

# 两个非综合征性聋家系突变分析及孕早期产前诊断

郭芬芬<sup>1</sup> 程璐<sup>1</sup> 徐盈<sup>1</sup> 张建芳<sup>1</sup> 李春艳<sup>1</sup> 郑娇<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:明确 2 个非综合征性聋家系的致病基因,为有再生育需求的家庭提供准确的遗传咨询和孕早期产前诊断服务,明确胎儿的基因型,进行早诊断早干预,预防聋儿的出生。方法:选取 2 个均生育过 1 个重度感音神经性聋患儿的家庭,采集先证者及其父母的外周血提取 DNA,采用遗传性聋检测试剂盒(PCR-反向杂交法)和一代测序技术,明确受检者基因型后,对有再生育需求的家庭,在母亲孕 10~12 周抽取绒毛检测胎儿基因型并进行出生后随访。结果:2 个家庭中,1 号家庭先证者为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT 复合杂合突变,父母双方均为 SLC26A4 基因杂合突变携带者;2 号家庭先证者为 GJB2 基因 c. 605ins46/c. 512insAACG 复合杂合突变,父母双方均为 GJB2 基因杂合突变携带者;产前诊断结果表明,1 号家庭胎儿基因型为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT 复合杂合突变,与其先证者基因型一致,随访胎儿未出生。2 号家庭胎儿 GJB2 基因序列未见异常,随访新生儿听力正常。结论:遗传性聋基因检测技术结合产前诊断对有再生育需求的耳聋家庭起到显著的指导作用,尤其是早孕期的产前诊断,能做到早诊断、早发现、早干预,有效降低了耳聋患儿的出生率。

**[关键词]** 非综合征性聋;绒毛;产前诊断;GJB2;SLC26A4

doi:10. 13201/j. issn. 1001-1781. 2018. 20. 009

**[中图分类号]** R764. 43 **[文献标志码]** A

## Mutation analysis and early pregnancy prenatal diagnosis for two families affected with non-syndromic hearing loss

GUO Fenfen CHENG Lu XU Ying ZHANG Jianfang LI Chunyan ZHENG Jiao

(Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, 710032, China)

Corresponding author: ZHANG Jianfang, E-mail: zhzhhao@163. com

**Abstract Objective:** The aim of this study is to identify the pathogenic genes of two non-syndromic hearing loss families, provide accurate genetic counseling and early pregnancy prenatal diagnosis services for second birth families, which determine the genotype of the fetus, early diagnosis and early intervention to prevent the birth of deaf children. **Method:** Two families with a severe sensorineural hearing loss were enrolled in this study. Genomic DNA was extracted from the peripheral venous blood of the proband and parents. The mutations of the four hearing loss susceptibility genes were analyzed by the hereditary hearing loss gene detection kit (PCR reverse hybridization) and Sanger sequencing. After confirming the genotype of the subject, the genotype of the fetus was examined for the fetus with 10 to 12 weeks of gestation, and the neonates were diagnosed with prenatal diagnosis. **Result:** In the two families, the No. 1 family proband was the compound heterozygous mutation of SLC26A4 gene c. IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT, and parents were carriers. The prenatal diagnosis showed that the fetal genotype of No. 1 family was a compound heterozygous mutation, and the fetus was not born. The No. 2 family proband genotype was the compound heterozygous of GJB2 gene c. 605ins46/c. 512insAACG, and the parents were both carriers. The No. 2 family, the prenatal diagnosis showed the fetal genotype of No. 2 family GJB2 gene sequence was normal, the newborn passed the hearing screening. **Conclusion:** Genetic testing of hereditary hearing loss combined with prenatal diagnosis plays a significant role in guiding deaf children with re-fertility needs, especially prenatal diagnosis in early pregnancy, which can achieve early diagnosis, early detection and early intervention, effectively reducing The birth rate of children with deafness.

**Key words** non-syndromic hearing loss; fetal villi; prenatal diagnosis; GJB2; SLC26A4

我国每年新生儿中重度以上耳聋的发病率为 0. 1%,严重影响着出生人口质量<sup>[1]</sup>。耳聋患者中有 80%~90% 为先天性遗传性聋<sup>[2]</sup>,目前有大约 80 个基因被鉴定出来与遗传性聋相关,67 个常染

色体隐性遗传基因,3 个常染色体显性遗传基因,3 个 X 连锁基因及 7 个线粒体基因<sup>[3]</sup>。从我国大规模的聋病分子流行病学调查来看,大部分非综合征性聋由 GJB2、SLC26A4、GJB3 及 12S rRNA 基因的突变引起,这 4 种基因引起的非综合征性遗传性聋约占整个遗传性聋的 80%<sup>[4]</sup>。我国正常听力人

<sup>1</sup>空军军医大学西京医院妇产科(西安,710032)  
通信作者:张建芳,E-mail:zhzhhao@163. com

群中 GJB2、SLC26A4、线粒体基因突变的携带率分别为 3%、3% 和 0.3%，总体携带率约为 6%<sup>[5]</sup>。耳聋主要的遗传方式为常染色体隐性遗传<sup>[6]</sup>，根据孟德尔遗传定律，携带相同致聋基因的夫妇有 25% 的概率生育一个聋儿<sup>[7]</sup>。因此，在临床上开展遗传性聋基因筛查及产前诊断尤为重要，对预防聋儿出生有着重要意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2017-01—2018-01 在我院就诊的 2 个均生育过 1 个重度感音神经性聋患儿的家庭，采集先证者及父母双方的病史资料，包括一般信息、出生史、耳聋发病年龄、家族史、个人史（耳聋前传染病史、耳毒性药物使用史、头部外伤史等）、母亲孕产史等。

### 1.2 材料

外周血采集：采集先证者及其父母外周血 4 ml（EDTA 抗凝管），经西安天隆科技有限公司全自动全血提取仪提取全血基因组 DNA，置于 -20℃ 冰箱保存备用。

绒毛采集在签署知情同意书下，两名孕妇在孕 11 周进行羊膜腔穿刺术，由本中心的产前诊断医生抽取胎儿绒毛样本，样本抽取湿重 20 mg，挑取典型绒毛支 3~5 支用于产前基因诊断，剩余绒毛用于细胞培养进行染色体分析。用于基因检测的绒毛沉渣采用深圳凯杰公司组织细胞 DNA 提取试剂盒提取绒毛 DNA，置于 -20℃ 冰箱保存备用。

### 1.3 方法

**1.3.1 耳聋基因检测（PCR-反向点杂交法）** 应用遗传性聋基因检测试剂盒（深圳亚能生物技术有限公司）检测 4 个热点基因（GJB2、GJB3、SLC26A4 和 12S rRNA）16 种突变位点，包括 GJB2 上 4 种突变型（35delG、176-191del 16、235delC、299-300delAT），GJB3 上 2 种突变型（538C>T、547G>A），SLC26A4 上 8 种突变型（IVS7-2A>G、2168A>G、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A），12S rRNA 基因上 2 种突变型（1494C>T、1555A>G）。操作步骤参考试剂盒说明书。

**1.3.2 产前诊断** 对于明确病因的家庭，夫妻双方要求行耳聋基因产前诊断的，在签署耳聋基因产前诊断知情同意书后，在 B 超定位下抽取绒毛，经

离心后提取 DNA。检测致病位点，明确胎儿基因型。

**1.3.3 STR 鉴别母体污染** 采用 QT-PCR 技术，在 ABI 公司 3500XLsystem 测序仪上对孕妇及胎儿绒毛样本的 16 个 STR 位点（D3S1358、TH01、D21S11、D18S51、PentaE、D5S818 等）进行测定<sup>[8]</sup>，然后利用软件自动分析等位基因的基因型。

**1.3.4 PCR 扩增及一代测序分析** 使用凯杰 Expert 测量提取的样本 DNA 的浓度及纯度，浓度为 40~100 ng/μl，OD 值 260/280 在 1.7~2.0 之间。通过耳聋基因检测试剂盒仅检测出杂合突变或没有检出突变的患者，则对 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 12S rRNA 这 4 个基因进行全编码区序列分析，引物设计，扩增体系、温度、时间等设置参照文献<sup>[9]</sup>。PCR 反应产物送西安擎科生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果

### 2.1 耳聋基因检测试剂盒检测结果

首先对 2 个家庭的先证者及父母双方行耳聋基因检测，查中国人常见的 4 个基因的 16 个热点突变，检测结果见表 1。通过耳聋基因检测试剂盒未明确先证者病因者，即仅检测到杂合突变或没有检出突变者，则对 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 12S rRNA 基因进行全编码区序列分析。

### 2.2 STR 鉴别母体污染结果

2 例行介入性产前诊断的孕妇均无宫内感染、流产、早产等并发症，经 STR 鉴别，均排除母体污染。

### 2.3 一代测序和产前诊断结果

1 号家庭：孕妇 33 岁，孕 10 周，孕妇本人及丈夫听力正常，曾生育一子，现年 6 岁，患儿 2 岁半时出现听力障碍，听力波动性下降，纯音测听提示双耳重度感音神经性聋，颞骨 CT 检查结果为前庭导水管扩大综合征，要求进行耳聋基因检测和产前诊断。本中心对其一家三口采集外周血，耳聋基因检测结果显示先证者为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT 复合杂合突变，母亲为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 杂合突变，父亲为 SLC26A4 基因 c. 2177insCTAT 杂合突变，父母双方听力正常均为 SLC26A4 基因突变携带者。在孕 11 周对孕妇抽取绒毛分别进行耳聋基因检测和细胞培养染色体核型分析，产前诊断结果表明，1 号

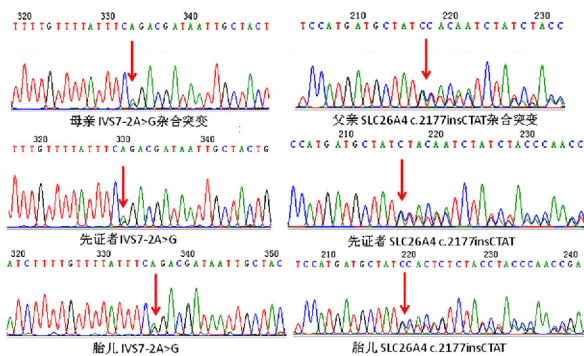
表 1 耳聋基因检测试剂盒检测结果

家系	先证者	父亲	母亲
1 号家庭	c. IVS7-2A>G 杂合突变	未检测到突变	c. IVS7-2A>G 杂合突变
2 号家庭	未检测到突变	未检测到突变	未检测到突变



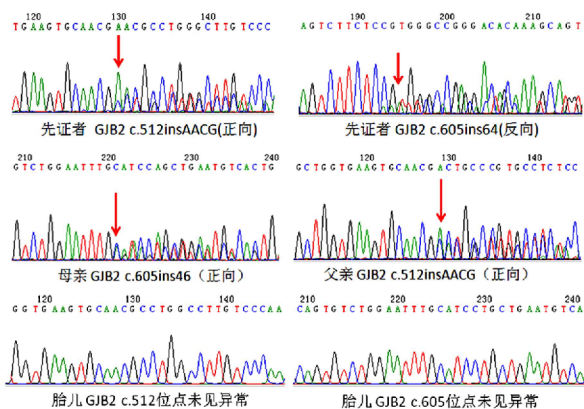
家庭胎儿基因型为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT 复合杂合突变,染色体核型分析未见异常。1 号家庭选择终止妊娠,胎儿未出生(见图 1)。

2 号家庭:孕妇 36 岁,孕 10 周,曾生育一女,现年 8 岁,出生后无听力,无语言能力,全身检查无其他系统异常。纯音电测听检查先证者左右耳听力均大于 95 dB,属极重度感音神经性聋。颞骨 CT 检查显示内耳结构及发育无异常。耳聋基因检测结果显示先证者为 GJB2 基因 c. 605ins46/c. 512insAACG 复合杂合突变,父亲为 GJB2 基因 c. 512insAACG 杂合突变,母亲为 GJB2 基因 c. 605ins46 杂合突变,父母双方听力正常均为 GJB2 基因突变携带者。2 号家庭胎儿 GJB2 基因序列未见异常,染色体核型分析未见异常,胎儿出生后随访为健康男婴,出生后 3 d 新生儿听力筛查双耳通过,至今已 6 月龄随访听力正常(见图 2)。



箭头所指为突变所在的位置。

图 1 1 号家庭各成员测序图和产前诊断结果



箭头所指为突变所在的位置。

图 2 2 号家庭各成员测序图和产前诊断结果

### 3 讨论

明确先证者和其父母双方的耳聋基因突变类型,同时明确其父母双方是同型遗传性聋基因的携

带者,而该致聋基因可稳定地由亲代向子代传递<sup>[10]</sup>,是做好遗传性聋遗传咨询和产前诊断的前提,根据以上信息才能对有再生育需求的耳聋家庭进行准确的遗传咨询和生育指导。本文提到的 2 个家系的先证者分别为 GJB2 基因和 SLC26A4 基因突变导致的耳聋。从这 2 个家庭的病例资料来看,夫妻双方听力正常,但是第一胎出生的孩子均为重度感音神经性聋,母亲孕产期并无异常,非近亲通婚,无耳聋家族史,胎儿出生时无耳毒性药物使用史,无细菌、病毒感染病史,无头颅外伤史。经耳聋基因检测,1 号家庭先证者为 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/c. 2177insCTAT 复合杂合突变,2 号家庭先证者为 GJB2 基因 c. 605ins46/c. 512insAACG 复合杂合突变,2 个家庭的父母双方听力正常均为耳聋基因突变携带者,患儿遗传其父母双方各自一个致病位点,导致耳聋的发生。通过对这 2 个家庭进行早孕期遗传性聋基因检测产前诊断,有效地避免了第二胎聋儿的出生。进行遗传性聋基因产前诊断,应根据母亲妊娠的不同时期选择适当的取材方法。早孕期(10~12 周)行绒毛膜取样,中孕期(16~24 周)行羊膜腔穿刺术羊水取样,晚孕期(26~37 周)行脐带血穿刺采集脐血。耳聋产前诊断应尽可能在孕早期进行,早诊断早预防,早期进行生育选择,避免中晚期终止妊娠对孕妇及家人造成更大的痛苦。同时,防聋必须注重与普及婚前、孕前耳聋基因检测的普遍性筛查,对携带耳聋基因致病突变的夫妇早期给予正确的遗传咨询和婚育指导,能有效预防耳聋患儿的出生<sup>[11]</sup>。

从表 1 结果来看,临床上 4 种基因 16 个突变位点的耳聋基因检测试剂盒,通过对血液、干血斑、绒毛、羊水、口腔拭子等多种临床痕量样品提取 DNA 进行 PCR,杂交、洗膜,最后对膜条进行显色,判读结果。整个实验过程约 4.5 h,操作简便、结果易判读,实现了对临床样本的快速检测,一次可完成 96 人份检测,实验通量大适合大规模人群的筛查。但其只针对试剂盒包含的突变位点进行检测,其结论存在一定的局限性,不能及时给予患者准确诊断。一代测序是基因检测的金标准,测序读长可达 1 000 bp,准确性高达 99.99%,可以发现基因的纯合突变、杂合突变及多态性变异等<sup>[12]</sup>,但是存在通量小、费用昂贵、检测周期长等缺点<sup>[13]</sup>。随着高通量测序技术的发展及全基因组测序技术的逐步成熟,检测位点更多、更全面的耳聋基因检测平台将会出现和普及,有助于我们发现更多的耳聋致病基因,促进产前诊断技术的进步,使更多的耳聋患者及其家庭能够得到准确诊断和早期生育指导。

(下转第 1593 页)

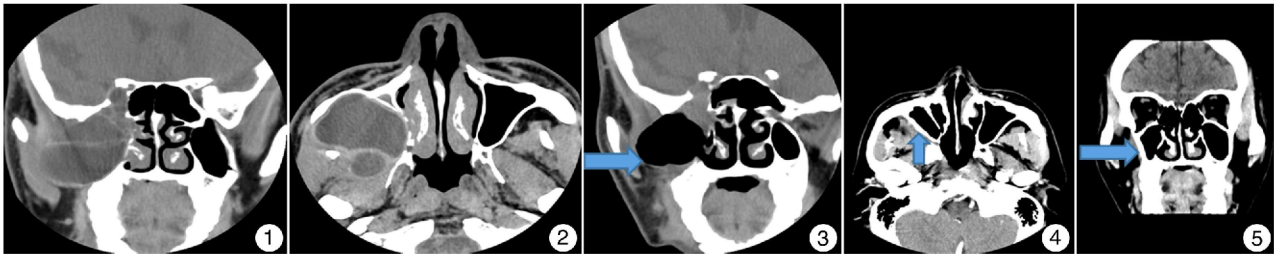


图 1 术前鼻旁窦冠状位 CT; 图 2 术前鼻旁窦轴位 CT; 图 3 术后 2 周鼻旁窦冠状位 CT 箭头示上颌窦外侧壁骨质压迫吸收; 图 4 术后 16 个月鼻旁窦水平位 CT 箭头示恢复正常上颌窦外侧壁; 图 5 术后 16 个月鼻旁窦冠状位 CT 箭头示恢复正常上颌窦外侧壁。

物力学理论:张力-应力法则,即持续而缓慢的牵拉刺激可促进生物组织发生类似胚胎组织的再生和活跃生长,人的骨组织有很强的再生能力,在合适的牵拉应力作用下,骨组织连同周围附着的软组织一同生长,而且新骨无论结构和功能均与原骨相同。同时伴随着骨段的延长,周围的血管、神经、肌肉、筋膜也会相应的再生、延长<sup>[5]</sup>。本例患者上颌窦骨质为压迫吸收,骨膜未侵犯,术中保留包虫外囊及骨膜正常结构。术后通过上颌窦自然口及下鼻道开窗口气流的运动,利用 LTS 使压迫上颌窦腔逐步恢复正常大小,其外后侧压迫吸收骨质亦恢复正常,与健侧上颌窦无明显差异。

故对于压迫造成骨质吸收的良性病变,术中在完整切除病变的基础上,应尽可能保留骨膜结构的完整,以促进术后骨质的生长,恢复正常的解剖结

构及生理功能。

#### 参考文献

- [1] ORHAN Z, KARA H, TUZUNER T, et al. Primary subcutaneous cyst hydatid disease in proximal thigh: an unusual localisation: a case report[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2003, 4: 25.
- [2] LOTFI A R, ZARRINTAN S, NADERPOUR M, et al. Primary hydatid cyst of the right maxillary sinus; a case report[J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2014, 26: 257-261.
- [3] 曾诚. 青海省青南高原棘球蚴病流行状况[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(5): 583-584.
- [4] 秦泗河. Ilizarov 技术概述[J]. 中华骨科杂志, 2006, 26(9): 642-645.
- [5] ILIZAROV G A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation[J]. Clin Orthop Relat Res, 1989, 238: 249-281.

(收稿日期: 2018-03-27)

(上接第 1574 页)

#### 参考文献

- [1] DAI P, LIU X, YU F, et al. Molecular etiology of patients with nonsyndromic hearing loss from deaf-mute schools in 18 provinces of China[J]. Chinese J Otol, 2006, 4: 1-5.
- [2] COHEN M, PHILLIPS J A 3rd. Genetic approach to evaluation of hearing loss[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2012, 45: 25-39.
- [3] HILGERT N, SMITH R J, VAN CAM P G. Forty-six genes causing non-syndromic hearing impairment; which ones should be analyzed in DNA diagnostics[J]. Mutat Res, 2009, 681: 189-196.
- [4] DAI P, LIU X, HAN D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340: 194-199.
- [5] 高雪, 辛凤, 袁慧军, 等. 遗传性耳聋相关基因 SLC26A4 新突变致病性分析[J]. 中华耳科学杂志, 2014, 12(1): 26-29.
- [6] FANG Y, GU M S, SUO F, et al. Application of gene detection technique in the antenatal diagnosis of hereditary hearing loss[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21: 1452-1455.
- [7] 史敏, 刘斐, 胥亮, 等. 广西壮族自治区 23 个非综合征型耳聋家系分子遗传病因分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 31(4): 277-283.
- [8] 项延包, 沈姗姗, 林一, 等. 常染色体隐性遗传耳聋家系的诊断和产前诊断[J]. 中华耳科学杂志, 2012, 10(3): 360-363.
- [9] RODRIGUEZ-PARIS J, PIQUE L, COLEN T, et al. Genotyping with a 198 mutation arrayed primer extension array for hereditary hearing loss: assessment of its diagnostic value for medical practice[J]. PLoS One, 2010, 5: e11804.
- [10] 唐宁, 严提珍, 李伍高, 等. 4 个遗传性耳聋家庭的产前诊断及再生育指导[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 31(10): 2126-2129.
- [11] 任淑敏, 吴庆华, 刘宁, 等. 遗传性耳聋家系的产前诊断及遗传咨询[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2016, 8(2): 26-29.
- [12] 杜亚婷, 崔庆佳, 黄丽辉. 耳聋基因检测技术的临床应用进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(8): 667-670.
- [13] YING Y, XIE J J, WANG H P, et al. Whole genome sequencing identified new somatic mutations for chronic myelomonocytic leukemia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20: 278-284.

(收稿日期: 2018-06-20)