

新疆哈萨克族非综合征型聋 GJB2 基因突变的研究分析*

汪常伟¹ 蔡小牛² 邹广华¹ 铁玲¹ 李彦华¹

【摘要】 目的:研究新疆哈萨克族非综合征型聋患者 GJB2 基因突变的情况。方法:调查对象为来自新疆地区的 193 例哈萨克族患者,采用直接测序法对非综合征型聋患者 97 例和健康对照 96 例进行 GJB2 基因突变的检测。结果:在编码区耳聋组共发现 8 种碱基改变,其中 35 delG 纯和 12 例,79G>A 纯合 5 例,79G>A 杂合 8 例,79G>A 与 608T>C 复合杂合 1 例,79G>A 与 341A>G 复合杂合 5 例,235 delC 杂合 4 例,341A>G 杂合 2 例,439T>G 杂合 1 例,457G>A 杂合 1 例,521G>A 纯合 2 例。对照组发现 4 种已明确的常见多态性碱基改变。结论:本研究提示新疆哈萨克族非综合征型聋患者 GJB2 基因突变具有种族和地域性特点,该地区哈萨克族耳聋人群中 GJB2 有较高携带率,在本研究中 35 delG 为其常见突变方式。

【关键词】 非综合征型耳聋;GJB2 基因;基因突变;哈萨克族

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.10.003

【中图分类号】 R764.43 **【文献标志码】** A

Analysis on GJB2 gene mutations with nonsyndromic hearing impairment in Kazak patients of Xinjiang

WANG Changwei¹ CAI Xiaoniu² ZOU Guanghua¹ TIE Ling¹ LI Yanhua¹

(¹Department of Otorhinolaryngology, Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University, Uygur, 830000, China; ²2011 Postgraduate, Xinjiang Medical University)

Corresponding author: LI Yanhua, E-mail: liyanhua1953@126.com

Abstract Objective: To study mutations in the GJB2 gene in Kazak patients with nonsyndromic hearing impairment from Xinjiang. **Method:** One hundred and ninety-three cases of Kazak from the Xinjiang region, including 97 cases of hearing loss and 96 cases of normal people, were performed mutational analysis of the GJB2 coding region by PCR-direct sequencing. **Result:** Eight kinds of mutation were found in the encoding region of hearing impairment group, 12 cases of 35 delG homozygous, 5 cases of 79G>A homozygous, 8 cases of 79G>A heterozygous, 1 case of 79G>A heterozygous and 608T>C heterozygous, 5 cases of 79G>A heterozygous and 341A>G heterozygous, 4 cases of 235 delC heterozygous, 2 cases of 341A>G heterozygous, 1 case of 439T>G heterozygous, 1 cases of 457G>A heterozygous, 2 cases of 521G>A homozygous. Four kinds of mutations found in the normal group were confirmed as common polymorphic mutation. **Conclusion:** The study suggests that the GJB2 gene mutation of the Kazak deaf population in Xinjiang has ethnic and regional characteristics. There is a rather high carrier frequency of GJB2 mutation of Kazak patients in Xinjiang. In this study the 35 delG mutation is a common mutation of Kazak patients.

Key words nonsyndromic hearing impairment; GJB2; gene mutation; Kazak

耳聋是听觉传导通路发生了器质性或功能性病变而导致不同程度听力损害的总称,是新生儿高发的遗传性疾病之一,约 50% 的儿童期耳聋为遗传性聋^[1]。耳聋严重影响了患儿未来的生活,给家庭社会亦带来沉重的负担。耳聋的致病因素复杂,发病率较高,治疗困难,目前科研工作者从分子水平上对病因的研究已有相当多的成果,现认为先天

性耳聋多为遗传性。在遗传性聋当中,大约 70% 为非综合征型聋(nonsyndromic hearing impairment, NSHI),而其余 30% 为综合征型聋(syndromic hearing impairment, SHI)^[2]。过去诸多综合性研究已表明人群中的遗传性聋中约有 50% 的常染色体隐性遗传聋与 GJB2 基因突变高度相关^[1-3]。

遗传性疾病研究表明:不同人种同一突变形式比较,其发生率差异有时会很大;而不同人种同一基因中占主要地位的突变形式差异也很大^[4]。我国民族众多,民族演化史非常复杂,从古至今长期在新疆生活繁衍的少数民族就有 13 个,哈萨克族

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(No: 2011211A096)

¹新疆医科大学附属中医医院耳鼻咽喉科(乌鲁木齐, 830000)

²新疆医科大学中医学院 2011 级研究生

通信作者:李彦华, E-mail: liyanhua1953@126.com

作为新疆第 2 大少数民族,一定程度上代表了新疆地区耳聋的分子流行病学特征。本研究旨在通过对本地区哈萨克族 GJB2 基因突变的检测来了解新疆哈萨克族 GJB2 基因突变情况,为我国建立更为完整的少数民族耳聋基因库补充更多资料,并为哈萨克族耳聋的基因诊断、咨询提供依据,进而达到防聋治聋、减少耳聋发生率。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集新疆伊犁、木垒、昌吉、阿勒泰地区的哈萨克族耳聋患者 97 例(耳聋组),年龄 1~40 岁,平均(14.3±7.15)岁,进行耳科、听力学和全身检查。对照组 96 例,为听力正常且无耳聋家族史的哈萨克族人,年龄 1~42 岁,平均(16.4±8.89)岁。

1.2 纳入排除标准

参照《眼耳鼻喉科疾病诊断标准》第 2 版^[5]、《实用耳鼻咽喉头颈外科学》第 2 版^[6]。纳入标准:①双侧对称性的以高频听力下降为主的感音神经性聋;②听力障碍或伴有耳鸣;③除外综合征型耳聋。排除标准:①与国外种族联姻家族史者;②有外耳、中耳畸形,存在可能导致传导性聋者(如有急性慢性中耳炎,中耳、外耳手术史);③有其他明确的导致听力下降的原因(如细菌性脑膜炎、迷路炎、累及耳蜗的颞骨骨折等);④有影响听力检测结果的疾病(如:智力障碍者);⑤诊断为进行性聋的患者(如自身免疫性内耳病、梅毒性内耳疾病等)。

1.3 调查方法

由患者本人填写调查问卷表,同时填写知情同意书。对回答不明确者通过预约家属问询或电话联系的方式完善相关信息。调查表涉及患者的基本信息、耳聋史、家族史、出生史、个人史(聋前传染病、耳毒性药物应用情况)等。以上工作,包括对参选对象的遴选由经过培训的专业人员完成。

1.4 GJB2 基因检测

所有参与实验者均抽取静脉血 4~5 ml,EDTA 抗凝,应用试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA,提取步骤参照说明书进行。提取物用 1% 琼脂糖电泳,用核酸定量仪进行纯度和浓度鉴定,分装后-20℃冻存备用。引物设计及所用试剂均来自上海生工工程技术有限公司,目的序列被扩增为 2 个片段:A 片段引物序列:GJB2-F1 5'-ACGATCACTACTTCCCCATC-3', GJB2-R1 5'-CTAGCGACTGAGCCTTGAC-3', 扩增产物为 574bp;B 片段引物序列:GJB2-F2 5'-TCAA-GAGGGTTTGGGA ACTA-3', GJB2-R2 5'-TCT-TCTCATGTCTCCGGTAGG-3', 扩增产物为 529 bp。PCR 扩增体系的配制:在 50 μl 的反应体系中加入 2.5 μl 的基因组 DNA, 2×mix 25 μl, 引

物(10 pmol/L)各 1.5 μl,其余由去离子双蒸水补齐。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃复性 30 s,72℃延伸 1 m,35 个循环,反应终止后再 72℃延伸 10 min,4℃保存。取 5 μl 进行 1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物,电泳结果见图 1~2。

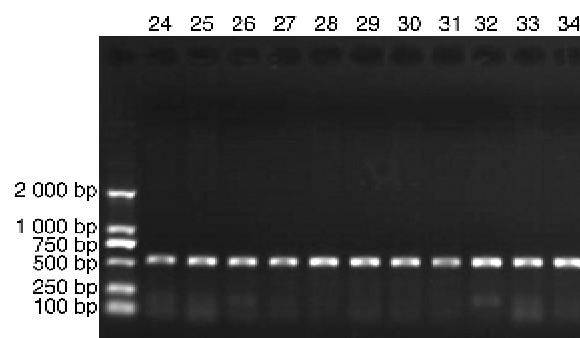


图 1 引物 F1R1 扩增产物电泳图

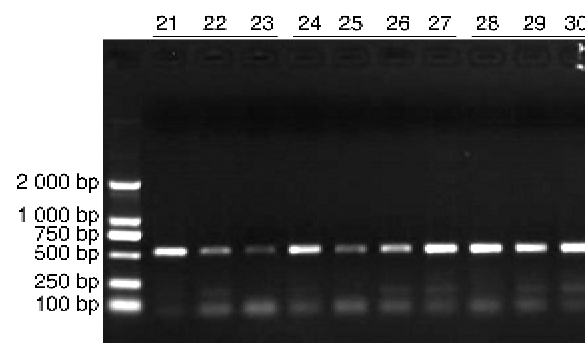


图 2 引物 F2R2 扩增产物电泳图

1.5 PCR 产物进行测序

PCR 产物进行正向直接测序,测序引物与 PCR 扩增引物相同,PCR 产物由上海生工测序部完成。测序结果应用 DNAMAN 软件进行测定序列与标准序列的比对分析,发现可疑的突变位点后用 Chromas 软件进行确认或排除,找出碱基改变的位点,具体分析突变情况。

1.6 GJB2 基因突变分析

在检测的 193 例个体中共发现 GJB2 基因 9 种碱基改变(表 1)。在 97 例耳聋患者中:41 例患者存在 GJB2 基因突变,其中 35 delG 纯和 12 例,79G>A 纯合 5 例,79G>A 杂合 8 例,79G>A 与 608T>C 复合杂合 1 例,79G>A 与 341A>G 复合杂合 5 例,235 delC 杂合 4 例,341A>G 杂合 2 例,439T>G 杂合 1 例,457G>A 杂合 1 例,521G>A 纯合 2 例。35 delG 和 235 delC 突变被认为是致病突变,携带率为 16.5%。其中 35 delG 纯和 12 例(12.4%, 12/97),等位基因频率为 12.4% (24/194); 235 delC 杂合 4 例(4.1%,

3/97),等位基因频率为 2.1%(4/194)。多态性 5 种(79G>A、341A>G、439T>G、457G>A、608T>C);未知突变 1 种(521G>A)。对照组 96 例中:79G>A 纯和 4 例,79G>A 杂合 10 例,341A>G 杂合 5 例,380G>A 杂合 1 例,608T>C 杂合 1 例,均为多态性。

表 1 CX26 基因突变在耳聋组与对照组中的比较

氨基酸 改变	核苷酸 改变	纯和突变		杂合突变		突变 类型
		患者	正常	患者	正常	
V27I	79G-A	5	5	14	9	多态性
E114G	341A-G	0	0	8	5	多态性
R127H	380G-A	0	0	0	1	多态性
E147K	439G-A	0	0	1	0	多态性
V153I	457G-A	0	0	1	0	多态性
I203T	608T-C	0	0	1	1	多态性
35 delG	35 delG	12	0	0	0	缺失移码
235 delC	233-235 delC	0	0	4	0	缺失移码
C174Y	521G-A	2	0	0	0	未知突变

3 讨论

缝隙连接蛋白 Connexin26 由 GJB2 基因编码,GJB2 为这几年的研究热点,其突变形式呈多样化,突变位点几乎遍布整个编码区,目前约有 110 多种突变与非综合征型聋相关^[7]。目前研究表明 Connexin26 对内耳的功能维持具有重要作用,Forge 等用免疫组化的方法证实了在听觉上皮层支持细胞及内耳前庭间确实存在大量缝隙连接,且在前庭器官内可见 Connexin26 高表达^[8]。GJB2 基因的突变导致 Connexin26 蛋白结构的异常改变,由于连接通道的异常改变,使钾离子回流进入淋巴液的循环受到影响,因此 Corti 器产生钾中毒,从而引起感音神经性聋。

本研究中耳聋组共检测出 8 种突变方式:35 delG、79G>A、235 delC、341A>G、439T>G、457G>A、521G>A、608T>C,均是已报道的突变方式。其中 79G>A、341A>G、439T>G、457G>A、608T>C 为多态性改变,521G>A 为未知突变,而 35 delG、235 delC 这 2 种为致病突变,致病突变携带

率为 16.5%。对照组中未检测到致病性突变。235 delC 是指 GJB2 基因的编码区 233-235 位处碱基 C 的纯合性缺失,而使其翻译氨基酸的框架结构自突变点以下变异,导致终止密码子提前至 82 号,翻译形成只有 81 个氨基酸的多肽,相比野生型蛋白截短了 145 个氨基酸。这种突变型 Connexin26 多肽的 M3、M4、E2、CL 区完全缺失,产生无功能的缝隙连接蛋白。35 delG 突变是指 GJB2 基因的编码区第 30~35 位中缺失一个 G 碱基,使其翻译过程提前中止于 13 号密码子,导致密码子序列移位产生终止密码子,形成含有 12 个氨基酸的小多肽,导致间隙连接蛋白功能的异常。

过去研究认为 235 delC 为中国的突变热点,2011 年,纪育斌等^[9]对 32 篇相关国内聋人 GJB2 基因筛查的荟萃分析结果显示国内 GJB2 基因常见突变热点为 235 delC、299_300delAT、176_191del16,相应的总体等位基因频率分别为 11.90%、2.22%、0.65%。在本次研究中耳聋组 235 delC 共检出的 4 例,且均为杂合突变,突变率为 4.1%,等位基因频率约为 2.1%,其检出率相比纪育斌等^[9]的研究结果较低。分析原因一方面可能为 235 delC 并非新疆地区哈萨克族 GJB2 的遗传性非综合征型耳聋的易感指标,存在其他基因共同参与耳聋的发生;另一方面可能为没有检测到如调控区的突变等其他因素。在本研究中哈萨克族耳聋人群中检出 35 delG 纯和 12 例(12.4%,12/97),等位基因频率为 12.4%,而对照组未检出该突变类型。耳聋组中携带有 GJB2 明确致病突变的患者共 16 例,而 35 delG 纯和突变占 75%,因此在本研究中 35 delG 是新疆地区哈萨克族非综合征型聋患者 GJB2 基因的致病热点突变。纪育斌等^[9]的分析结果显示:35 delG 等位基因频率约为 0.27%;Keney 等^[10]研究了 58 个美国耳聋患者,结果表明 35 delG 的频率达 28.4%;Rabionet 等^[11]的结果表明在在意大利患者中该突变占有所有突变等位基因的 88%,在西班牙患者中占 55%。35 delG 此种突变形式是阿拉伯人、高加索人、澳大利亚人及西欧人等 GJB2 基因的热点突变形式,而在中国学者的相关研究中发现其发生频率低,

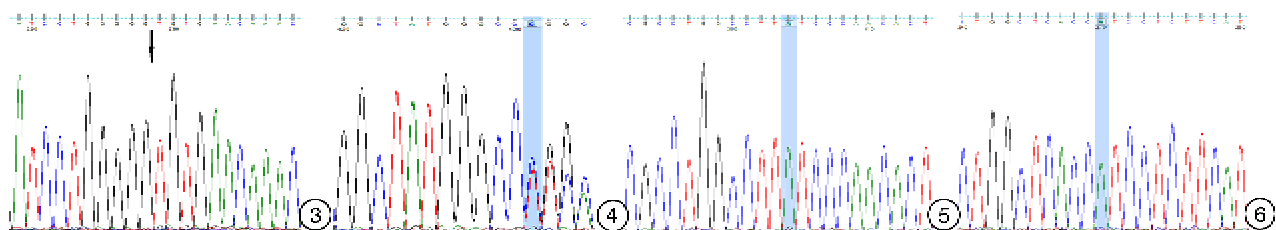


图 3 35 delG 纯和测序图; 图 4 235 delC 杂合测序图; 图 5 521G>A 纯和测序图; 图 6 79G>A 纯和测序图

Kudo 等^[12]在对日本人群的研究中亦未能发现该突变。满荣军等^[13]在其对新疆地区耳聋患者的研究中检测到哈萨克族 35 delG 突变的携带率为 15.4%,而汉族未能检测到相应突变类型。哈萨克族是新疆第 2 大少数民族,属阿尔泰语系突厥语族,属混血民族,其祖先主要是塞人和突厥人,人种属于蒙古人种北亚类型和欧罗巴人种的混合类型。新疆地区由于其独特的自然环境和民族传统,形成了相对封闭独立的遗传背景。以“始祖效应”理论为基础,我们可知每一群体的基因库可反映该群体始祖的基因结构,在一些特定人群中,会发现特定类型的突变出现频率很高^[14]。本研究中 235 delC 检出率较低,而 35 delG 检出率较高,这可能可以用“始祖效应”解释,然而近年来哈萨克族 GJB2 基因的研究资料甚少,这仍需更为全面深入的研究方可判定。

本研究检测到的 521G>A 这种突变在遗传性聋网上尚未公布,朱一鸣^[15]曾报道过,属未知突变。521G>A 使 174 位密码子由 (TGT) 变为 (TAT),其编码的氨基酸由半胱氨酸变为酪氨酸。79G>A (V27I)、341A>G (E114G) 是已明确的常见多态性改变,且二者经常伴随出现,本研究中其在耳聋患者组和对照组中均有较高携带率。The Connexin-deafness homepage 网站将 V27I+E114G 归为致病突变,然而仍有学者研究认为该突变属自然多态性。本研究结果显示:耳聋组中 V27I+E114G 突变同时出现有 5 例,占 5.2% (5/97);对照组中出现 2 例,占 2.1% (2/96),2 组差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.57, P > 0.05$)。因此本研究中推断 V27I+E114G 为新疆地区哈萨克族多态性改变。然而周黎红等^[16]的研究认为:虽然统计学分析 V27I+E114G 双杂合和非双杂合与耳聋的发生没有显著性关联;但家系检测结果提示 V27I+E114G 双杂合可能与耳聋的发生有关。

本研究结果显示:新疆地区哈萨克族耳聋患者有较高的 GJB2 基因突变携带率,在本研究中 35 delG 是最常见的突变类型且检出率较高,而 235 delC 突变检出率则处于较低水平。由于不同地域不同民族,GJB2 基因的主要突变形式、突变频率存在差异性,所以对其基因库资料的积累显得特别重要,既往新疆哈萨克族非综合征型聋的研究资料甚少,还需要我们更多的研究以填补空白。

参考文献

[1] MARAZITA M L, PLOUGHMAN L M, RAWLINGS B, et al. Genetic epidemiological studies of ear-

- ly-onset deafness in the US school-age population[J]. *Am J Med Genet*, 1993, 46: 486-491.
- [2] POSUKH O, PALLARES-RUIZ N, TADINOVA V, et al. First molecular screening of deafness in the Altai republic population[J]. *BMC Med Gene*, 2005, 6: 12-18.
- [3] ESTIVILL X, FORTINA P, SURREY S, et al. Connexin-26 mutations in Sporadic and inherited sensorineural deafness[J]. *Lancet*, 1998, 351: 394-398.
- [4] 孟玮. 云南省彝族遗传性非综合征性聋人群 GJB2 基因突变的研究[D]. 云南: 昆明医学院, 2006.
- [5] 贝政平, 舒怀, 周梁, 等. 眼耳鼻咽喉科疾病诊断标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 201-202.
- [6] 黄选兆, 汪吉宝, 种乃川, 等. 实用耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 985-999.
- [7] The Connexin-deafness homepage. <http://davinci.crg.es/deafness>. 2013, 10: 23-23.
- [8] FORGE A, BEEKER D, CASALOTTI S, et al. Gap junction and connexin expression in the inner ear[J]. *Novartis Found Symp*, 1000, 219: 123-150.
- [9] 纪育斌, 兰兰, 王大勇, 等. 中国非综合征型聋患者 GJB2 基因突变流行病学文献荟萃分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(4): 323-327.
- [10] KELLEY P M, HARRIS D J, COMERETAL B C. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 792-799.
- [11] RABIONETR, ZELANTE L, LOPEZ-BIGAS N, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin26) gene[J]. *Hum Genet*, 2000, 106: 40-44.
- [12] KUDO T, IKEDA K, KURE S, et al. Novel mutations in the connexin26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 90: 41-145.
- [13] 满荣军, 郭玉芬, 刘晓雯, 等. 新疆少数民族和汉族聋哑学生 GJB2 基因和线粒体 DNA12SrRNA A1555G 突变研究[J]. *中国耳鼻喉头外科*, 2009, 16(4): 190-193.
- [14] 李庆忠, 王秋菊, 韩东一, 等. GJB2 基因突变始祖效应对中国聋人群的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(5): 394-396.
- [15] 朱一鸣. 中国西北地区非综合征型聋常见聋病基因突变图谱的绘制及分析[D]. 甘肃: 兰州大学(甘肃), 2010.
- [16] 周黎红, 郝子琪, 刘薇拉, 等. GJB2 基因 V27I 和 E114G 位点与耳聋相关性的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(1): 49-50.

(收稿日期: 2013-10-29)