

## 论著 · 临床研究

## 非综合征性耳聋患儿家庭耳聋易感基因突变检测分析

钟泽艳,陈剑虹<sup>△</sup>,官志扬,贺海林,钟国兴,杨坤祥

(广东省惠州市妇幼保健计划生育服务中心产前诊断中心,广东惠州 516007)

**摘要:**目的 研究广东惠州地区耳聋家庭中与耳聋相关的 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 DNA(mtDNA) 的基因型分布和发病特征,为耳聋基因筛查提供科学的参考数据。方法 2017 年 3—7 月,收集 37 个耳聋患儿家庭外周血样本 99 例。行听力测试并采用聚合酶链反应联合寡核苷酸探针导流杂交法检测,检测范围包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 mtDNA 的 4 个基因 13 个突变位点。结果 99 例样本中 50 例未通过听力测试,不通过率为 50.51% (50/99)。在 37 个耳聋家庭中,检出携带耳聋基因家庭有 11 个,检出 35 例阳性样本,检出率为 35.35% (35/99)。共检出 10 种突变类型,主要包括 GJB2 基因突变 16 例, SLC26A4 基因突变 19 例。其中双等位基因突变(纯合突变+复合杂合突变)9 例,检出率为 9.09% (9/99);26 例仅检测到 1 个等位基因突变,检出率为 26.26% (26/99)。6 个耳聋家庭夫妻为同种类型耳聋基因突变携带者,且 4 个妈妈处于早孕期,行产前诊断。结论 SLC26A4 基因突变是导致本研究患儿耳聋最常见的原因,其次是 GJB2 基因突变。对遗传性耳聋易感基因的准确快速诊断有利于早发现早治疗,从而改善患者的生存质量。

**关键词:**耳聋基因; GJB2; GJB3; SLC26A4; 线粒体 DNA**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.019**文章编号:**1673-4130(2018)21-2669-04**中图法分类号:**R764;R394**文献标识码:**A**Detection and analysis of susceptibility genes for family deafness in children with non syndromic hearing loss**ZHONG Zeyan, CHEN Jianhong<sup>△</sup>, GUAN Zhiyang, HE Hailin, ZHONG Guoxing, YANG Kunxiang

(Prenatal Diagnosis Center of Huizhou Maternal and Child Health Care Family Planning Service Center, Huizhou, Guangdong 516007, China)

**Abstract: Objective** To investigate the genotype distribution and clinical feature of GJB2, GJB3, SLC26A4 and mitochondria DNA (mtDNA) related to deafness in deaf families in Huizhou City, Guangdong province, so as to provide scientific data for deafness genes screening. **Methods** From March to July 2017, 99 peripheral blood samples from 37 deaf families were collected. Hearing tests were performed and polymerase chain reaction and oligonucleotide probe guided hybridization were used to detect 13 mutations in 4 genes including GJB2, GJB3, SLC26A4 and mtDNA. **Results** Of the 99 samples, 50 samples did not pass the hearing test, and the rate of failure was 50.51% (50/99). Of the 37 deaf families, 11 were found to carry deaf genes, and 35 were positive, the detection rate was 35.35% (35/99). A total of 10 mutations were detected, including 16 mutations in the GJB2 gene and 19 mutations in the SLC26A4 gene. Among them, 9 cases had double allele mutation (homozygous mutation + compound heterozygous mutation), the detection rate was 9.09% (9/99), 26 cases had only one allele mutation, the detection rate was 26.26% (26/99). 6 deaf couples were carriers of the same type of deaf gene mutation, and 4 mothers were in early pregnancy for prenatal diagnosis. **Conclusion** Mutation of SLC26A4 gene is the most common cause of deafness in this study, followed by GJB2 gene mutation. Accurate and rapid diagnosis of hereditary deafness susceptibility genes is conducive to early detection and treatment, thus improving the quality of life of patients.

**Key words:** deafness genes; GJB2; GJB3; SLC26A4; mitochondrial DNA

先天性耳聋是最常见的出生缺陷之一,严重影响患者的生存质量,已成为世界性的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。WHO 公布,截止至 2017 年 2 月,全球有 3.6 亿人患有残疾性听力损失,约占世界总人口的 5%,其中 3200 万是儿童。遗传性因素是引起先天性耳聋的主要

因素之一,60% 的先天性耳聋为遗传性耳聋<sup>[2-3]</sup>。研究显示,70% 的遗传性耳聋属于非综合征性耳聋(NSHL),按照遗传模式又被分为常染色体隐性遗传、常染色体显性遗传、性染色体连锁遗传及线粒体遗传。国内耳聋分子流行病学研究表明,大部分 NSHL

由 GJB2 基因、SLC26A4 基因和线粒体 DNA (mtDNA) 的病理性突变导致<sup>[4-5]</sup>。而 GJB3 基因是夏家辉院士发现的首个中国本土耳聋相关基因, 其主要表型为语后进行性高频听力感音神经性耳聋<sup>[6]</sup>。我国出生缺陷预防分为三个等级, 其中二级预防指减少出生缺陷儿的出生, 它是目前耳聋预防与干预主要手段, 通过对耳聋人群体婚配生育指导以及遗传性耳聋家庭的产前诊断, 可实现减少耳聋患儿的出生。本研究针对上述中国耳聋人群常见致病基因 (GJB2、SLC26A4、mtDNA) 和 GJB3 基因, 共 4 个基因 13 个突变位点, 用导流杂交的方法首次在惠州地区 37 个耳聋家庭中进行耳聋易感基因检测, 以明确这些耳聋基因突变在该地区的流行情况, 通过进一步的遗传指导, 为防聋治聋的实践提供科学的参考依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2017 年 3—7 月来本院就诊和本院出去义诊收入的耳聋家庭样本, 样本主要来源于惠州市残疾人康复中心共 99 例, 37 个家庭。年龄 1~45 岁, 近 3 个月无输血史。

**1.2 样本采集** 在知情同意的原则下, 对受检者进行详细的病史问卷调查和体格检查。同时, 抽取其外周血 2 mL, 使用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K<sub>2</sub>) 抗凝, 用于 DNA 提取。同时, 本中心对夫妻双方为同一耳聋易感基因突变携带者的情况, 经夫妻双方知情同意签字, 在 B 超定位引导下行羊膜腔穿刺术。采集胎儿羊水样本 2 管各约 10 mL, 一管采用直接法检测 (培养前), 另一管按照本中心建立的常规方法进行细胞培养后检测。

## 1.3 研究方法

**1.3.1 病史问卷调查** 调查问卷设计内容包括个人信息、发病时间、发病原因、听力筛查结果、家族史、是否曾服用相关氨基苷类药物等。其中听力筛查为在产妇及其家属知情同意下, 在新生儿出生后第 2~3 天, 采用 GSI 畸变产物耳声发射仪进行新生儿听力初次筛查。未通过者于出生后 42 d 采用听性脑干反应 (ABR) 进行复筛。

**1.3.2 耳聋基因检测** 按全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书用 Lab-Aid 820 核酸提取仪 (厦门百维信生物公司) 提取基因组 DNA。获得的 DNA 用导流杂交技术 (耳聋基因检测试剂盒, 潮州凯普生物化学有限公司) 进行检测。导流杂交技术主要是结合低密度芯片技术, 在一张芯片上同时检测中国人常见的 4 个基因 13 个位点, 包括 GJB2: c. 35delG、c. 176del16、c. 235delC、c. 299delAT、c. 155delTCTG; GJB3: c. 538C>T; SLC26A4: c. IVS7-2A>G、c. 2168A>G、c. 1229 C>T; mtDNA: m. 1494C>T、m. 1555A>G、m. 7445A>G、m. 1220T>G。按照操作说明书进行实验操作和结果判断: 每个样本分别采用生物素标记的引物多重 PCR 扩增耳聋易感基因突变区域, 再将扩增产物与标记不同

突变类型耳聋易感基因探针在尼龙膜导流杂交仪上进行导流杂交, 然后通过化学显色对结果进行判读。膜条探针布局为 35 N/M、155 N/M、176 N/M、235 N/M、299 N/M、1494 N/M、1555 N/M、7445 N/M、538 N/M、IVS N/M、2168 N/M、1229 N/M、12201 N/M。

## 2 结 果

**2.1 耳聋基因检测结果** 参与本研究的 37 个家庭, 均为已确诊的耳聋家庭, 患儿都使用了助听器或植入有人工耳蜗, 其中检出携带耳聋基因家庭 11 个。通过收回的调查问卷, 发现有 50 例样本未通过听力测试, 不通过率为 (50.51%)。同时, 发现有 10 个家庭患儿致聋是由于出生时或出生后生病所导致, 病因包括脑白质发育不良、中耳炎、脑膜炎、耳蜗神经畸形、神经性耳聋等。在收集的 99 例血液样本中, 检出 35 例阳性样本, 检出率为 35.35% (35/99)。结果显示, 共检出 10 种突变类型, 主要为 GJB2 基因突变和 SLC26A4 基因突变, 检出率分别为 16.16% (16/99) 和 19.19% (19/99)。其中双等位基因突变 (纯合突变 + 复合杂合突变) 9 例, 检出率 9.09% (9/99); 26 例仅检测到 1 个等位基因突变, 检出率 26.26% (26/99)。见表 1、2。

表 1 35 例耳聋突变基因分布情况

序号	基因	突变类型	n	构成比(%)
1	GJB2	c. 235delC	9	25.71
2		c. 299delAT	2	5.71
3		c. 235delC/c. 235delC 纯合子	3	8.57
4		c. 235delC/c. 299delAT 复合杂合	2	5.71
5	SLC26A4	c. IVS7-2A>G	6	17.14
6		c. 1229 C>T	3	8.57
7		c. 2168A>G	3	8.57
8		c. IVS7-2A>G/c. IVS7-2A>G 纯合子	3	8.57
9		c. IVS7-2A>G/c. 1229 C>T 复合杂合	2	5.71
10		c. IVS7-2A>G/c. 2168A>G 复合杂合	1	2.86
11		c. 1229 C>T/c. 2168A>G 复合杂合	1	2.86

**2.2 产前诊断结果** 37 个家庭中有 6 对夫妻同为同种类型的耳聋易感基因突变携带者, 且 4 个耳聋家庭的妈妈处于早孕期。对其进行遗传指导, 告知先天性耳聋儿发生的概率和风险 (GJB2 和 SLC26A4 基因突变致聋均属于常染色隐性遗传, 生育患儿的风险为 25%), 4 对夫妻均接受了产前诊断。且 4 例胎儿羊水样本的 2 管检测结果一致, 结果可靠。胎儿基因型结果为: 家庭 1 为正常; 家庭 2 为 GJB2 的 c. 235delC 杂合突变, 家庭 3 为 SLC26A4 的 c. IVS7-2A>G 杂合突变; 家庭 4 为 GJB2 的 c. 235delC/c. 299delAT 复合杂合突变, 结果图显示为 235 N/M 合并 299 N/M。因此, 可以确诊家庭 4 的胎儿为先天性耳聋患者, 遗传自其父亲基因型 GJB2 的 c. 235delC 杂合突变, 母

亲基因型 GJB2 的 c.299delAT 杂合突变。见表 3。

表 2 99 例样本听力测试结果及发病特征

序号	发病时间	发病原因	样本	听力测试	听力测试
			例数(n)	通过(n)	不通过(n)
1	出生时	脑白质发育不良	2	0	2
2	4~8 个月	中耳炎	5	1	4
3	出生时	脑膜炎	3	0	3
4	出生时	耳蜗神经畸形	2	0	2
5	1~2 岁	神经性耳聋	8	3	5
6	1~5 岁	GJB2 杂合突变	11	5	6
7	2 月至 3 岁	GJB2 纯合突变	3	0	3
8	2 月至 3 岁	GJB2 复合纯合突变	2	0	2
9	6 月至 6 岁	SLC26A4 杂合突变	12	4	8
10	6 月至 5 岁	SLC26A4 纯合突变	3	0	3
11	6 月至 5 岁	SLC26A4 复合纯合突变	4	0	4
12	出生时至 6 岁	其他原因	13	5	8

表 3 4 个产前家庭的耳聋易感基因型分布情况

家庭	成员	基因	突变类型	妊娠结局
1	父亲	SLC26A4	c.1229 C>T	继续妊娠
	母亲	SLC26A4	c.2168A>G	
	胎儿	—	正常	
2	父亲	GJB2	c.235delC	继续妊娠
	母亲	GJB2	c.235delC	
	胎儿	GJB2	c.235delC	
3	父亲	SLC26A4	c. IVS7-2A>G	继续妊娠
	母亲	SLC26A4	c. IVS7-2A>G/c. 2168A>G	
	胎儿	SLC26A4	c. IVS7-2A>G	
4	父亲	GJB2	c.235delC	终止妊娠
	母亲	GJB2	c.299delAT	
	胎儿	GJB2	c.235delC/c.299delAT	

注:—表示无耳聋基因

### 3 讨 论

耳聋是临幊上最常见的遗传病之一。根据我国 2006 年残疾人第 2 次抽样调查显示,目前全国听力残疾人不断增长,约占残疾人总数的 30%。且据人口调查统计,我国每年出生的新生儿中,重度听力障碍者占 1.00%~3.00%,由于药物、遗传、感染、疾病、环境、噪音污染、意外事故等原因,每年新增聋儿 3 万余名<sup>[7]</sup>。截止至 2016 年 9 月 30 日,惠州市共有持证听力残疾的有 3 170 人(市残联办证系统),约占全市总人口的 0.69%(按照全市 460 万人口计算)。若按照每年 10 万新生儿出生,重度听力障碍者约占 2.00% 计算,我市每年约有 200 名可能患重度听力障碍患儿出生。而这一类耳聋严重影响患者的交流和认知能力,对个人、家庭、社会造成巨大的负担。本研究中,通过对 37 个耳聋患儿家庭进行回顾性问卷调查,发

现这些耳聋家庭孩子的发病时间为出生时至 6 岁,其中有 10 个家庭患儿为非遗传因素所导致的耳聋,病因包括脑白质发育不良、中耳炎、脑膜炎、耳蜗神经畸形、神经性耳聋等。数据显示,这些家庭的孩子中,较早发现听力下降或障碍而进行干预的耳聋患儿与其他人的交流和认知能力明显较好。再次验证了,预防避免耳聋发生或通过及时治疗延缓听力下降以及做到“聋”而不哑,能更好地融入正常社会。

目前研究发现,遗传性耳聋是人群中最常见的耳聋,并且 NSHL 占遗传性耳聋的 70%。虽然耳聋相关基因很多,在我国人群中最常见的耳聋基因为 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 mtDNA<sup>[4-6]</sup>。本研究在患儿家长知情同意下,对收集的 99 例样本进行上述 4 个耳聋基因的 13 个耳聋易感基因突变位点进行了检测,检出 35 例阳性样本,检出率为 35.35%。共检出 10 种突变类型,包括 26 例 1 个等位基因突变:c. 235delC、c. 299delAT、c. IVS7-2A>G、c. 1229 C>T、c. 2168A>G;9 例双等位基因突变(纯合突变十复合杂合突变):c. 235delC/c. 235delC、c. 235delC/c. 299delAT、c. IVS7-2A > G/c. 1229 C > T、c. IVS7-2A>G/c. 2168A>G、c. 1229 C > T/c. 2168A>G。在研究人群中,最高携带率基因类型为 SLC26A4 基因突变(19.19%),其次为 GJB2 基因突变(16.16%),而 GJB3 和 mtDNA 未有检出。这可能与地域人口分布有关,即与选择的人群特征性相关,均为惠州市户籍人群,且群体样本量较小,后期需进一步增大样本量验证,总结该人群的耳聋携带基因分布特征。本研究结果与前期其他研究者报道的一致<sup>[7-10]</sup>,GJB2 与 SLC26A4 基因突变导致的耳聋均为常染色体隐性遗传,健康人群中这两种基因突变高携带率直接导致 GJB2 与 SLC26A4 耳聋的高发病率。SLC26A4 基因最先由 EVERETT 等<sup>[11]</sup>于 1997 年在 1 个 Pendred 综合征家系中定位克隆。研究报道,SLC26A4 耳聋包括 2 种临床表现,一种表现为甲状腺肿大和耳聋的 Pendred 综合征;另一种在我国最为常见,患儿仅表现为耳聋,称为大前庭水管综合征(EVAS)<sup>[12-13]</sup>。该耳聋基因携带者应避免头部碰撞、剧烈运动、头外伤等引起颅内压变化而诱发发病,即本研究中 4 位小朋友的“一掌致聋”。mtDNA 突变为母系遗传,最早发现于 1 个阿拉伯家系中<sup>[14]</sup>,其突变位点 m. 1494C>T 和 m. 1555A>G 与药物性耳聋相关。该患者的所有母系家庭成员都应该尽量避免相关氨基苷类药物的使用,防止“一针致聋”悲剧的重演,从而减少相应药物性耳聋的发生。

本研究中,37 个家庭中检出 6 对夫妻同为同种类的耳聋易感基因突变携带者。对他们进行了遗传指导,根据遗传模式,告知先天性聋儿发生的概率和风险(生育患儿的风险为 25%)<sup>[9,15]</sup>。其中 4 个妊娠妇女均进行了产前诊断,胎儿基因型结果为 1 例

正常,2例为1个等位基因突变,1例为GJB2基因的c.235delC/c.299delAT复合杂合突变。因此,可以确诊有1例胎儿为先天性耳聋患者。而该对夫妻已生育有1名先天性耳聋孩子,这对夫妻选择终止妊娠,避免增加家庭痛苦和负担。针对另外2例只有1个等位基因突变的胎儿,本产前诊断中心专家咨询建议日后进行婚育前要对其对象进行GJB2基因突变位点检测。因此,仅仅依赖于聋人的筛查和干预不足以从根本上阻断遗传性耳聋在整个人群中的传递和发病。对于有耳聋家族史或聋哑的夫妇在生育前应进行耳聋基因检测,可以预测后代耳聋风险,对于夫妇双方为同一耳聋基因突变携带者,生育时结合产前诊断,可有效预防耳聋后代的出生,避免增加家庭痛苦和负担。

#### 4 结 论

耳聋为高发病率疾病,对家庭和社会造成极大的负担。耳聋基因检测技术是目前最有效的病因学分析方法,能为耳聋的治疗和预后作出指导。且利用该技术可以提早发现高危人群,进行及时的医学干预和指导,将大大降低耳聋发病率,减少听力残障的发生,达到提高人口素质和优生优育的目的。

#### 参考文献

- [1] 王秋菊,刘穹.常染色体显性遗传性耳聋(1)[J].听力学及言语疾病杂志,2016,24(2):213-216.
- [2] MORTON C C, NANCE W E. Newborn hearing screening--a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20): 2151-2164.
- [3] VAN CAMP G, WILLEMS P J, SMITH R J. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity [J]. Am J Hum Genet, 1997, 60: 758-764.
- [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] 戴朴,刘新,于飞,等.18个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究(I):GJB2 235delC 和线粒体 DNA

(上接第 2668 页)

- [8] KIM J Y, KAWABORI M, YENARI M A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(18): 2076.
- [9] RAJESHWAR K, KAUL S, AL-HAZZANI A, et al. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome[J]. Inflammation, 2012, 35(3): 978-984.
- [10] 刘娟.C反应蛋白与脑梗死急性期神经功能缺损及预后的相关性分析[J].中国实用神经疾病杂志,2014,17(24):3-6.
- [11] 丁萌,武英伟,谢守军,等.缺血性脑卒中患者脂蛋白相关磷脂酶A2、同型半胱氨酸、高敏C反应蛋白联合检测的

12SrRNA A1555G 突变筛查报告[J].中华耳科学杂志,2006,4(1):1-5.

- [6] XIA J H, LIU C Y, TANG B S, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment [J]. Nat Genet, 1998, 20(4): 370-373.
- [7] 第二次残疾人抽样调查办公室.全国第二次残疾人抽样调查主要数据手册[M].北京:华夏出版社,2007:2-38.
- [8] 吕康模,熊业华,俞皓,等.17 000 名新生儿遗传性耳聋基因突变筛查[J].中华医学遗传学杂志,2014,31(5): 547-552.
- [9] 聂俊玮,李佩佩,谭满胜.2 166 例婴幼儿先天性耳聋基因检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(15): 2150-2152.
- [10] DU Y, HUANG L, WANG X, et al. Clinical data analysis of genotypes and phenotypes of deafness gene mutations in newborns: a retrospective study [J]. Bioscience Trends, 2017, 11(4): 339-340.
- [11] EVERETT L A, GLASER B, BECK J C, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS) [J]. Nat Genet, 1997, 17(4): 411-422.
- [12] 张笑千,王睿,刘畅,等.SLC26A4 基因突变所致遗传性耳聋患者突变类型研究[J].中国全科医学,2016,19(8): 979-981.
- [13] WANG M, ZHANG F, XU L, et al. Novel compound heterozygous mutations in SLC26A4 gene in a Chinese Han family with enlarged vestibular aqueduct[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2016, 90: 170-174.
- [14] JABER L, SHOHAT M, BU X, et al. Sensorineural deafness inherited as a tissue specific mitochondrial disorder [J]. J Med Genet, 1992, 29(2): 86-90.
- [15] 查树伟,查倩,许豪勤,等.孕前耳聋基因筛查和耳聋预防[J].中国计划生育学杂志,2016,24(4):274-278.

(收稿日期:2018-02-10 修回日期:2018-05-12)

意义[J].国际检验医学杂志,2017,38(14):1898-1900.

- [12] 汝宇.老年进展性缺血性脑卒中患者外周血 Hcy 变化分析[J].中南医学科学杂志,2016,44(4):439-441.
- [13] 蔡倩,吴晓菊,吴瑜,等.H型高血压与缺血性脑卒中的相关性[J].广东医学,2016,37(17):2622-2624.
- [14] 周浩,刘志辉,魏守超,等.血浆同型半胱氨酸及MTHFR基因多态性与卒中后抑郁的相关性[J/CD].中华脑科疾病与康复杂志(电子版),2016,6(3):161-163.
- [15] 岳伟,吴昊,石志鸿,等.血浆同型半胱氨酸水平与急性缺血性脑卒中患者的卒中复发及死亡关系的研究[J].中华神经医学杂志,2016,15(7):654-659.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-04-14)