,许茜,等. 基因芯片法检测遗传性耳聋相关基因[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(3): 317-321.
- [15] 袁永一,戴朴,黄德亮,等. 内蒙古赤峰市聋校聋儿 SLC26A4 基因分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(5): 251-256.

(收稿日期: 2013-02-22)