·临床检验研究论著·

河北邯郸地区非综合征性耳聋患者 GJB2 基因突变分析*

要跟东[1]，李守霞[2]，张小芳[2]，刘永杰[1]，孙彩霞[2]，陈丁莉[2]
（1. 邯郸市中心医院；2 邯郸市中心医院检验科，河北 邯郸 056001）

摘 要：目的 利用基因诊断的方法调查邯郸市聋哑学校非综合征性耳聋患者的常见分子生物学病因，对 GJB2 基因编码区突变进行分析，为耳聋基因的筛查和产前诊断提供实验和理论依据。**方法** 采集 100 名非综合征性耳聋患者静脉血，男性 58 例，女性 42 例，用于 GJB2 基因的 PCR 扩增，应用直接测序法分别对 GJB2 基因的 2 个基因片段进行直接测序。**结果** 以 100 例患者的 DNA 样本（GJB2 基因的 2 个基因片段）进行 PCR 扩增，扩增产物片段大小与预期相符。被检测的 100 名聋哑学校非综合征性耳聋患者中，携带 GJB2 基因 235delC 纯合突变的 11 例（占 11%），携带 GJB2 基因单杂合突变和复合杂合突变的 19 例（占 19%）；其中男性 16 例，女性 14 例，男女检测结果无统计学差异（$P>0.05$）。**结论** 河北省邯郸地区特教学校耳聋患者存在较高的 GJB2 基因 235delC 纯合突变及携带 GJB2 基因单杂合突变和复合杂合突变，GJB2 基因突变为河北省邯郸地区最主要的致病突变形式，因此通过其突变筛查可以有效避免高危人群出现耳聋。

关键词：突变； 非综合征性耳聋； 基因，GJB2； 序列分析，DNA
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.006 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-4130(2013)05-0524-02

Mutation analysis of GJB2 gene in non-syndromic hearing impairment patients of Hebei handan region*

Yao Gendong[1], *Li Shouxia*[2], *Zhang Xiaogfang*[2], *Liu Yongjie*[1], *Sun Caixia*[2], *Chen Dingli*[2]
(1. *Handan Central Hospital*; 2. *Department of Clinical Laboratory, Handan Central Hospital, Handan, Hebei* 056001, *China*)

Abstract: Objective To investigate the genetic causes of non- syndromic hearing impairment (NSHI) patients in special educational school of Handan city by genetic screening testing method and identify its molecular etiopathogenisis, to analyze mutations of coding sequence of GJB2 gene, and to provide the experimental and theoretical basis for the screening and prenatal diagnosis of deaf genes. **Methods** 100 non-syndromic hearing impairment (NSHI) patients accepted the gene screening. 100 non-syndromic hearing impairment (NSHI) patients were enrolled, including 58 males and 42 females. The expression of GJB2 gene expression were detected by PCR methods. Application directly sequencing to detect the mutations of GJB2 gene. **Results** DNA samples (GJB2 gene two genetic fragments) of 100 patients had amplification product the same segment size as expectations. 100 patients were diagnosed with non-syndromic hearing impairment (NSHI), 11 causes (11%) showed homozygous GJB2 235delC mutation, and 19 (19%) showed GJB2 single heterozygous genes mutations and compound heterozygous GJB2 mutation. Among them 16 cases were male, 14 cases were female, there was no statistical significance between male group and female group ($P>0.05$). **Conclusion** Incidence of homozygous GJB2 235delC mutation, GJB2 single heterozygous genes mutations and compound heterozygous GJB2 mutation was high in the deaf population of Handan city. GJB2 gene is the main pathogenic mutation forms. Molecular genetic screening for these mutations and genetic counseling are effective.

Key words: mutation; non-syndromic hearing impairment; genes, GJB2; sequence analysis, DNA

耳聋是最常见的遗传病之一，遗传性耳聋可分为 2 种：一种为综合征性耳聋（syndromic hearing impairment，SHI），另一种为非综合征性耳聋（non-syndromic hearing impairment，NSHI），而 70% 的遗传性耳聋表现为非综合征性耳聋（NSHI）[1]。非综合征性耳聋与多种缝隙连接蛋白（connexin，Cx）突变密切相关，Cx26 是一种由 GJB2 基因编码的缝隙连接蛋白，该基因定位于染色体的 13q11-q12，有 2 个外显子，目前已被发现报道的突变方式多达 220 多种[2]，它第一个被克隆和鉴定的遗传性耳聋致病基因，也是导致 NSHI 最常见的致病基因，其致聋遗传方式可为常染色体隐性遗传和常染色体显性遗传。GJB2 最常见的突变位点有 3 种，分别是 35delG、167delT 和 235delC，东亚人群最常见的突变位点是 235delC[2-4]。2011 年 10 月本课题组前往邯郸市特教学校收集 100 例非综合征性耳聋患者血细胞样本，用于 GJB2 基因的聚合酶链扩增反应。本研究利用基因诊断的方法调查邯郸市聋哑学校非综合征性耳聋患者的常见分子病因，对 GJB2 基因编码区突变进行分析，以明确非综合征性耳聋患者发病的分子学基础，为耳聋基因的筛查和产前诊断提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 研究对象为河北省邯郸市特教学校耳聋学生，他们分别来自河北省邯郸市及邯郸市下属县（魏县、成安县、武安市、肥乡县等）的各乡镇。年龄 6 岁～17 岁，平均（13.7±3.1）岁；男性 58 例，女性 42 例；100 例研究对象均为汉族。根据世界卫生组织（WHO）《障碍、残疾和残废的国际分类》（1980 年）中听力损失分级标准对 100 例河北省邯郸市特教学校耳聋学生进行评定，100 例研究对象均被诊断为重度以上双侧耳聋且均为非综合征性耳聋。

1.2 试剂和仪器 应用 DNA 提取试剂盒（美国 AXYGEN 生物技术有限公司）提取耳聋患者的基因组 DNA，微量核酸蛋白检测仪（美国 Thermo 公司）测量 DNA 浓度，PCR 仪（美国

* 基金项目：邯郸市科学技术研究与发展项目（1113108017）。 作者简介：要跟东，男，主任医师，主要从事超声医学研究。 △ 通讯作者，E-mail：lishanxia1968@163.com。

ABI 公司 9700 热循环仪)用于基因扩增,测序仪(美国 ABI 公司 3730xl)进行直接测序。

1.3　方法

1.3.1　病史资料采集　学生家长填写常见遗传病信息登记表及耳聋患者信息登记表。遗传病信息登记表包括聋儿的一般信息,母亲孕前高危因素,母亲孕期情况,家族史,患儿情况,实验室检查等。耳聋患者信息登记表包括聋儿的一般信息、耳聋一般情况(耳聋发生时间、病情进展、聋前是否会说话、智力情况及伴随症状等)、聋儿个人史(聋前患病史、耳毒性药物应用情况、头部外伤史及家族史等)、母亲的妊娠史(传染病史、耳毒性药物应用情况及生产情况等)、体格检查(主要包括全身查体及耳部专科查体)和一些临床资料等。所有非综合征性耳聋患者均签署常见耳聋基因诊断知情同意书(均由其父母代签)。对 100 例非综合征性耳聋患者进行全身的体格检查和耳部听力的评定(纯音测听的检查、声音导抗的检查和耳聋的程度等),并抽取其外周静脉血 5 mL,为后续的试验做准备。

1.3.2　血细胞标本的采集与储存　清晨空腹采集耳聋患者全血,采用 EDTA-K_2 抗凝管,避免溶血。常温静置 1 h 后,以 2 000 r/min(r=0.1 m)离心 10 min,取血浆与血细胞分别至聚丙烯 EP 管中,将所有标本统一编码,保存于−80 ℃低温冰箱,建立血细胞标本库。用于 GJB2 基因的聚合酶链扩增反应(polymerase chain reaction,PCR)。

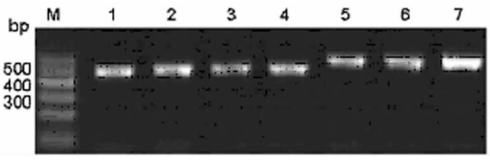
1.3.3　引物设计　GJB2 的 2 个基因片段扩增引物序列采用加拿大生物研究所提供的在线软件 Primer3(http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/)进行设计。为了使 PCR 扩增有效性、特异性更好,对下列参数进行了设定:第一,引物中的 GC 含量设定在 40%～60%之间;第二,退火温度设定在 55 ℃～60 ℃之间;第三,引物的 3′端一般设定为以 G 或 C 结尾以便使引物更好的结合到模板链上;第四,扩增片段一般设定在 200～500 bp 之间便于测序。

1.3.4　测序反应　将 384 孔板放入 ABI 3730xl 测序仪(Applied Biosystems,Foster City,CA,USA)中,测序。

1.3.5　结果分析　用 Mutation Surveyor 软件对测序结果进行比对分析。DNA 测序结果用 Gene Tool 1.0 软件与 NCBI 网站公布的 GJB2 的标准序列(NC-000013.9)进行比对,以筛查是否有突变位点的存在。

2　结　　果

2.1　PCR 检测结果　以 100 例患者的 DNA 样本(GJB2 基因的 2 个基因片段)进行 PCR 扩增,扩增产物片段大小与预期相符,见图 1。



M:DNA 标记物(600 bp);1～4:GJB2-1 基因片断;5～7:GJB2-2 基因片断。

图 1　PCR 扩增产物电结果

2.2　测序结果　用 Mutation Surveyor 软件对测序结果进行比对分析。DNA 测序结果用 Gene Tool 1.0 软件与 NCBI 网站公布的 GJB2 的标准序列(NC-000013.9)。被检测的 100 名聋哑学校非综合征性耳聋患者中,携带 GJB2 基因 235delC 纯合突变的 11 例(占 11%),见图 2,携带 GJB2 基因单杂合突变和复合杂合突变的 19 例(占 19%),见图 3;其中,男性 16 例,女性 14 例,男女检测结果无统计学差异(P>0.05)。235delC 是 GJB2 基因主要的致病突变形式,GJB2 基因突变为河北省邯郸地区最主要的致病突变形式。

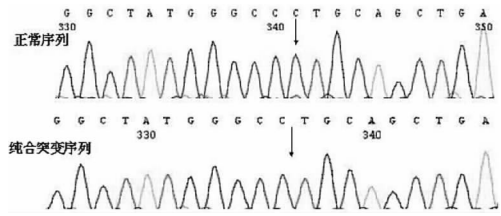


图 2　GJB2 基因 235delC 纯合子突变

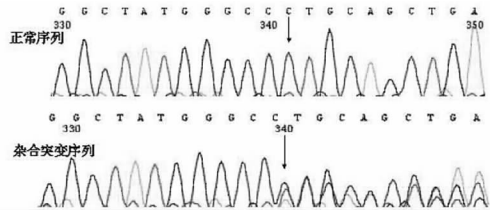


图 3　GJB2 基因 235delC 杂合子突变

3　讨　　论

GJB2 是第一个被克隆和鉴定的遗传性耳聋致病基因,也是导致 NSHI 最常见的致病基因,突变方式多达 220 多种,其致聋遗传方式可为常染色体隐性遗传和常染色体显性遗传。在中国,对非综合征性耳聋群体的研究,共发现了 79G>A,94C>T,101T>C,139G>A,161A>T,240G>A,341A>G,442G>A,455A>G,506G>A,608T>A,235delC,299-300delAT,30delG,109G>A,571T>C,176-191del16,223C>T,251delT,232G>A,344T>G,550C>T 以及 504insGCAA 等 Cx26 基因碱基突变,其中以 235delC 纯合性突变最常见,其检出率高达 23.90%[5-7]。大都携带 GJB2 基因非综合性耳聋患者的螺旋神经节细胞数量正常,适合人工耳蜗植入,且此类患者在耳蜗植入后,言语理解能力强,预后良好[8-9]。因此,明确 GJB2 基因突变致聋的分子病因学原因对治疗和预后都有重要意义。GJB2 基因单杂合突变,与相同基因型的人婚配,生育聋儿的可能性是 25%;GJB2 基因复合杂合突变,与相同基因型的人婚配,生育聋儿的可能性是 50%;GJB2 基因 235delc 纯合突变,与相同基因型的人婚配,生育聋儿的可能性是 100%。本次调查结果显示在河北省邯郸市及邯郸市下属县(魏县、成安县、武安市、肥乡县等)携带 GJB2 基因 235delC 纯合突变的 11 例(占 11%),携带 GJB2 基因单杂合突变和复合杂合突变的 19 例(占 19%);其中男性 16 例,女性 14 例,男女检测结果无统计学差异(P>0.05)。235delC 是 GJB2 基因主要的致病突变形式。全国耳聋分子的病因学研究的报告显示,绝大多数携带 235delC 杂合突变的 GJB2 基因能够通过直接测序发现 GJB2 基因上的第二个突变,携带 235delC 杂和突变的 GJB2 基因严重提示非综合性耳聋发病的遗传易感性[10-12]。河北省邯郸地区特教学校耳聋患者存在较高的 GJB2 基因 235delC 纯合突变及携带 GJB2 基因单杂合突变和复合杂合突变,GJB2 基因突变为河北省邯郸地区最主要的致病突变形式。虽然针对遗传性耳聋疾病还没有确实有效的治疗方法和手段,但是随着分子生物学技术的迅猛发展,已经可以对许多遗传性疾病和一部分的出生缺陷性疾病进行基因筛查及诊断。因而,对患有此类遗传性疾病的高危人群进行针对性的遗传咨询及对高危胎儿进行孕期筛查和产前诊断,可(下转第 529 页)

和尿 MMP-9 明显升高。由于不同类型(T1DM、T2DM)、不同患者在不同阶段,相关合并症及并发症的不同,治疗方法(如胰岛素)的影响,使血中 MMP-9 的水平变化存在较大差异,故相对于 SMMP-9,定期检测 UMMP-9 的水平变化更有助于早期 DN 的诊断。

本研究还同时检测了 CysC,其在糖尿病各组的变化趋势与文献报道一致[13],但组间比较差异无统计学意义。相关性研究提示 UACR、HbA1c 对 UMMP-9:Cr 的影响是显著的,提示控制血糖和减轻尿清蛋白排泄对减轻 1 型糖尿病慢性血管并发症的重要性。而年龄及糖尿病病程与 UMMP-9:Cr 的正相关性也并不难理解,因为随着年龄的增大及病程的延长,糖尿病的慢性并发症和相关合并症逐渐出现并逐渐加重,故 MMP-9 逐渐升高。腰臀比与 UMMP-9:Cr 的相关性提示了肥胖尤其是腹型肥胖对 MMP-9 的影响。舒张压对血清 MMP-9 水平是有影响的,而近年的研究已表明高血压时 SMMP-9 水平是增高的。此外,糖尿病尤其是后期多合并血脂代谢紊乱,本实验结果显示 UACR 重度升高组三酰甘油较其他各组高,但血脂对 MMP-9 的影响并无统计学意义。

综上所述,糖尿病及并发 DN 患者体内 UMMP-9 水平显著升高,且在疾病早期出现的升高已具有统计学意义,而 SMMP-9 水平在疾病早期的升高并不显著,提示定期监测 MMP-9 尤其是 UMMP-9:Cr 有助于早期发现 DN。此外,由于早期 MMP-9 的致病因素,抗 MMP-9 的靶向治疗或许可以阻止或延缓 DN 发展。

参考文献

[1] Guo QH, Lu JM, Pan CY, et al. The kidney expression of matrix metalloproteinase-9 in the diabetic nephropathy of Kkay mice[J]. J Diabetes Complications, 2008, 22(6): 408-412.

[2] Lupia E, Elliot SJ, Lenz O, et al. IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: implications for diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 1999, 48(8): 1638-1644.

[3] van der Zijl NJ, Hanemaaijer R, Tushuizen ME, et al. Urinary matrix metalloproteinase-8 and -9 activities in type 2 diabetic subjects: A marker of incipient diabetic nephropathy[J]. Clin Biochem, 2010, 43(7/8): 635-639.

[4] Thrailkill KM, Moreau CS, Cockrell GE, et al. Disease and gender-specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus[J]. Endocrine, 2010, 37(2): 336-343.

[5] Wang Y, Su Y, Xu Y, et al. Genetic polymorphism c. 1562C>T of the MMP-9 is associated with macroangiopathy in type 2 diabetes mellitus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 113-117.

[6] Lewandowski KC, Banach E, Bienkiewicz M, et al. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia[J]. Arch Med Sci, 2011, 7(2): 294-303.

[7] Gharagozlian S, Svennevig K, Bangstad HJ, et al. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes[J]. BMC Clin Pathol, 2009, 9: 7.

[8] Fiotti N, Altamura N, Moretti M, et al. Short term effects of doxycycline on matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2009, 23(2): 153-159.

[9] Krag S, Nyengaard JR, Wogensen L. Combined effects of moderately elevated blood glucose and locally produced TGF-beta1 on glomerular morphology and renal collagen production[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(9): 2485-2496.

[10] Nee L, Tuite N, Ryan MP, et al. TNF-alpha and IL-1 beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells[J]. Nephron Exp Nephrol, 2007, 107(2): 73-86.

[11] Liu S, Liang Y, Huang H, et al. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2005, 16(4/6): 207-216.

[12] Soder PO, Meurman JH, Jogestrand T, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in blood as markers for early atherosclerosis in subjects with chronic periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2009, 44(4): 452-458.

[13] 姚立腾,王锦驹. 血清胱抑素 C 和视黄醇结合蛋白联合检测在糖尿病肾病临床诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 440-441.

(收稿日期:2012-08-23)

(上接第 525 页)

以有效地防止新的患儿出生提高人口素质,对落实优生优育基本国策具有重大意义。

参考文献

[1] Steel KP. New interventions in hearing impairment[J]. BMJ, 2000, 320(7235): 622-625.

[2] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics[J]. Mutat Res, 2009, 681(2/3): 189-196.

[3] Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness[J]. N Engl J Med, 1998, 339(21): 1500-1505.

[4] 刘学忠,欧阳小梅,Yan D,等. 中国人群遗传性耳聋研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(2): 81-89.

[5] 卜云飞,吕晓光,汪洋,等. 22 例非综合征型耳聋患者的致病基因突变位点分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 30(3): 390-393.

[6] 陶峥,马衍,欧阳治国,等. 205 例先天性非综合征型聋患儿 GJB2 基因突变分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(1): 67-68.

[7] 贾婧杰,袁永一,戴朴,等. 山东省滨州市特教学校耳聋学生分子病因学分析--GJB2 235delC 突变、线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 突变和 SLC26A4 IVS7-2A>G 突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2010, 8(4): 407-410.

[8] 韩跃峰. GJB2 基因突变在遗传性非综合征性耳聋中的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(17): 2774-2777.

[9] 尤易文,崔敬红,戴朴,等. 江苏南通地区非综合征性耳聋 GJB2 基因突变分析[J]. 中华耳科学杂志, 2007, 5(1): 52-55.

[10] 宋亮亮. GJB2 基因及其诊断筛查技术研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37(5): 545-547.

[11] 李建瑞,刘涛,严江伟,等. 散发性耳聋 GJB2 基因突变分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2011, 25(6): 33-36.

[12] 范燚,喻岸竹,郁芸,等. 人 GJB2 分子进化与耳聋遗传效应的关联性分析[J]. 广西农业生物科学, 2012, 31(1): 26-34.

(收稿日期:2012-09-19)