

新生儿 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 基因突变筛查结果分析*

柴福¹ 赵海亮¹ 邱书奇¹

[摘要] 目的:分析深圳部分地区新生儿耳聋常见基因 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 基因突变的结果,了解基因突变的携带率,发现基因型和表型之间的潜在联系,为耳聋的预防和治疗提供依据。方法:研究对象为 2014-06-2015-06 期间深圳某医院的 501 例新生儿。采足跟血,提取 DNA。应用飞行质谱技术对以上 4 个常见突变基因的 20 个位点进行检测,包括 SLC26A4(1226G>A,1229C>T,281C>T,589G>A,IVS7-2A>T,1174A>T,IVS15+5G>A,1975G>C,2027T>A,2162C>T,2168A>G),GJB2(176-191 del16,35 delG,167 delT,235 delC,299-300 delAT),GJB3(547G>A,538C>T)及线粒体 DNA12SrRNA(1555A>G,1494C>T)。同时进行听力筛查。结果:501 例新生儿中 26 例(5.19%)检出突变位点。GJB2 基因突变 9 例,阳性率为 1.796%,均为 235 delC 杂合突变。GJB3 基因突变 3 例,阳性检出率为 0.599%。SLC26A4 基因突变 12 例,阳性检出率为 2.395%,其中 IVS7-2A>T 杂合突变 5 例。线粒体 DNA12SrRNA 基因突变 3 例,均为 1555A>G 同质突变。其中 1 例 SLC26A4 基因 2168A>G 杂合突变,初筛右耳未通过,3 个月时检测通过;11 个月时家长发现听觉问题,检测结果为右侧 110 dBnHL,左侧 70 dBnHL;确诊为前庭导水管扩大。结论:GJB2 基因的 235 delC 突变是最常见的突变位点,而 SLC26A4 基因突变是深圳市部分地区最常见的突变基因。进一步完善 SLC26A4 基因的分子遗传机制,有利于迟发性聋的早期预警及耳聋基因携带者的遗传咨询。

[关键词] 新生儿;基因突变;聋

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.09.003

[中图分类号] R764.3 [文献标志码] A

An analysis of the mutation in GJB2, GJB3, SLC26A4 and mtDNA12SrRNA in new born

CHAI Fu ZHAO Hailiang QIU Shuqi

(Longgang ENT Hospital, Institute of ENT and Shenzhen Key Laboratory of ENT, Shenzhen, 518172, China)

Corresponding author: CHAI Fu, E-mail: chaifusx@126.com

Abstract Objective: To analyze deafness gene mutation in GJB2, GJB3, SLC26A4 and mtDNA12SrRNA in newborn and to explore the significance of genetic test and potential correlations between the genotype and clinical phenotype. **Method:** Blood samples were collected with a standard protocol and DNA templates are extracted from 501 newborn in Longgang of Shenzhen. MALDI-TOF-MS Technology was used to detect the coding region twenty mutations sites of GJB2, GJB3, SLC26A4 AND mtDNA12SrRNA, including SLC26A4(1226G>A, 1229C>T, 281C>T, 589G>A, IVS7-2A>T, 1174A>T, IVS15+5G>A, 1975G>C, 2027T>A, 2162C>T, 2168A>G), GJB2(176-191del16, 35delG, 167delT, 235 delC, 299-300 delAT), GJB3(547G>A, 538C>T), mtDNA12SrRNA(1555A>G, 1494C>T). While two-step hearing screening was carried by using AABR(automated auditory brainstem response) and DPOAE. **Result:** In the 501 newborns, 26 cases were found have one or two allele mutations of deafness-susceptibility genes. GJB2 gene mutation(n=9, 1.796%) all were 235 delC single heterozygosity mutation. GJB3 gene mutation(n=3, 0.599%). SLC26A4 gene mutation(n=12, 2.395%) included IVS7-2A>G heterozygosity mutation(n=5). MtDNA 12Rrna gene mutation was found in 3 child(n=3, 0.599%). Finally one of 26 infants was diagnosed enlarged vestibular aqueduct syndrome. The infant was detected 2168A>G heterozygosity mutation. **Conclusion:** 235delC is the main mutation form of GJB2 gene, while it is the hottest mutation in People. But SLC26A4 gene mutations are the main type in newborn. MtDNA 12Rrna gene mutation was found in 3 child. This genetic epidemiological study demonstrated that genetic screening is helpful for determining high risk individuals and early discovering possible late-onset hearing loss. Moreover patients and family member can acquire more effective genetic counseling.

Key words new born; gene mutation; hearing loss

* 基金项目:深圳市耳鼻咽喉疾病重点实验室(No:ZDSYS201506050935272);深圳市科技研发资金(No:20160429091935720)
¹ 深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院 深圳市耳鼻咽喉研究所(深圳,518172)
通信作者:柴福, E-mail: chaifusx@126.com

耳聋是临床常见的一种疾病,在新生儿中的发病率约为 0.15%^[1]。其中遗传因素占 60%~80%,70%为非综合征性聋(non-syndromic sensorineural hearing loss, NSHL),其特点是除了听力下降外没有其他疾病特征^[2],而耳聋易感基因的部分位点呈现热点突变的特点,包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 突变最为常见^[3]。国内报道多为这些基因的 8 个或 9 个位点,不利于准确高效地发现潜在的高危耳聋患者^[4-5]。本文通过飞行质谱技术,对深圳部分地区常见 4 个基因 20 个位点进行新生儿基因筛查。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究对象为深圳地区某医院 2014-06-2015-06 期间出生的 501 例新生儿,男 289 例,女 212 例,均无明显畸形。均通过家属询问家族史、怀孕史、病毒感染史等,并签订听力筛查和基因检测知情同意书。

新生儿出生 72 h 内采足跟血,75%乙醇棉签消毒针刺部位,用一次性点刺针采集足跟血,分别充满 4 个直径 1 cm 的圆圈采血片,血样采集后,自然晾干保存,送检。

1.2 基因检测方法

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术,具体方法参考曾云等^[3]的方法,本组标本在华大基因临床检测中心完成。

1.3 检测过程

应用提取 DNA 试剂盒提取 DNA,紫外分光光度计进行定量和纯度检测。根据基因型和 20 个突变位点的位置设计扩增引物和延伸引物(扩增程序为:94℃预热 5 min,然后 94℃、45 s,72℃、45 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 3 min)。为去除扩增反应中剩余的 dNTP,利用虾碱式磷酸酶对 PCR 产物进行处理。用延伸引物分别对纯化后的 PCR 产物进行单碱基延伸反应。为去除盐离子,利用阳离子交换树脂对 PCR 延伸产物进行纯化。针对位点设计测序引物,对样本进行直接测序及数据分析。

1.4 新生儿听力筛查

在新生儿出生后 48~72 h 内进行初筛,初筛未通过者在 42 d 时进行复筛。新生儿听力初筛和复筛采用自动听性脑干反应(automated auditory brainstem response, AABR),仪器为 CE-Cirp 型 AABR 仪(德国 MAICO Diagnostic GmbH 公司)。复筛仍未通过,在耳鼻咽喉研究所进行听力学检查,包括畸变产物耳声发射(DPOAE)、声导抗、ABR 和听性稳态反应(ASSR)等检查,进行听力学诊断。必要时行颞骨 CT 检查。

2 结果

2.1 基因检测

501 例新生儿共 26 例检测出突变位点(5.190%)。GJB2 基因突变 9 例,阳性率为 1.796%,均为 235 delC 杂合突变。GJB3 基因突变 3 例,阳性检出率为 0.599%。SLC26A4 基因突变 12 例,阳性检出率为 2.395%,其中 IVS7-2A>T 杂合突变 5 例。线粒体 DNA12SrRNA 基因突变 3 例,均为 1555A>G 同质突变。每个基因具体的突变位点见表 1。

表 1 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 基因突变位点检测结果

基因及突变位点	检测结果			例
	杂合突变	纯合突变	同质突变	
GJB2				
176-191del16	—	—	—	—
35delG	—	—	—	—
167delT	—	—	—	—
235 delC	9	—	—	1.796
299-300 delAT	—	—	—	—
GJB3				
538C>T	1	—	—	0.200
547G>A	1	—	—	0.200
SLC26A4				
281C>T	—	—	—	—
589G>A	1	—	—	0.200
IVS7-2A>G	5	—	—	0.998
1174A>T	1	—	—	0.200
1226G>A	—	—	—	—
1229C>T	2	—	—	0.399
IVS15+5G>A	—	—	—	—
1975G>C	1	—	—	0.200
2027T>A	1	—	—	0.200
2162C>T	—	—	—	—
2168A>G	1	—	—	0.200
线粒体 DNA12SrRNA				
1494C>T	—	—	—	—
1555A>G	—	—	2	0.399
GJB3/ DNA12SrRNA				
547G>A	1	—	—	0.200
1555A>G	—	—	1	0.200

注:其中同时发生 2 个位点突变 1 例,GJB3 的 547G>A 为杂合突变,12SrRNA 为同质突变。

2.2 26 例基因突变患儿的听力学检测结果

25 例初筛通过。1 例 SLC26A4 基因 2168A>G 杂合突变,初筛右耳未通过,3 个月时检测通过,11 个月时家长发现听觉问题,检测结果为右侧 110 dBnHL,左侧 70 dBnHL。CT 检查确诊为前庭导水管扩大。

3 讨论

本组样本共 501 例,GJB2、GJB3、SLC26A4、

线粒体 DNA 12SrRNA 共 4 个基因 20 个位点, 26 例发现基因突变, 总体阳性检出率为 5.190%, 本结果与蓝培基等^[6]的检测结果相近。由于耳聋常见基因 20 个位点的报道较少, 本组样本的总阳性率高于仅有 3 个耳聋基因(GJB2、SLC26A4、线粒体 DNA 12SrRNA) 8 个检测位点或 4 个基因 9 个位点的样本(增加检测 GJB3 的 538C>T 位点)^[4-5]。SLC26A4 基因突变类型多样, 频谱广泛, 目前已报道的突变近 200 余种, 分布在除外显子 1 和外显子 20 之外的所有外显子。由于 SLC26A4 基因定位在 7q31, 包含 21 个外显子, 编码的 Pendrin 蛋白有 12 个跨膜区, 主要负责介导氯离子转运并维持内淋巴平衡。中国大前庭水管综合征(large vestibular aqueduct syndrome, LVAS)的患者中检出的 SLC26A4 基因突变超过 50 余种。流行病学研究发现, 外显子 10、15、17、19 和内含子 7 构成了国内 LVAS 患者 SLC26A4 基因突变的热点区域, 为 SLC26A4 基因高效、准确、大规模的普筛增加了可行性^[7]。故本研究选择 20 个位点的检测方法, 增加了 SLC26A4 基因的检出率。

由于检测策略的变化, 4 个耳聋基因中最易突变的基因为 SLC26A4, 共 12 例(2.395%), 与蓝培基等^[6]的结果相似, 而与其他认为 GJB2 基因为最常见的突变基因的观点不同是由于在突变位点的选择上^[4-5]。因此, 优化常见基因筛查突变位点的数量位置十分必要。本文 GJB2 基因占 1.796%; GJB3 和线粒体 DNA 12SrRNA 基因各检出 3 例。由于耳聋易感基因突变谱在不同地区和民族有明显差异^[8], 深圳地区 SLC26A4 突变同样较高, GJB2 次之, 但 GJB3 和线粒体 DNA 12SrRNA 基因各检出 3 例, 而韶关地区 GJB3 检出率为 0。因此明确本地区的耳聋易感基因非常必要。

本研究中最易突变的基因位点仍为 GJB2 的 235 delC, 阳性检出率为 1.796%, 与杨淑梅等^[5]的研究结果一致, GJB2 的 235 delC 是亚洲人群热点突变。SLC26A4 基因的突变位点有 7 个, 其中 IVS7-2A>G 突变率最高, 与戴朴等^[9]的结论一致, 阳性率为 0.998%, 1229C>T 杂合突变 2 例, 其余 5 个位点各 1 例。临床应重视 SLC26A4 基因突变携带者的遗传咨询, 避免携带者结合而出现复合基因突变的新生儿出生。

本组 26 例基因突变, 其中 2 例线粒体 DNA 12SrRNA 同质突变, 23 例为常染色体杂合突变, 1 例同时携带 GJB3 杂合突变和线粒体 12SrRNA 同质突变。其中 GJB2 基因突变 9 例, 属常染色体隐性遗传, 听力筛查均通过。

SLC26A4 基因杂合突变 12 例, 属常染色体隐性遗传性聋, 其中 1 例 SLC26A4 基因 2168A>G 杂合突变, 初筛右耳未通过, 3 个月时检测通过。

11 个月时家长发现听觉问题, 经高分辨率 CT 检查及听力学声导抗、ABR 检测, 双耳反应阈值: 右耳 110 dBnHL, 左耳 75 dBnHL, 确诊为前庭导水管扩大。该患儿遗传性聋的可能性大, 应进一步进行 SLC26A4 基因的全序列检测, 进一步明确其分子生物学病因。其余 11 例为听力筛查通过者, 可能为 SLC26A4 基因突变携带者; 但并不排除 SLC26A4 基因可能携带其他未知或罕见的致聋突变, 或携带其他未知或罕见的致聋基因突变, 应注意避免各种听力损失及颅内压增高因素, 密切进行听力学随诊, 必要时行影像学检查(颞骨高分辨率 CT 或内耳道 MRI 水成像)及耳聋基因诊断。

有研究认为 GJB3 基因突变可引起常染色体显性或隐性遗传性 NSHL, 本组 3 例杂合突变患儿听力筛查均通过, 有待进一步观察及随访。

本研究提示, 新生儿基因筛查应优化基因突变位点的选择, 有利于大规模准确、高效的新生儿普筛, 发现潜在的耳聋患儿, 对于 SLC26A4 基因突变携带者应严密随访听力学变化。本组 3 例线粒体 DNA 12SrRNA 的 1555A>G 的同质突变, 对其预防耳聋的发生提供了最准确的分子基础, 避免氨基糖甙类药物的使用是预防耳聋的基本方法。对耳聋基因携带者进行预防耳聋的宣教和随访, 对其家庭进行遗传咨询, 可避免家庭聋儿的出生。

参考文献

- [1] 韩德民. 新生儿听力及耳聋基因联合筛查[J]. 中国医学文摘(耳鼻咽喉科学), 2012, 27(6): 290-292.
- [2] LAZAR C, POPP R, TRIFA A, et al. Prevalence of the c. 35delG and p. W24X mutation in the GJB2 gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2010, 74: 351-355.
- [3] 曾云, 姜丹, 冯大飞, 等. 飞行时间质谱检测技术在非综合征型耳聋基因检测中的应用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 48(12): 985-990.
- [4] 李振安, 梁淑贞, 余凤慈, 等. 佛山市 10 238 例新生儿听力与耳聋易感基因联合筛查分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2014, 22(6): 585-588.
- [5] 杨淑梅, 杨杰, 伍燕飞, 等. 2 305 例危重新生儿耳聋基因筛查[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(21): 3662-3665.
- [6] 蓝培基, 陈亚军, 刘毅, 等. 韶关市新生儿 4 个基因 20 个位点筛查结果分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(2): 150-151.
- [7] 王秋菊, 杜婉. 大前庭水管综合症的诊断与遗传咨询[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(6): 630-635.
- [8] 李磊, 杨涛, 吴皓. 耳聋基因的筛查与诊断[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(5): 409-410.
- [9] 戴朴, 韩东一, 冯勃, 等. 大前庭水管综合症的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(5): 303-307.

(收稿日期: 2017-03-09)