

新型多基因检测技术对内蒙古自治区 355 例 非综合征性聋患者的检测分析*

张迪^{1△} 段宏¹ 袁慧军^{1△△} 韩东一¹

[摘要] 目的:利用新型快速多基因检测技术对内蒙古自治区 355 例非综合征性聋患者进行分子病因筛查,了解这些非综合征性聋患者的分子病因,对新型多基因检测技术进行验证。方法:受检人群来自内蒙古自治区多地的特殊教育学校和聋儿康复中心的重度非综合征性聋患者,共 355 例。利用 SNPscan 技术对 GJB2、SLC26A4、MT-12S rRNA 这 3 个基因的 115 个位点进行检测。结果:在 355 例非综合征性聋患者中共找到明确基因致聋的患者 89 例(25.07%)。其中明确 GJB2 基因突变致病的患者人数为 53 例(14.93%),纯合突变 24 例(6.76%),复合杂合突变 29 例(8.17%)。除此之外,还发现携带 GJB2 基因的单杂合突变者 3 例(0.85%)。明确 SLC26A4 突变致病的患者 33 例(9.30%),其中纯合突变 15 例(4.23%),复合杂合突变 18 例(5.07%)。除此之外,还发现 SLC26A4 基因的单杂合突变携带者 5 例(1.41%)。线粒体 DNA12SrRNA A1555G 突变 6 例(1.69%),未发现 mtDNA12S rRNA 1494C>T 突变。结论:应用 SNPscan 聋基因诊断技术可以在聋患者病因调查中进行准确、快速和经济有效的诊断筛查。SNPscan 检测技术为大规模遗传性聋基因检测的开展提供了很好的诊断工具,值得推广应用。

[关键词] SNPscan;GJB2;SLC26A4;线粒体突变;非综合征性聋

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.22.003

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

A new method for simultaneous multi-gene mutation screening in 355 patients with nonsyndromic hearing loss of Inner Mongolia Autonomous region

ZHANG Di¹ DUAN Hong¹ YUAN Huijun¹ HAN Dongyi¹

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Institute of Otorhinolaryngology, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: HAN Dongyi, E-mail: hdy301@263.net; YUAN Huijun, E-mail: yuanhj301@163.com

Abstract Objective: Using simultaneous multi-gene mutation screening to survey the molecular epidemiological basis of 355 patients with nonsyndromic hearing loss of Inner Mongolia Autonomous region, we can identify the causes of their deafness, and verify the new method for simultaneous multi-gene mutation screening. **Method:** Three hundred and fifty-five patients with severe non-syndromic deafness from Inner Mongolia Autonomous region were included in the study. The SNPscan technology was used for screening the 115 spots mutations in three common deafness-related genes(GJB2, SLC26A4, MT-12S rRNA) of patients with nonsyndromic hearing loss of Inner Mongolia Autonomous region. **Result:** In 355 patients, there were 89 cases of deafness caused by mutation (25.07%). 53 patients with the GJB2 mutations were found(14.93%), including 24 cases of homozygous mutations (6.76%), 29 patients (8.17%) of compound heterozygous mutations, and 3 cases (0.85%) of single heterozygous mutations. 33 patients with the SLC26A4 mutations were found(9.30%), including 15 cases of homozygous mutations(4.23%), 18 patients (5.07%) of compound heterozygous mutations, and 5 cases (1.41%) of single heterozygous mutations. mtDNA12S rRNA A1555G mutation was found in 6 patients (1.69%). mtDNA12S rRNA 1494C>T mutation was not found. **Conclusion:** SNPscan technology allows accurate, rapid and cost-effective diagnostic screening in patients with hearing loss for etiology investigation. The SNPscan technology can serve as a good diagnostic tool for large-scale genetic testing for hereditary deafness and should be widely applied.

Key words SNPscan; GJB2; SLC26A4; mitochondrial mutations; non-syndromic deafness

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No:2013CB945402)

¹解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉科研究所(北京,100853)

[△]现在天津市第一中心医院耳鼻咽喉头颈外科天津市耳鼻咽喉科研究所(天津,300192)

^{△△}现在第三军医大学西南医院医学遗传中心(重庆,400038)

张迪、段宏为并列第一作者

通信作者:韩东一, E-mail: hdy301@263.net;

袁慧军, E-mail: yuanhj301@163.com

听力损失是一种常见的基因异常导致的感觉障碍,新生儿发生率为 1‰~3‰。超过一半的听力障碍儿童的病因可以归因于遗传因素,其中 70% 的非综合征性聋可以归因为遗传因素。在非综合征性聋患者中常染色体隐性遗传占 80%^[1]。目前 GJB2、线粒体 12SrRNA(MT-RNR1)和 SLC26A4 基因变异被认为是非综合征性聋的主要原因^[2]。在特殊教育学校和聋儿康复中心的患者绝大多数属于非综合征性聋,因此对上述 3 个基因的检测将有助于患者找到致病基因及其位点。目前,有许多不同的筛查方法用于检测耳聋的基因变异,包括:直接测序、微阵列、PCR-restriction 片段长度多态性(PCR-RFLP)。虽然直接测序法是突变检测的一个黄金标准方法,但这种检测方法价格昂贵又耗费时间。一个可以被广泛应用的突变筛查技术应该是:①使用传统设备;②具有高通量和低成本的特点;③实现高准确度、灵敏度和特异性。根据这些原则,我们开发了一个名为 SNPscan 的基因筛查技术,应用此项技术给先天性耳聋患者查找遗传病因,提高耳聋基因初筛率。此项技术是多个 SNP 基因分型的检测,可以在打字过程中检测到 48/96/144/192 SNP 位点。这项技术的基本原理是采用连接酶连接反应的高特异性,实现对 SNP 位点等位基因的识别,然后通过连接探针末段引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶加接反应获得位点对应的不同长度连接产物,利用标记荧光的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增,通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离,最后通过对电泳图谱的分析获取各个 SNP 位点的基因型(图 1)。此技术适合用于大量候选生物通路或者候选染色体区域的基因 SNP 分型,尤其适合针对全基因组 SNP 关联研究获得的初步阳性位点,以及全基因组测序得到的大量初筛突变位点进行进一步的大样本验证研究。本实验采用天昊公司的多通道遗传耳聋基因筛查系统(SNPscan 技术)对常见 3 个耳聋基因的 115 个致聋突变位点进行检测。

1 资料与方法

1.1 临床资料

355 例非综合征性聋患者为散发病例,来自呼和浩特特殊教育学校,聋儿康复中心,包头市特殊教育学校,鄂尔多斯市特殊教育学校和通辽市特殊教育学校。其中男 195 例,女 160 例;年龄 1~12 岁;包括 251 例汉族,100 例蒙古族,1 例回族,2 例满族,1 例达斡尔族人。其中 286 例患者属于先天性极重度聋,69 例是后天重度极重度聋患者和中重度聋患者。本研究通过医院伦理委员会的审核。并与患者父母或监护人签署同意书,同意其参与本项研究。

资料采集:填写耳聋患者信息登记表由课题组

专门培训的医师填写,其内容包括耳聋患者的基本信息,主诉,早期测听时的年龄和测听结果,颞骨 CT 结果,耳聋进展情况,母亲孕期有无感冒病史,耳鸣、眩晕的出现时间、持续时间及伴随症状,就诊时发音是否清晰,有无中耳炎病史及中耳炎类型,人工耳蜗植入史,耳毒性药物应用史以及剂量和使用时间,环境噪声接触史,母亲分娩时情况,家族史,有无近亲结婚,耳科体检所见等。同时填写知情同意书(未满 18 周岁者由家长或监护人签署)。入选标准:经多项听力、体格检查确诊为非综合征性耳聋患者;排除标准:与国外种族联姻家族史者,外耳、中耳畸形者,伴全身疾病者,智力障碍者,综合征性聋患者。

1.2 突变检测

测序仪上收集的原始数据用 GeneMapper 4.0 来分析,通过 PCR 产物的荧光标记及长度以及对应的 SNP 位点(等位基因)判定基因分型结果。图 2 为其中一个样本的结果图。

1.3 耳聋基因筛查结果验证

对 355 例非综合征性聋患者进行计算机软件(SPSS 17.0)随机抽样,抽取 50% 的患者(178 例)以及 SNPscan 检测结果为耳聋基因携带者的未被随机抽到的患者血样 DNA 进行双盲 Sanger 测序,以验证检测结果的准确性及敏感性。

2 结果

常见的 3 个耳聋基因 GJB2、SLC26A4 和线粒体 12SrRNA(MT-RNR1)的 115 个致聋突变位点检测出明确耳聋基因致病的有 89 例患者,告知其致病原因,明确其诊断并给予遗传指导。

2.1 GJB2 基因突变

56 例患者检测出至少有 1 个 GJB2 等位基因突变。其中,3 例单杂合突变,53 例明确为 GJB2 基因突变致病(24 个纯合突变,29 个复合杂合突变)。因此,14.93%(53/355)的患者被确诊为 GJB2 基因变异致病。本次 GJB2 基因检测共发现有 12 个不同种类的突变(表 1)。最普遍的突变类型是 c.235delC,有 44 个(12.39%,44/355),其中 22 个纯合突变,19 个和已知致病突变组成复合杂合,3 个突变和未知致病的突变位点组成复合杂合;c.235delc 等位基因变异频率 9.30%(66/710)。其他较常见的突变是 c.299_300delAT、511_512insAACG、c.176_191del16,它们的突变率分别为 0.99%、0.99%、0.70%。

2.2 SLC26A4 基因突变

结果中 38 例(10.70%,38/355)至少有 1 个等位基因突变。其中 5 例患儿单杂合突变,33 例是致病性突变(15 个是纯合突变,18 个是复合杂合突变)。本项研究中 9.30%(33/355)的患者确诊为 SLC26A4 基因突变致病。在 355 例筛查者中共发

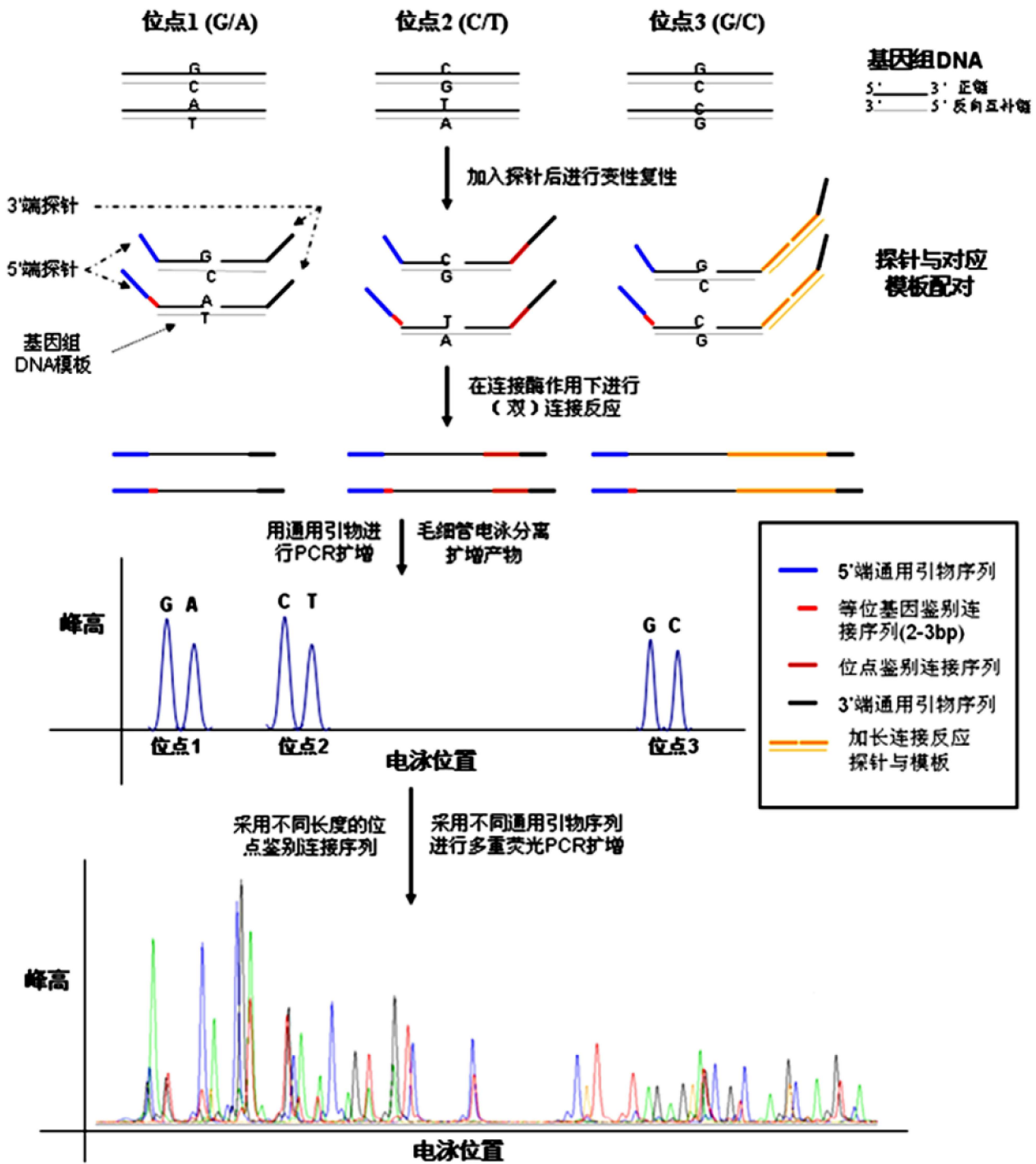


图 1 SNPscanSNP 分型原理图

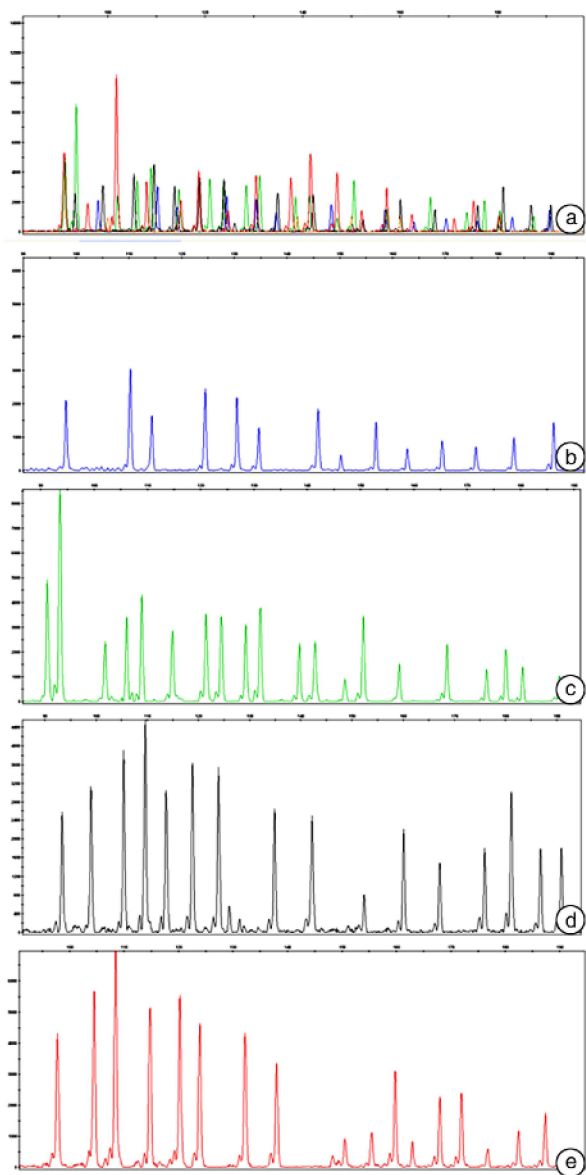
现 16 种不同的 SLC26A4 基因突变 (表 2)。最常见的突变是 c. 919-2A-G (ivs7-2), 有 29 例, 其中纯和突变 14 例 (3.94%, 14/355), 复合杂合突变 15 例。c. 919-2A-G 位点的等位基因突变频率为 6.06% (43/710)。除了最常见的突变, c. 2168A>G 突变相对较多, 突变频率为 0.99%。

共有 112 例患者有颞骨 CT 和 (或) MRI 的结果。其中明确为大前庭导水管综合症的 16 例, 查出明确致病基因的 4 例, 其均由 SLC26A4 基因突变导致, 包括: c. 919-2A-G (ivs7-2)/1343C>A, c.

919-2A-G (ivs7-2)/2027T > A, 414delT/1686 _ 1687insA, c. 919-2A-G (ivs7-2)/2027T > A。另外有 14 例发现有内耳发育畸形, 其中只有 1 例明确致病基因为 c. 919-2A-G (ivs7-2) 纯和突变。

2.3 MT-RNR1 基因突变

73 个患者有氨基糖甙类药物接触史。其中仅 6 例 (1.69%, 6/355) 发现 MT-RNR1 基因 m. 1555 A>G 突变。其中 3 例蒙古族患儿为非先天性耳聋, 出生后有明确的氨基苷类药物使用史, 用药后出现听力下降现象, 听力检测均为双耳重度或极重



a:nmg-002 PanelA1 总峰图;b:nmg-002 蓝色(FAM) 荧光峰图;c:nmg-002 绿色(VIC) 荧光峰图;d:nmg-002 黄色(NED) 荧光(用黑色表示)峰图;e:nmg-002 红色(PET) 荧光峰图。

图 2 目标位点的突变检测图

度聋,根据病史及基因分析可明确其致病原因是 MT-RNR1 基因 m. 1555 A>G 突变所致。另外 3 例汉族儿童为先天性耳聋,听力检测均为双耳重度或极重度聋,无氨基苷类药物用药史,所查突变不一定是其致病原因,还需进一步检测其他致聋原因,为其明确诊断。所有的患儿均未发现线粒体基因 m. 1494C>T 突变。

2.4 验证结果

对随机抽取的 178 例非综合征型聋病例和没有被抽到的 SNPscan 检测结果为耳聋基因携带者病例分别进行 GJB2, SLC26A4 及 MT-RNR1 基因的全外显子组 Sanger 验证测序,结果与 SNPscan 检测结果完全吻合,符合率为 100%。

3 讨论

目前研究已经表明, GJB2、MT-RNR1 和 SLC26A4 基因在中国非综合征性聋中是最常见的致聋原因。SNPscan 技术成功地进行多通道联合检测这 3 个基因,与其他方法相比,这种方法是准确、快速和经济有效的。经 SNPscan 方法的检测的准确率为 99.99%。使用这个方法,约 30% 的患者在我们研究中明确了致病原因。在成本方面,115 个突变的检测,成本只有每例 26 美元(1 美元=6.05 元人民币)。这些证据表明,SNPscan 检测是目前较好的遗传性聋的诊断工具。

3.1 GJB2

先前的研究表明非综合征性聋患者中, GJB2 基因突变是患者的最常见原因。在我们的研究中,我们发现 GJB2 突变的患者占受检人群的 14.93%。据报道,在墨西哥非综合征性聋 GJB2 基因突变的患病率是 18.5%^[2]。Matos 等^[4]证明在葡萄牙非综合征性聋 GJB2 基因突变的患病率是 20%。Dai 等^[4]研究表明在中国非综合征性聋 GJB2 基因突变的患病率是 17.9%。这几国之间 GJB2 基因突变的致病率差异无统计学意义($P > 0.05$)。GJB2 突变位点在不同种族是不同的。有

表 1 GJB2 基因筛查结果分析

核苷酸改变	密码子改变	突变类型	致病类型	纯合突变/例	杂合突变/例	突变率/%
c. 9G>A	W3X	错义突变	致病性	1	1	0.42
c. 35delG	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	3	0.42
c. 34_35insG	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	3	0.42
c. 134G>A	G45E	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 176_191del16	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	5	0.70
c. 235delC	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	22	22	9.30
c. 299_300delAT	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	7	0.99
c. 313_326del14	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 427C>T	R143W	错义突变	致病性	0	3	0.42
c. 511_512insAACG	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	1	5	0.99
c. 605ins46	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 109G>A	V37I	错义突变	未知	1	3	0.70
合计				25	55	14.79

表 2 SLC26A4 基因筛查结果分析

核苷酸改变	密码子改变	突变类型	致病类型	纯合密度/例	杂合密度/例	突变率/%
c. 230A>T	K77I	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 235C>T	R79X	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 414delT	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 589G>A	G197R	错义突变	致病性	0	2	0.28
c. 919-2A-G(ivs7-2)	SS	错义突变	致病性	14	15	6.06
c. 1174A>T	N392Y	错义突变	致病性	0	2	0.28
c. 1229C>T	T410M	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 1262A>C	Q421P	错义突变	致病性	1	0	0.28
c. 1336C>T	Q446X	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 1343C>A	S448L	错义突变	致病性	0	1	0.14
c. 1520delT	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 1547_1548InsC	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 1686_1687insA	移码突变缺失	移码突变缺失	致病性	0	1	0.14
c. 1975G>C	V659L	错义突变	致病性	0	2	0.28
c. 2168A>G	H723R	错义突变	致病性	0	7	0.99
c. 2027T>A	L676Q	错义突变	致病性	0	2	0.28
合计				15	39	9.72

文章报道在白种人、犹太人和亚洲人最常见的突变分别是 c. 35delG, c. 167delT, c. 235delC^[5-6]。在我们的研究中,我们发现最常见的突变体是 c. 235delC,占 12.39%(44/355)。Chen 等还表示,c. 235delC 在中国汉族人群非综合征性耳聋患者中是热点突变,突变率是 9.93%^[7]。

3.2 MT-RNR1 基因

虽然细胞核的基因突变是非综合征性聋的主要原因,几项研究表明 MT-RNR1 基因突变,例如 m. 1494C>T 和 m. 1555A>G 也是非综合征性聋的病因^[8]。此外,在西方人群和亚洲人群 m. 1555A>G 的突变频率为 0.6%~5.3%^[9]。我们发现 0.85%的非综合征性耳聋患者的致病基因是 MT-RNR1 基因,其突变位点是 m. 1555A>G。这一位点被认为是氨基苷类药物的靶位点。因此,我们针对 MT-RNR1 基因的基因突变和氨基苷类药物使用进行调研。结果表明,有 50%的 m. 1555A>G 突变的患者有明确的氨基苷类药物的使用史。此外,Shen 等^[10]研究报告有 21.4%的明确氨基苷类药物使用史的非综合征性聋患者的突变位点是 m. 1555A>G。将来我们还应该注意其 MT-RNR1 基因位点突变所导致的非综合征性聋,如 m. 3388C>A, m. 7444G>A, m. 8078G>A 和 m. 15077G>A^[11]。我们也将添加上述突变位点到我们的检测突变谱的队列中。

3.3 SLC26A4 基因

SLC26A4 基因突变是非综合征性聋的第 2 大原因。在我们的研究中,我们发现非综合征性聋患者中 9.30%的患者确定是 SLC26A4 基因引起。柴等人报道,在中国非综合征性聋患者中

SLC26A4 基因突变的发生率是 11.2%^[12]。我们的结果和柴的报告结果之间差异无统计学意义($P>0.05$)。SLC26A4 基因突变位点在不同民族有不同表现。在欧洲北部最常见的 SLC26A4 基因的突变位点是 p. T416P 和 c. 1001 + 1G>A,而在巴基斯坦 p. Q446R, p. V239D 和 P. S90L 是常见位点^[13],在日本和韩国则是 p. H723R^[14]。然而,在我国最常见的 SLC26A4 基因的突变位点是 c. 919-2A>G 和 c. 2168A>G^[15-16]。我们的研究结果显示,最普遍突变位点是 c. 919-2A>G 和 c. 2168A>G,分别占 6.06%和 0.99%。Dai 等^[16]研究显示 c. 919-2A>G 的突变率是 12.50%。

有一种非常常见的与 SLC26A4 基因相关的耳聋疾病是大前庭水管综合征。在我们的研究中,我们发现 SLC26A4 基因突变 12.1%(4/33)的患者是前庭导水管扩大(多数患者没有到正规医院就诊经历,更没有 CT 检查史)。Yuan 等^[17]证明在中国 89.74%(35/39)的前庭导水管扩大患者带有 SLC26A4 基因突变。Tsukamoto 等(2003)表明在日本 SLC26A4 基因的突变发生在 78%的前庭导水管扩大的患者中。Pourova 等^[18]的研究说明,13.6%的捷克前庭导水管扩大患者与 SLC26A4 基因突变有关。Albert 等^[19]发现在高加索听力障碍人群中 SLC26A4 基因突变患者中 40%为前庭导水管扩大患者。据推测,在高加索人群中由于其他基因或环境因素参与了前庭导水管扩大的发生。中国西北地区属于高海拔地区,该地区也具有这些因素。一些环境恶劣,氧含量较低,太阳辐射大、极端温度、干燥的气候和土壤的贫瘠也是致病的环境因素^[20]。据报道,饮食也是听力损失的危险因

素^[21]。我们发现并非所有 SLC26A4 基因突变的前庭导水管扩大听力障碍患者都可以通过 CT 扫描发现,其他基因突变可能存在,对于这些初筛阴性的患者样本我们将进入复筛平台,利用建立的目标区域捕获大规模平行测序的方法,对其进行进一步的基因筛查及鉴定。

检测内蒙古地区非综合征性聋儿,对其本人及其家庭都有很大的帮助,下一步还可以对其进行遗传咨询,解决下一代再次出现聋病患儿的问题,从根源上切断致聋基因的遗传。根据本次筛查结果,我们得到了内蒙古地区聋病患儿其携带致聋基因的基本情况,从而对该地区大规模统计聋患病率打下基础,也为我们大规模基因库扩充了资源,为进一步进行全国范围筛查打下了基础。

参考文献

- [1] COLLINS F S, GELEHRTER T D. 医学遗传学原理 [M]. 孙开来, 赵彦艳, 熊第志, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 190—197.
- [2] DE LA LUZ ARENAS-SORDO M, MENENDEZ I, HERNANDEZ-ZAMORA E, et al. Unique spectrum of GJB2 mutations in Mexico [J]. *Int J Pediatr. Otorhinolaryngol*, 2012, 76: 1678—1680.
- [3] MATOS T D, SIMOES-TEIXEIRA H, CARIA H, et al. Spectrum and frequency of GJB2 mutations in a cohort of 264 Portuguese nonsyndromic sensorineural hearing loss patients [J]. *Int J Audiol*, 2013, 52: 466—471.
- [4] DAI P, YU F, HAN B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 26—26.
- [5] OHTSUKA A, I YUGE, KIMURA S, et al. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation [J]. *Hum Genet*, 2003, 112: 329—333.
- [6] SNOECKX R L, HUYGEN P L, FELDMANN D, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study [J]. *Am J Hum. Genet*, 2005, 77: 945—957.
- [7] CHEN Y, M TUDI, SUN J, et al. Genetic mutations in non-syndromic deafness patients of Uyghur and Han Chinese ethnicities in Xinjiang, China: a comparative study [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 154—154.
- [8] LU J, LI Z, ZHU Y, et al. Mitochondrial 12S rRNA variants in 1642 Han Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss [J]. *Mitochondrion*, 2010, 10: 380—390.
- [9] LIU X, DAI P, HUANG D L, et al. Large-scale screening of mtDNA A1555G mutation in China and its significance in prevention of aminoglycoside antibiotic induced deafness [J]. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86: 1318—1322.
- [10] SHEN Z, ZHENG J, B CHEN, et al. Frequency and spectrum of mitochondrial 12S rRNA variants in 440 Han Chinese hearing impaired pediatric subjects from two otology clinics [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 4.
- [11] GUTIERREZ CORTES N, PERTUISET C, DUMON E, et al. Novel mitochondrial DNA mutations responsible for maternally inherited nonsyndromic hearing loss [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33: 681—689.
- [12] CHAI Y, HUANG Z, TAO Z, et al. Molecular etiology of hearing impairment associated with nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct in East China [J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161: 2226—2233.
- [13] ANWAR S, RIAZUDDIN S, AHMED Z M, et al. SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis [J]. *J Hum Genet*, 2009, 54: 266—270.
- [14] PARK H J, LEE S J, JIN H S, et al. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans [J]. *Clin Genet*, 2005, 67: 160—165.
- [15] WANG Q J, ZHAO Y L, RAO S Q, et al. A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China [J]. *Clin Genet*, 2007, 27: 245—254.
- [16] DAI P, LI Q, HUANG D, et al. SLC26A4 c. 919-2ANG varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss [J]. *Genet Med*, 2008, 10: 586—592.
- [17] YUAN Y, YOU Y, HUANG D, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 79—79.
- [18] POUROVA R, JANOUSEK P, JUROVCIK M, et al. Spectrum and frequency of SLC26A4 mutations among Czech patients with early hearing loss with and without Enlarged Vestibular Aqueduct [J]. *Ann Hum Genet*, 2010, 74: 299—307.
- [19] ALBERT S, BLONS H, JONARD L, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14: 773—779.
- [20] YUANY, ZHANG X, HUANG S, et al. Common molecular etiologies are rare in nonsyndromic Tibetan Chinese patients with hearing impairment [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30720—e30720.
- [21] CHOI Y H, MILLER J M, TUCKER K L, et al. Antioxidant vitamins and magnesium and the risk of hearing loss in the US general population [J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99: 148—155.

(收稿日期: 2015-08-02)