

# 河南省 100 例非综合征型聋患者 聋基因突变分析\*

杨爱利<sup>1</sup> 耿曼英<sup>1</sup> 张慧<sup>1</sup> 郭小艳<sup>1</sup> 汤建芬<sup>1</sup> 韩富根<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:通过对河南地区非综合征型聋患者耳聋相关基因突变分析,初步了解河南地区耳聋患者基因的突变频率和突变热点。方法:询问病史及临床检查后,收集河南地区 100 例非综合征型聋患者的外周血,提取基因组 DNA,用 Sanger 测序法对患者基因组 DNA 的 4 个常见耳聋基因:GJB2 基因、SLC26A4 基因、GJB3 基因的 538C>T 位点、线粒体 DNA(mitochondrial, mtDNA)12SrRNA 基因的 1555A>G、1494C>T 突变位点进行检测,并进行数据分析。结果:100 例非综合征型聋患者突变基因检出率为 44%,GJB2 基因突变者 29 例,SLC26A4 基因突变者 13 例,GJB3 基因突变者 0 例,mtDNA12SrRNA 基因突变者 3 例。结论:河南地区非综合征型聋患者 GJB2 的突变率最高,其次为 SLC26A4,将为河南地区耳聋病因的鉴别提供理论依据。

**[关键词]** 非综合征型聋;耳聋基因;突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.22.007

**[中图分类号]** R764.43 **[文献标志码]** A

## Analysis of deafness-related gene mutations in 100 non-syndromic hearing loss patients in Henan province

YANG Aili<sup>1</sup> GENG Manying<sup>1</sup> ZHANG Hui<sup>1</sup> GUO Xiaoyan<sup>1</sup>  
TANG Jianfen<sup>1</sup> HAN Fugen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Clinical College of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450014, China; <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Children's Hospital of Zhengzhou)

Corresponding author: GENG Manying, E-mail: manying66@126.com

**Abstract Objective:** To preliminarily determine the gene mutation frequency and the hotspots in Henan province, we analysed the deafness-related gene mutation in patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). **Method:** Genomic DNA samples of 100 patients with NSHL in Henan province were extracted from peripheral blood after clinical history inquiry and clinical examination, Four common deafness genes GJB2, SLC26A4, mitochondrial 12SrRNA, and GJB3 were detected by Sanger sequencing method, and then data analysis were conducted. **Result:** Among 100 patients with NSHL, the gene mutation frequency was 44%. In these patients, 29 cases had GJB2 mutations, 13 cases had SLC26A4 gene mutations, and 3 cases had mitochondrial 12SrRNA mutations. **Conclusion:** Among the patients with NSHL in Henan province, the most frequent mutation causing hereditary deafness was mutation in GJB2, followed by SLC26A4, and it will provide a theoretical basis to determine the etiology of deafness in Henan Province.

**Key words** nonsyndromic hearing loss; deafness gene; mutation

耳聋是人类最常见的感觉缺陷性疾病之一,第 2 次全国残疾人抽样调查显示我国听力言语残疾者达 2780 万人,居各类残疾之首<sup>[1]</sup>。耳聋的致病因素可分为环境和遗传 2 大类,约 60% 先天性感音神经性聋由遗传因素所致<sup>[2]</sup>。非综合征型聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL) 占有遗传性聋的 70% 以上<sup>[3-4]</sup>。许多基因的突变可致遗传性

聋,已有 140 多个 NSHL 相关位点被定位,80 多个致病基因被克隆<sup>[5-6]</sup>。大规模的流行病学及耳聋基因诊断研究发现 NSHL 常见于少数几个基因突变,其中 GJB2、SLC26A4 及线粒体 DNA(mitochondrial, mtDNA)12SrRNA 是我国 NSHL 患者中最常见的致病基因<sup>[7]</sup>。遗传性聋有高度的异质性,在不同地区进行耳聋基因的分子流行病学调查,将为该地区因地制宜地开展遗传咨询、基因诊断和预防干预提供指导意义。河南地区对 NSHL 患者相关研究较少,本研究对河南地区 100 例 NSHL 患者进行了耳聋基因突变的筛查及分析,对河南地区 NSHL 患者耳聋基因的突变热点和突变

\* 基金项目:河南省科技攻关计划普通项目(No. 201303084)资助

<sup>1</sup> 郑州大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科(郑州,450014)

<sup>2</sup> 郑州市儿童医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:耿曼英, E-mail: manying66@126.com

频率有了初步了解,为河南地区耳聋病因鉴别提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2013-01—2014-12 期间在郑州市儿童医院行电子耳蜗植入的 100 例 NSHL 患者,均为汉族;其中男 63 例,女 37 例;年龄 1~17 岁,中位年龄为 3 岁 5 个月。本研究的基本信息及临床血样的采集均获得了患者及其家属的同意,并签署了知情同意书。所有患者均行纯音测听、声导抗、耳声发射、听性脑干反应、颞骨 CT、头颅 MRI、内听道扫描、耳蜗水成像等检查以排除颅脑占位性病变及智力障碍。所有患者均填写基本信息登记表以详细了解病史,包括耳聋发病年龄、诱发因素、伴随症状、是否应用耳毒性药物、是否有头部外伤史、家族史及母亲孕育情况等。

1.2 研究方法

1.2.1 标本的采集 采集患者的外周静脉血 3~5 ml,EDTA 抗凝。

1.2.2 DNA 提取 应用 DNA 提取试剂盒(购自天根生化科技有限公司)提取 DNA,提取方法及步骤参照试剂盒提供的说明书进行。应用核酸定量仪进行浓度和纯度的检测,浓度为 100~200 ng/ $\mu$ l,纯度 A(260 nm/280 nm)为 1.7~2.0,保存于-20℃的冰箱中备用。

1.2.3 PCR 扩增 GJB2、SLC26A4、mtDNA12SrRNA 及 GJB3 引物设计参照戴朴等<sup>[8]</sup>和袁永一等<sup>[9]</sup>的研究,所有引物有华大基因科技有限公司合成。后进行 PCR 特异片段的扩增,扩增体系详见表 1。PCR 反应程序:96℃ 5 min 预变性;96℃ 20 s、55℃ 20 s、72℃ 20 s 共 30 个循环,72℃ 5 min,保存于 4℃,在扩增过程中,参数设置使温度以 0.5℃/s 的速度从 96℃降至 55℃;以 0.2℃/s 的速度从 55℃升至 72℃。

表 1 PCR 扩增体系

反应体系	体积/ $\mu$ l
10* Ex Taq buffer	3.0
dNTP(2.5 mmol/L each)	2.0
PrimerF(10 p)	1.0
PrimerR(10 p)	1.0
Ex Taq(5 U/ $\mu$ l)	0.2
模板(ng/ $\mu$ l)	2.0
H <sub>2</sub> O	20.8
合计	30.0

1.2.4 耳聋基因的测序 检测合格的 PCR 产物,送华大基因科技有限公司进行测序,该公司采用 Sanger 测序法对 100 例 NSHL 患者基因组 DNA

的 4 个常见耳聋基因:GJB2 基因、SLC26A4 基因、GJB3(c. 538C>T)、mtDNA12SrRNA(c. 1555A>G,c. 1494C>T)的突变位点进行检测,测序结果应用 DNAMAN 软件与 NCBI 网站公布的 GJB2、SLC26A4、GJB3 及 mtDNA12SrRNA 的参考序列进行比对。

2 结果

2.1 病史及听力学检查

100 例患者听力学检查及小儿行为测试均表现为双耳重度、极重度感音神经性聋,无语言能力。语前性聋 93 例,聋前有明确耳毒性药物应用者 2 例,主要为因感冒、发烧而应用氨基苷类药物所致,有明确头部外伤史者 1 例。

2.2 影像学检查

100 例患者均行颞骨高分辨率 CT、头颅 MRI、内耳道扫描、耳蜗水成像检查,均无听神经瘤等颅脑占位性病变。15 例诊断为大前庭水管综合征,其中 1 例单侧发病,14 例双侧发病。

2.3 基因检测

100 例耳聋患者检测出携带耳聋基因突变者有 44 例(1 例同时含有 GJB2 及 SLC26A4 这 2 个基因的突变位点,为 235 delC+2168A>G 位点的突变)。GJB2 突变者 29 例,突变情况详见表 2;SLC26A4 突基因突变者 13 例,突变情况见表 3。没有检测到 GJB3 基因突变。mtDNA12SrRNA 突变者 3 例,1555A>G 纯合突变者 2 例,1494C>T 纯合突变者 1 例。

表 2 100 例 NSHL 患者中 GJB2 基因突变位点检测结果例

突变位点	纯合突变	杂合突变	阳性结果
35delG	1	0	1
235delC	11	4	15
299_300delAT	2	1	3
79G>A	0	1	1
109G>A	1	0	1
341A>G	0	1	1
257C>T	0	1	1
427C>T	0	1	1
608T>C	0	1	1
235delC+299_300delAT	0	1	1
235delC+35delG	0	1	1
79G>A+341A>G	0	1	1
235delC+2168A>G	0	1	1
合计	15	14	29

3 讨论

本研究通过对河南地区 100 例 NSHL 患者的耳聋基因进行检测,突变基因检出率为 44%(44/

表 3 100 例 NSHL 患者中 SLC26A4 基因突变位点检测结果

突变位点	纯合突变	杂合突变	阳性结果例
IVS7-2A>G	6	2	8
IVS7-2A>G	6	2	8
2168A>G	1	0	1
1975G>C	0	1	1
2027T>A	0	1	1
IVS15+5G>A	0	1	1
235delC+2168A>G	0	1	1

100),反映出河南地区遗传性聋的高发现象。

GJB2 是我国重度、极重度耳聋患者中最常见的致病基因,约 50%常染色体隐性遗传的 NSHL 是由 GJB2 突变所致。目前约有 220 个 GJB2 的突变位点被鉴定<sup>[10]</sup>。突变位点具有种族特异性:35 delG 最常见于高加索人群,167 delT 在犹太人最常见,我国最常见的突变位点为 235 delC<sup>[11]</sup>。戴朴等<sup>[12]</sup>研究发现 GJB2 在我国耳聋人群中的总体致病突变率为 17.9%。本研究 NSHL 患者中 GJB2 的突变检出率为 29%(29/100),高于 17.9% 的总体水平。本研究发现了 13 种突变方式,其中 235 delC 突变检出率最高为 18%(18/100),占所有突变患者的 40.9%(18/44),是 GJB2 的主要突变形式,其突变率与全国 18 个省 NSHL 耳聋分子流行病学研究数据 18.2%相符<sup>[13]</sup>。其次为 299~300 delAT,郭玉芬等<sup>[14]</sup>研究发现 NSHL 患者中 299~300 delAT 为西北地区仅次于 235 delC 的突变,占所有突变患者的 15.6%,而本研究 299~300 delAT 突变者占所有突变患者的 9.1%(4/44)。进一步证明了 NSHL 基因突变具有地区异质性。另外,还检出几种较少见的突变方式,其中 79A>G,341A>G,608T>C 属于多态性改变,257C>T,427C>T 属于病理性改变。但 109G>A 突变位点国内外学者的观点不相一致,Wilcox 等<sup>[15]</sup>认为 109G>A 在耳聋的发病机制中起了重要作用,但于飞等<sup>[16]</sup>认为正常人群中具有较高的携带率,且比较 NSHL 患者与正常人群携带 109G>A 的人数差异无统计学意义,认为其属多态性改变。本研究检测到 1 例患者携带 109G>A 纯合突变表现为极重度耳聋,故本研究认为 109G>A 属病理性突变。

SLC26A4 基因突变在我国 NSHL 患者遗传性病因中仅次于 GJB2 突变<sup>[3]</sup>。SLC26A4 突变可导致先天性聋并伴碘有机化缺失的 PS 综合征或表现为大前庭水管综合征(enlarged vestibular aqueduct, EVA)<sup>[17]</sup>。目前研究表明:IVS7-2A>G 和 2168A>G 为我国 NSHL 患者 SLC26A4 基因中最常见的突变位点<sup>[18]</sup>。本研究 SLC26A4 基因

的突变检出率为 13%(13/100),检出 5 种突变方式。IVS7-2A>G 突变率最高,占所有突变患者的 18.2%(8/44) 高于全国的平均突变水平 13.35%<sup>[19]</sup>,其次为 2168A>G 占所有突变患者的 4.5%(2/44)。还检出了几个非热点的致病突变位点:1975G>C,2027T>A,IVS15+5G>A,突变率均较低,这些突变可能导致无法准确翻译表达出功能正常的蛋白,从而导致 EVA 及感音神经性聋的表现<sup>[20]</sup>。

本研究对所有患者行颞骨高分辨率 CT 平扫,EVA 者 15 例,伴有内耳畸形者 3 例,1 例有明确的头部外伤史。研究显示,我国 97.9%的 EVA 患者 SLC26A4 基因发生突变,而 SLC26A4 基因中 IVS7-2A>G 的突变又占所有 EVA 突变患者的 78.9%<sup>[21]</sup>。本研究 EVA 患者中 SLC26A4 检出率稍低为 86.7%(13/15),IVS7-2A>G 占 EVA 基因突变患者的 53.3%(8/15),2168A>G 占 EVA 患者的 13.3%(2/15),分析可能与本研究选取的样本量较小有关或是遗传性聋的地区异质性所致。13 例检测有 SLC26A4 基因突变的 EVA 患者均为双耳发病,2 例未检测到 SLC26A4 突变(其中 1 例为双侧发病,1 例为单侧发病),提示 EVA 发病可能与 SLC26A4 以外的其他基因有关。EVA 诊断标准为颞骨高分辨率 CT 检查,但基因诊断与影像学有高度的一致性,说明耳聋基因检测可作为 EVA 患者较为可靠检测方法;与影像学相比,对于儿童的基因检测不接触辐射、不使用镇静剂,并且基因检测可在没有出现临床症状前做出诊断,从而为患者提供有效的听力防护措施,如避免上呼吸道感染、发热、头部外伤、剧烈运动及极度疲劳等,从而降低 EVA 患者患重度极重度耳聋的发病率。

mtDNA 基因突变所导致的耳聋属于母系遗传,突变与氨基苷类药物应用密切相关。mtDNA 突变的患者对氨基苷类药物有易感性,应用正常剂量或微量就可诱发听力损失<sup>[22]</sup>。1555A>G 是我国最常见的 mtDNA 基因突变位点,本研究中 mtDNA 的突变检出率为 3%,其中 1555A>G 突变率为 2%,低于全国平均水平 2.86%<sup>[9]</sup>,1494 C>T 纯合突变者 1 例。2 例有明确的庆大霉素应用史,证实了河南地区 NSHL 中 mtDNA 基因最常见的突变位点为 1555A>G,且 mtDNA 基因突变与氨基苷类药物的应用密切相关。因此,通过对河南地区 NSHL 患者 mtDNA 基因突变的检测,尽量避免该类人群应用氨基苷类药物,可有效降低该人群耳聋的发生。

GJB3 基因编码缝隙连接蛋白 31(Connexin 31,Cx31),Cx31 在耳蜗、膝状神经节及听神经中均有表达,参与耳蜗内离子平衡的调节<sup>[23]</sup>。GJB3 基因最常见的突变位点为 538C>T。本研究中没

有检测出 GJB3 基因突变的患者,可能与样本量较小有关。

通过对河南地区 100 例 NSHL 患者 4 个耳聋基因的突变位点分析,初步了解了河南地区耳聋患者耳聋基因突变情况:其中 GJB2 的突变率最高,SLC26A4 次之。本研究可为河南地区耳聋患者的早期诊断、遗传咨询及治疗提供有力的理论依据。但本研究也有局限性,如样本量小,检测基因的突变位点相对较少,需增加样本量、扩大研究范围后进一步研究。本研究很多患者没有检测到基因突变,提示河南地区 NSHL 患者中可能存在有 GJB2, SLC26A4, GJB3, mtDNA12SrRNA 4 个常见基因以外的其他基因或位点突变,尚需要应用全基因组扫描技术或外显子捕获高通量测序技术等更先进的检测方法以检测更多的耳聋突变基因及位点和进一步的生物学研究以了解基因突变位点的功能。

参考文献

[1] MORTON C C, NANCE W E. Newborn hearing screening—a silent revolution[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354:2151—2164.

[2] BITNER-GLINDZICZ M. Hereditary deafness and phenotyping in humans[J]. *Br Med Bull*, 2002, 63:73—94.

[3] NISHIO S Y, USAMI S I. Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in japan[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2015, pii: 0003489415575059.

[4] WOO H M, PARK H J, BAEK J I, et al. Whole-exome sequencing identifies MYO15A mutations as a cause of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Korean families[J]. *BMC Med Genet*, 2013, 14:72—72.

[5] FALETRA F, GIROTTO G, D'ADAMO A P, et al. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss [J]. *Gene*, 2014, 534: 236—239.

[6] SU Y, TANG W X, GAO X, et al. A novel mutation in the TECTA gene in a Chinese family with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e89240—e89240.

[7] YAO G, CHEN D, WANG H, et al. Novel mutations of SLC26A4 in Chinese patients with nonsyndromic hearing loss[J]. *Acta Otolaryngol*, 2013, 133:833—841.

[8] 戴朴, 于飞, 康东洋, 等. 线粒体 DNA1555 位点和 GJB2 基因及 SLC26A4 基因的诊断及临床应用 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005, 40(10): 769—773.

[9] 袁永一, 黄德亮, 于飞, 等. GJB3 在携带 GJB2 单等位基因突变的耳聋人群中的突变分析[J]. *中华耳*

鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 45(4):287—290.

[10] HUANG A, YUAN Y, DUAN N, et al. Hearing loss associated with an unusual mutation combination in the gap junction beta 2 (GJB2) gene in a Chinese family[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78: 599—603.

[11] 王苹, 赵佳, 于妹媛, 等. 应用耳聋基因芯片探讨聋哑夫妇的生育风险[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(6):475—479.

[12] DAI P, YU F, HAN B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment[ J]. *Transl Med*, 2009, 14:1—12.

[13] 戴朴, 刘新, 于飞, 等. 18 个省市聋校学生非综合征型聋病分子流行病学研究[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(1):1—5.

[14] 郭玉芬, 刘晓雯, 关静, 等. 西北地区非综合征型聋患者 GJB2、SLC26A4 基因突变的分子流行病学研究 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2008, 16(4):263—266.

[15] WILCOX S A, SAUNDERS K, OSBORN A H, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene[J]. *Hum Genet*, 2000, 106:399—405.

[16] 于飞, 韩东一, 戴朴, 等. 1190 例非综合征性耳聋患者 GJB2 基因突变序列分析[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40):2814—2819.

[17] JANG J H, JUNG J, KIM A R, et al. Identification of novel functional null allele of SLC26A4 associated with enlarged vestibular aqueduct and its possible implication[J]. *Audiol Neurootol*, 2014, 19: 319—326.

[18] 赵亮, 王保龙, 孙敬武, 等. 大前庭水管综合征 4 个家系 SLC26A4 基因突变分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(10):1221—1225.

[19] 袁永一, 黄莎莎, 王国建, 等. 27 个省市聋校学生基于 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 突变的全序列分析[J]. *中华耳科学杂志*, 2011, 9(1):17—23.

[20] 王淑娟, 梁鹏飞, 王剑, 等. 50 个聋儿家庭再生育前的基因突变分析研究 [J]. *中华耳科学杂志*, 2015, 13(1):97—100.

[21] 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, 72:245—254.

[22] DU W, WANG Q, ZHU Y, et al. Associations between GJB2, mitochondrial 12S rRNA, SLC26A4 mutations, and hearing loss among three ethnicities [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:746838—746838.

[23] HU H, LIANG D S, WU L Q, et al. Molecular analysis of SLC26A4 gene in a Chinese deafness family [J]. *Zhong Hua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2005, 22:376—379.

(收稿日期:2015-07-08)