

# GJB2 基因突变引起的显性遗传非综合征型 耳聋家系研究\*

戴翔<sup>1</sup> 李隽<sup>2</sup> 胡晞江<sup>1</sup> 童静<sup>1</sup> 蔡文倩<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:检测一显性遗传非综合征型耳聋家系 GJB2、GJB3、GJB6、SLC26A4、线粒体 12SrRNA 和线粒体 tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> 等基因突变情况,探讨其基因型、表型和遗传学特征。方法:收集家系中先证者和部分亲属的临床资料,采集其外周血样本,并提取 DNA。扩增 GJB2、GJB3、GJB6、SLC26A4 基因编码区和线粒体基因耳聋致病相关区域,并以直接测序法进行突变分析。结果:先证者和母亲均携带 GJB2 基因 R75Q 杂合突变,而其他检测基因未见致病突变。结论:GJB2 基因 R75Q 突变引起先证者和母亲常染色体显性遗传非综合征型耳聋。R75Q 能由亲代遗传至子代,基因检查的结果可为进一步生育指导提供帮助。

**[关键词]** 聋;连接蛋白;GJB2;遗传

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.24.009

**[中图分类号]** R764.43 **[文献标志码]** A

## Autosomal dominant hearing loss resulting from mutation in the GJB2 gene: nonsyndromic presentation in a Chinese family

DAI Xiang<sup>1</sup> LI Jun<sup>2</sup> HU Xijiang<sup>1</sup> TONG Jing<sup>1</sup> CAI Wenqian<sup>1</sup>

[<sup>1</sup>Reproduction Medicine Laboratory of Wuhan Medical and Health Center for Women and Children(Wuhan Children's Hospital, Wuhan Women and Children Care Hospital), Wuhan, 430016, China;<sup>2</sup>Department of Otolaryngology of Wuhan Medical and Health Center for Women and Children(Wuhan Children's Hospital, Wuhan Women and Children Care Hospital)]  
Corresponding author: LI Jun, E-mail: junleng@hotmail.com

**Abstract Objective:** To investigate the genotype, phenotype and genetic features. The mutations in GJB2, GJB3, GJB6, SLC26A4 genes, 12SrRNA and tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> were tested in a Chinese family with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. **Method:** Blood samples and clinical data of the proband and her partial family members were collected. DNA was extracted from the blood samples. The GJB2, GJB3, GJB6, SLC26A4 genes, 12SrRNA and tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> mutations were analyzed by polymerase chain reaction(PCR) and direct sequencing. **Result:** Heterozygous mutation of GJB2 R75Q was identified in the proband and her mother. No mutation of other testing genes was detected. **Conclusion:** The R75Q mutation of the GJB2 gene cause autosomal dominant nonsyndromic deafness in the proband and her mother. Children can inherit the R75Q mutation from their parents, so the results of gene testing will be helpful for further guidance of procreation.

**Key words** deafness; connexin; GJB2; heredity

\* 基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(No:2014CKB511)、武汉市卫计委科研项目(No:WX15C20)、武汉市青年科技晨光计划项目(No:200950431210)联合资助

<sup>1</sup> 武汉市妇女儿童医疗保健中心(武汉市儿童医院 武汉市妇幼保健院)生殖医学实验室(武汉,430016)

<sup>2</sup> 武汉市妇女儿童医疗保健中心(武汉市儿童医院 武汉市妇幼保健院)耳鼻咽喉科

通信作者:李隽, E-mail: junleng@hotmail.com

transfer function using a finite element ear model[J]. Med Eng Phys, 2011,33:1136-1146.

[19] SUBOTIC R, MLADINA R, RISAVI R. Congenital bony fixation of the malleus[J]. Acta Otolaryngol, 1998,118:833-836.

[20] DAI C, CHENG T, WOOD M W, et al. Fixation and detachment of superior and anterior malleolar ligaments in human middle ear: experiment and modeling[J]. Hear Res, 2007,230:24-33.

[21] HÜTTENBRINK K B. The functional significance of

the suspending ligaments of the ear ossicle chain[J]. Laryngorhinootologie, 1989, 68:146-151.

[22] NANDAPALAN V, POLLAK A, LANGNER A, et al. The anterior and superior malleal ligaments in otosclerosis: a histopathologic observation [J]. Otol Neurotol, 2002,23:854-861.

[23] NAKAJIMA H H, RAVICZ M E, ROSOWSKI J J, et al. Experimental and clinical studies of malleus fixation[J]. Laryngoscope, 2005,115:147-154.

(收稿日期:2016-09-17)

耳聋是最常见的人类感觉系统缺陷,可由环境和遗传因素造成。耳聋患者中 50%可归因于遗传因素,其中 70%是非综合征型耳聋(NSHL),30%是综合征型耳聋。遗传因素中,GJB2 基因突变是导致耳聋最常见的病因,既可以引起 NSHL,也可以引起综合征型耳聋,其中,以常染色体隐性遗传 NSHL 较为常见,而常染色体显性遗传 NSHL 较为罕见。除 GJB2 外,GJB3、GJB6、SLC26A4 基因以及线粒体 12SrRNA 和线粒体 tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> 等与耳聋密切相关。因此,本研究对一显性遗传 NSHL 家系进行耳聋基因相关的分子病因学研究,分析其基因型、表型和遗传学特征。

### 1 资料与方法

#### 1.1 临床资料

显性遗传 NSHL 家系(图 1),包括先证者及部分亲属均接受了详细的病史和家族史调查,并进行了系统的体格检查。先证者,男,5 个月,汉族人,患有先天性耳聋,其他身体系统未见异常。根据听力损失程度分级标准:轻度(20~40 dB HL)、中度(41~55 dB HL)、中重度(56~70 dB HL)、重度(71~90 dB HL)、极重度( $\geq 91$  dB HL)<sup>[1]</sup>,对受检者及部分亲属进行听力检查,结果显示先证者为双耳重度感音神经性聋。父亲轻度听力损失,其他身体系统未见异常;母亲双耳极重度感音神经性聋,其他身体系统未见异常;家族中,先证者外祖父为双耳重度耳聋患者,其他家属未见听力或其他身体系统异常。先证者母亲孕期无疾病、外伤及耳毒性药物应用史。选取听力正常且其他系统无明显异常者 180 例作对照组,其中男 86 例,女 94 例,年龄 3~35 岁,平均(16.7 $\pm$ 12.2)岁,中位数 5.3 岁。该项目的伦理论证由武汉市妇女儿童医疗保健中心伦理委员会认可。

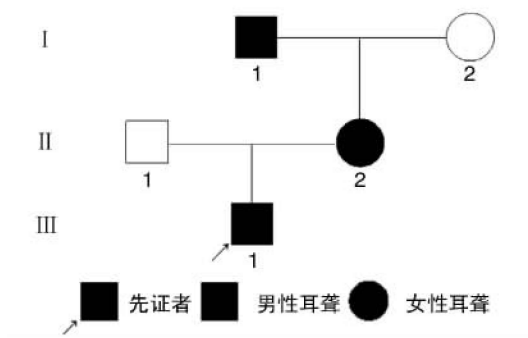


图 1 家系图

#### 1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 根据知情同意原则,对受检者(包括患者、患者父母及部分亲属和正常对照组)以 EDTA 抗凝采集静脉血样本 2ml。应用

Genomic DNA Purification Kit(Promega 公司)从受检者静脉血样本中提取基因组 DNA,经过紫外分光光度计定量及纯度分析后,保存于-20℃备用。

1.2.2 PCR 反应 扩增 GJB2 基因全部编码区序列,F:5'TGCTCAGGAAGAGATTTAAGC 3',R:5'TAGCGACTGAGCCTTGAC 3',产物 893 bp,引物由上海生工合成。扩增反应体系(10  $\mu$ l):0.5  $\mu$ l 基因组 DNA(约 50 ng),正反引物(5  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ l,GoTaq Master Mix(Promega 公司)5  $\mu$ l,加去离子水至 10  $\mu$ l。扩增反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 30 s,共循环 30 次,最后 72℃ 再延伸 7 min,4℃ 保温。另外,本研究还扩增 GJB3、GJB6、SLC26A4 基因全部编码区序列,以及线粒体 12SrRNA 和线粒体 tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> 等与耳聋密切相关的基因,其扩增引物、体系和反应条件参考文献报道<sup>[2-5]</sup>。

1.2.3 DNA 测序与突变分析 PCR 产物经 Cycle-Pure Kit(OMEGA 公司)纯化后行 Sanger 正反向直接测序,由 ABI 公司 3130 型基因分析仪进行测序分析,引物与 PCR 引物相同。测序结果经 Sequencing Analysis 5.2 与 GeneTool 分析比对后确定突变位点,标准序列参考 GenBank 的基因数据库。

#### 2 基因测序结果

直接测序 GJB2 基因显示,先证者与母亲均为 GJB2 基因 R75Q(c. 224G>A) 杂合突变(图 2)。先证者与母亲 GJB3 基因编码区、GJB6 基因编码区测序未见致病突变。其他受检者 GJB2 基因编码区测序未见 R75Q 突变及其他致病突变,GJB3 和 GJB6 基因编码区测序未见异常。180 例正常对照组样本 GJB2 基因测序未见 R75Q 突变。所有受检者的 SLC26A4 基因、线粒体 12SrRNA 和线粒体 tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> 测序未发现致病突变。

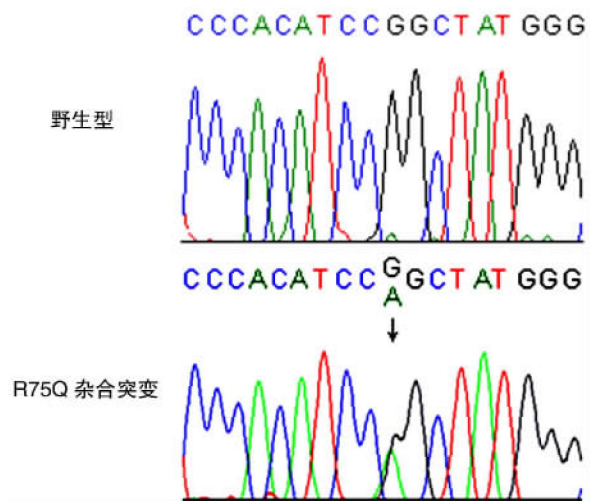


图 2 GJB2 基因测序图

### 3 讨论

由 GJB2 基因编码的连接蛋白 26 (Cx26) 是一种缝隙连接蛋白,它能构成细胞间信息交换的通道,在耳蜗毛细胞  $K^+$  离子循环中发挥重要作用,其功能异常或缺失为耳聋发生的常见病因。Cx26 除表达于耳蜗感觉毛细胞周围的支持细胞中,还表达于白齿类动物的上皮细胞,主要分布在皮肤的掌跖部。在 Cx26 的结构中,第 1 个细胞外区 (E1) 和第 2 个跨膜区 (M2) 接合处的第 75 位精氨酸非常保守,对维持 Cx26 的正常结构与功能至关重要。目前,在该位点发现的突变有 R75W 和 R75Q 两种,均能引起常染色体显性遗传性耳聋,但两种突变型引起的临床表现(主要体现在皮肤异常方面)存在差异。R75W 的患者多为耳聋合并掌跖角化症,而 R75Q 的耳聋患者有合并皮肤异常者,也有不表现明显皮肤疾病者<sup>[6]</sup>。本研究中,由 R75Q 引起的不伴皮肤异常的 NSHL 家系在中国大陆人群中尚属首例。

目前,国际上报道的 R75Q 较少,既能引起伴有皮肤异常的综合征型耳聋,也能引起不伴皮肤异常的 NSHL。Feldmann 等<sup>[7]</sup>报道了两个由 R75Q 引起的常染色体显性遗传听力损失的法国家庭。第 1 个家庭中,母亲和儿子耳聋但不伴随皮肤疾病,并且儿子听力损失极重而母亲为中重度聋,母亲为 R75Q 新发突变。第 2 个家庭中,父亲与两个女儿均为神经性耳聋并伴皮肤病。父亲双侧轻度聋(18 岁诊断)及掌跖角化症(婴儿期开始);大女儿双侧轻度聋,呈进行性(10 岁诊断,并在过去一年下降了 12 dB),合并双掌鱼鳞病无角化,无双侧跖部皮肤病征;小女儿 8 岁,双侧中度聋也呈进行性(4 岁诊断,每年下降 30 dB),并伴掌跖角化症(2 岁起)。Jiang 等<sup>[8]</sup>报道了一个由 R75Q 引起的常染色体显性遗传听力损失并伴随掌跖角化综合征 (PPK) 的家系。家系中 3 个患者呈现重度到极重度耳聋并伴有 PPK,且皮肤异常的发病均不是婴儿期,而是后期发展而来。作者通过皮肤组织活检及免疫组织化学检测到 Cx26 累积在患者掌部表皮的表皮突上层中,并试图以此解释患者 PPK 的成因。Piazza 等<sup>[9]</sup>报道了一个意大利家系,其中 4 例患者由 R75Q 引起常染色体显性遗传听力损失,但不伴随皮肤异常 PPK。并且,作者通过细胞学方法研究 R75Q 突变型 Cx26 的功能改变时,发现 R75Q 突变型 Cx26 完全抑制细胞间通信功能通道的形成。Lossa 等<sup>[10]</sup>报道的一个意大利家系中,一位携带 R75Q+c.35delG 杂合突变的成员未见听力和皮肤系统异常。作者分析认为,可能由于 R75Q 与 c.35delG 发生在同一等位基因上,而处在 DNA 序列 35 位 G 缺失使处在 224 位的突变也失去了作用,这进一步提示 R75Q 突变引起的功能改变属于

显性抑制作用。

本研究中,GJB2 基因 R75Q 杂合突变是患者和母亲耳聋的致病原因,然而,患者、患者母亲和家族中的其他耳聋成员均未发现皮肤疾病。已有的关于 R75Q 的报道和研究,包括处于同一氨基酸序列位置的突变 R75W 的相关研究<sup>[11-12]</sup>,仅能提示 75 位精氨酸的突变与显性遗传性耳聋的密切关系,却无法解释皮肤异常的原因。皮肤异常可能还需要其他因素共同参与,已有研究证实 R75W 突变型 Cx26 可以抑制野生型 Cx30 和野生型 Cx43 的功能,而 Cx30 和 Cx43 的异常同样能引起耳聋和皮肤疾病<sup>[13-15]</sup>。分析已报道的 R75Q 突变家系,可以发现皮肤异常的特征具有一定家族性,即同一家系中的患者均表现出皮肤疾病,或均不伴随皮肤异常,提示,R75Q 突变引起皮肤疾病可能还与一定的遗传背景相关。本研究的结果进一步支持 R75Q 是引起显性遗传性耳聋的原因,而皮肤表型正常提示 R75Q 不是皮肤疾病的充分条件,皮肤异常可能还与环境、遗传背景和其他基因等因素有关。

### 参考文献

- [1] 田勇泉,韩东一,迟放鲁,等.耳鼻咽喉头颈外科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:353-353.
- [2] YANG J J, WANG W H, LIN Y C, et al. Prospective variants screening of connexin genes in children with hearing impairment: genotype/phenotype correlation[J]. Hum Genet, 2010,128:303-313.
- [3] YANG X L, BAI-CHENG X, CHEN X J, et al. Common molecular etiology of patients with nonsyndromic hearing loss in Tibetan, Tu nationality, and Mongolian patients in the northwest of China[J]. Acta Otolaryngol, 2013,133:930-934.
- [4] ADHIKARY B, GHOSH S, PAUL S, et al. Spectrum and frequency of GJB2, GJB6 and SLC26A4 gene mutations among nonsyndromic hearing loss patients in eastern part of India[J]. Gene, 2015, 573: 239-245.
- [5] TANG X, ZHENG J, YING Z, et al. Mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) variants in 2651 Han Chinese subjects with hearing loss[J]. Mitochondrion, 2015, 23: 17-24.
- [6] BIRKENHAGER R, LUBLINGHOFF N, PRERA E, et al. Autosomal dominant prelingual hearing loss with palmoplantar keratoderma syndrome: Variability in clinical expression from mutations of R75W and R75Q in the GJB2 gene[J]. Am J Med Genet A, 2010,152A:1798-1802.
- [7] FELDMANN D, DENOYELLE F, BLONS H, et al. The GJB2 mutation R75Q can cause nonsyndromic hearing loss DFNA3 or hereditary palmoplantar keratoderma with deafness[J]. Am J Med Genet A, 2005,137:225-227.

(下转第 1945 页)

综上所述,鼻咽癌是由多种因素所致的病因未明的疾病,其中年龄和遗传基因多态性都是重要的病因因素。RTN4 基因多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点的 AG 单倍型与鼻咽癌具有相关性,单倍型 AG 的携带者可降低广西壮族人群鼻咽癌的易感性,即单倍型 AG 可作为鼻咽癌的保护因素。但仍需进一步扩大样本量的研究,及严格控制各种流行病学风险因素的影响,如饮食、EB 病毒感染等,进一步探究 RTN4 基因多态性与鼻咽癌之间确切的分子作用机制。

#### 参考文献

- [1] 刘叶花,杨磊,丘福满,等. 核因子- $\kappa$ B1 基因启动子区多态性与广东地区鼻咽癌的关联研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(12): 2185-2188.
- [2] 鲁明寿,孔庆志,许新华,等. MKK4 基因启动子区-1304T/G 多态性与散发性鼻咽癌易感性的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(4): 287-290.
- [3] 周华茂,张志伟,刘重元,等. RNT4 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(11): 704-707.
- [4] TENG F Y, TANG B L. Cell autonomous function of Nogo and reticulons; The emerging story at the endoplasmic reticulum [J]. J Cell Physiol, 2008, 216: 303-308.
- [5] 韦贵将,杨凤莲,陆璐,等. OPN 基因多态性与广西壮族人群鼻咽癌易感性的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(7): 489-492.
- [6] SHI S, ZHOU B, WANG Y, et al. Genetic variation in RTN4 3'-UTR and susceptibility to cervical squamous cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2012, 31: 1088-1094.
- [7] 韦叶生,韦传东,王俊利,等. CD40 基因单核苷酸多态性及单倍型与缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(3): 283-286.
- [8] 李玉媚,王辉,康敏,等. AS-miR-21 对鼻咽癌转移潜能及其对 Bcl-2 调控作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(21): 1671-1675.
- [9] ZHANG K, BAI P, SHI S, et al. Association of genetic variations in RTN4 3'-UTR with risk of uterine leiomyomas [J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19: 475-479.
- [10] LU D Y, MAO X H, ZHOU Y H, et al. RTN4 3'-UTR insertion/deletion polymorphism and susceptibility to non-small cell lung cancer in Chinese Han population [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15: 5249-5252.
- (收稿日期:2016-08-26)
- (上接第 1941 页)
- [8] JIANG S J, DI Z H, HUANG D, et al. R75Q de novo dominant mutation of GJB2 in a Chinese family with hearing loss and palmoplantar keratoderma [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2014, 78: 1461-1466.
- [9] PIAZZA V, BELTRAMELLO M, MENNITI M, et al. Functional analysis of R75Q mutation in the gene coding for Connexin 26 identified in a family with non-syndromic hearing loss [J]. Clin Genet, 2005, 68: 161-166.
- [10] LOSSA S, CHINETTI V, CORVINO V, et al. R75Q dominant mutation in GJB2 gene silenced by the in Cis recessive mutation c. 35delG [J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A: 2658-2660.
- [11] CHEN Y, DENG Y, BAO X, et al. Mechanism of the defect in gap-junctional communication by expression of a connexin 26 mutant associated with dominant deafness [J]. FASEB J, 2005, 19: 1516-1518.
- [12] MINEKAWA A, ABE T, INOSHITA A, et al. Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission [J]. Neuroscience, 2009, 164: 1312-1319.
- [13] ROUAN F, WHITE T W, BROWN N, et al. trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation [J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 11): 2105-2113.
- [14] YUM S W, ZHANG J, SCHERER S S. Dominant connexin26 mutants associated with human hearing loss have trans-dominant effects on connexin30 [J]. Neurobiol Dis, 2010, 38: 226-236.
- [15] PANDEY N, XAVIER D F, CHATTERJEE A, et al. Functional Analysis of a Novel Connexin30 Mutation in a Large Family with Hearing Loss, Pesplanus, Ichthyosis, Cutaneous Nodules, and Keratoderma [J]. Ann Hum Genet, 2016, 80: 11-19.
- (收稿日期:2016-08-01)