

沈阳地区非综合征性耳聋患者的基因芯片检测结果分析^{*}赵连爽, 陈 昕, 代 娣, 郭晓临[△] (中国医科大学附属第一医院检验科, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 探讨基因芯片技术在耳聋基因筛查的临床应用价值, 了解沈阳地区非综合征性耳聋患者致病基因的分子特征。**方法** 采集沈阳地区门诊或病房散发的非综合征性耳聋患者 100 例的外周血并提取 DNA, 应用晶芯遗传性耳聋基因芯片试剂盒检测 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 12SrRNA 4 个常见耳聋基因中的 9 个突变位点。**结果** 在 100 例患者中, 36 例耳聋患者检出遗传性耳聋基因突变, 检出阳性率为 36.0% (36/100); 其中 GJB2、SLC26A4、线粒体 12S rRNA 和 GJB3 基因突变的阳性检出率分别为 20.0% (20/100)、14.0% (14/100)、2.0% (2/100) 和 0.0% (0/100)。检出致聋基因突变型 19 例, 占被检出阳性总数的 52.8% (19/36), 杂合基因突变型 17 例, 占被检出阳性总数的 47.2% (17/36)。**结论** 中国人常见的 4 个致聋基因突变在沈阳地区人群中除 GJB3 外都有一定的检出率。

【关键词】 非综合征性耳聋; 基因芯片; 突变分析; GJB2; SLC26A4

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.08.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)08-1018-02

Genetic analysis of patients with nonsyndromic hearing impairment in Shenyang^{*} ZHAO Lian-shuang, CHEN Xin, DAI Di, GUO Xiao-lin[△] (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application value of gene chip technique in screening genetic deafness, and to understand the molecular characteristics of patients with nonsyndromic hearing impairment in Shenyang. **Methods** DNA samples were extracted from peripheral blood of 100 cases of clinical and ward sporadic nonsyndromic deafness patients in Shenyang, and detected for 9 mutations of 4 common deafness genes, including GJB2, GJB3, SLC26A4 and mitochondrial 12S rRNA by gene chip kits. **Results** In 100 deafness patients, 36 cases were positive with genetic deafness mutations, and the positive rate was 36.0% (36/100), wherein the positive rates of mutation in GJB2, SLC26A4, mitochondrial 12S rRNA and GJB3 respectively were 20.0% (20/100), 14.0% (14/100), 2.0% (2/100) and 0.0% (0/100). There were 19 cases positive with deafness gene mutation type, accounting for 52.8% (19/36), and 17 cases positive with heterozygous mutation type, accounting for 47.2% (17/36). **Conclusion** Except for GJB3 gene, the other three deafness gene mutations could be detected in population of Shenyang.

【Key words】 nonsyndromic hearing impairment; gene chip; mutation analysis; GJB2; SLC26A4

听力障碍是常见的疾病, 据报道每年新生聋儿 3 万人左右, 高居各类残疾首位^[1]; 其中 60% 以上的新生聋儿是由遗传因素导致的^[2-3]。70% 的遗传性耳聋表现为非综合征性耳聋 (NSHI)。中国耳聋人群的分子流行病学调查表明, GJB2、SLC26A4、线粒体 DNA12SrRNA 是中国 NSHI 遗传性耳聋患者最常见的 3 个致病基因, 但不同区域的基因类型检出率存在差异^[4-5]。为了解沈阳地区 NSHI 遗传性耳聋基因的类型, 作者对聋病患者进行 SLC26A4 (2168A>G, IVS7-2A>G)、GJB2 (35delG, 176del16, 235delC, 299delAT)、GJB3 (538 C>T) 和线粒体 12SrRNA (1494C>T, 1555A>G) 4 个遗传基因的 9 个位点进行筛查, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 受检的耳聋患者均来自中国医科大学附属第一医院耳鼻喉科门诊及病房, 共 100 例, 全部为汉族; 其中男 45 例, 女 55 例, 年龄 3 个月至 74 岁, 平均 9.95 岁, 并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 全血 DNA 提取采用天根公司 (TIANGENDP319) 试剂盒; 遗传性耳聋基因检测试剂盒购自北京博

奥生物有限公司; 主要检测仪器包括: AB9700 PCR 仪、晶芯 LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪等。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 采集受检者外周血 2~3 mL (乙二胺四乙酸抗凝), 按照天根公司 (TIANGENDP319) 的全血核酸提取试剂盒说明书操作, 待检 DNA 要求: 浓度 100~200 ng/μL, 纯度 A_{260/280} = 1.7~2.0。

1.3.2 聚合酶链反应 (PCR) 扩增 扩增条件: 96 °C 1 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 70 °C 45 s, 共 32 个循环; 60 °C 10 min。在扩增过程中, 设置以 0.4 °C/s 的速度从 94 °C 降温至 55 °C, 再以 0.2 °C/s 的速度从 55 °C 升温至 70 °C。

1.3.3 芯片杂交、洗涤与甩干 从两个扩增体系管 (A、B) 中各取 2.5 μL PCR 产物加到 10 μL 杂交缓冲液管中。加入 14 μL 杂交混合液, 封闭杂交盒后置于杂交仪中, 60 °C 杂交 1 h。杂交结束后在干洗机中进行洗涤和甩干。

1.3.4 芯片扫描与结果判读 使用 LuxScan™ 10K-B 微阵列扫描仪和相应的遗传性耳聋基因检测芯片判读系统进行信号读取及判断。检测结果由遗传性耳聋基因检测芯片判别系统

* 基金项目: 辽宁省社会发展基金资助项目 (2011225019)。

作者简介: 赵连爽, 男, 本科, 副主任技师, 主要从事个体化医学检测研究。 △ 通讯作者, E-mail: guo_xiaolin@163.com。

进行自动判读。

2 结 果

2.1 基因芯片检测结果 100 例耳聋样本中,有 36 例样本被检出遗传性耳聋基因突变,占总筛查人数的 36.0%(36/100);其中,男 17 例,占男性患者的 37.8%(17/45),女 19 例,占女性患者的 34.6%(19/55);其中 GJB2、SLC26A4、线粒体 12S rRNA 和 GJB3 基因突变的检出率分别为 20.0%(20/100)、14.0%(14/100)、2.0%(2/100)和 0.0%(0/100)。检测出纯合突变、复合杂合突变、杂合突变的耳聋患者分别为 14、5、17 例,检出率分别为 14.0%(14/100)、5.0%(5/100)、17.0%(17/100);携带 2 个基因突变位点(包括各种纯合突变和复合杂合突变)的基因型可以明确是导致耳聋的基因型,本组中有 19 例,占总人数的 19.0%(19/100),占检出遗传性耳聋基因突变总数的 52.8%(19/36);单一杂合突变耳聋患者 17 例,占遗传性耳聋基因突变总数的 47.2%(17/36)。

2.2 GJB2 基因突变 耳聋组共有 20 例检出 GJB2 基因突变,包括 35delG、176del16、235delC、299delAT 四个突变位点。其中纯合、复合基因突变 12 例,占全部被检出携带遗传性耳聋基因突变患者的 33.3%(12/36)。235delC 突变 14 例,检出率占全部患者的 14.0%(14/100),占 GJB2 基因突变的 70.0%(14/20);其中 235delC 纯合突变 7 例,复合杂合突变 3 例(235delC 合并 299delAT 突变 2 例,合并 SLC26A4 IVS7-2 突变 1 例),杂合突变 4 例。299delAT 突变 3 例,检出率为 3.0%(3/100),占 GJB2 基因突变的 15.0%(3/20);其中纯合突变 1 例,杂合突变 2 例。35delG 突变 2 例,检出率 2%(2/100),其中复合杂合突变 1 例(35delG 合并 176del16 突变),杂合突变 1 例。176del16 杂合突变 1 例。

2.3 SLC26A4 基因突变 100 例耳聋样本中检出 SLC26A4 基因突变 14 例,包括 2168A>G 和 IVS7-2A>G 两个突变位点,检出率为 14.0%(14/100),其中纯合、复合杂合突变 6 例,占全部被检出携带遗传性耳聋基因突变患者的 16.7%(6/36),杂合突变 8 例。2168 突变 4 例,检出率 4.0%(4/100),其中纯合突变 1 例,杂合突变 2 例,复合杂合突变 1 例(合并 IVS7-2A>G)。IVS7-2A>G 突变 10 例,检出率 10.0%(10/100),其中纯合突变 4 例,杂合突变 6 例。SLC26A 基因突变检测结果见图 1。

2.4 线粒体 12SrRNA 及 GJB3 基因突变 共检出 2 例线粒体 12SrRNA 基因突变,包括 1494C>T 和 1555A>G 二个突变位点,检出率占 2.0%(2/100)。1 例 1494C>T 突变为杂合突变,1 例 1555A>G 为均质(纯合)突变。在本项研究中没有检测到 GJB3 基因突变。36 例携带遗传性耳聋基因突变分布情况见图 1。

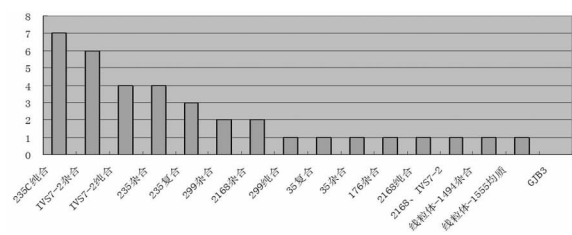


图 1 36 例遗传性耳聋基因突变分布情况

3 讨 论

耳聋的病因包括遗传、胚胎期病毒感染、内耳发育异常等诸多原因,其中遗传性耳聋约占 50%,包括与常染色体显性遗传有关的 23 个基因,与常染色体隐性遗传有关的 35 个基因,

与伴性遗传有关的 2 个基因^[6]。其中 GJB2、GJB3、线粒体 12S rRNA、SLC26A4 可以通过采用多重等位基因特异性 PCR 结合通用(Tag array)的技术对我国人群常见的遗传性耳聋基因突变热点进行大规模的检测。

1997 年 Kelsell 等^[7]克隆了第一个 NSHI 相关基因——缝隙连接蛋白 beta2(GJB2),它来源于外胚层组织,主要分布于人类的耳蜗和皮肤,参与调控感觉毛细胞钾离子回流到内淋巴的过程。并证实该基因突变与常染色体隐性耳聋(DFNB)和常染色体显性耳聋(DFNA)有关,导致感音性神经性耳聋。在已发现的 100 多种 GJB2 基因突变中,白种人隐性遗传性耳聋人群的 35delG 突变携带率为 60%~80%^[8]。作者对 100 例耳聋患者检测发现,GJB2 基因突变的检出率为 20.0%,与于飞等^[9]报道的 21.0% GJB2 基因突变率基本一致。本组 235delC 突变高于其他位点的突变,占 GJB2 基因突变的 70.0%(14/20),符合 235delC 突变为国内最常见基因突变的观点^[10]。GJB2 突变的新生聋儿在 1 岁内接受人工耳蜗植入,再经过系统的听力语言康复训练后效果会更好,所以 GJB2 基因突变检测也是人工耳蜗植入术前的一项疗效预判指标之一。

SLC26A4 基因突变可导致耳聋属于常染色体隐性遗传,即大前庭导水管扩张综合征(EVAS)和 Pendred 综合征。EVAS 患者可表现为先天性或后天性感音性神经性聋,部分患儿出生后有残存的听力,还能进行语言交流;通常 60%左右的 Pendred 综合征患者在 10~29 岁会发生甲状腺肿大。如果临床上早期发现该基因突变患者,结合影像资料,可以通过医生的指导、严格的活动限制和密切的观察来保存患者的残存听力,避免引起颅内压变化的因素,例如感冒发热、不健康的生活方式及头部撞击或外伤等。据报道,SLC26A4 IVS7-2A>G 基因突变大约占我国 EVAS 患者的 97%。本研究中,SLC26A4 基因突变占总数的 14%,其中 IVS7-2A>G 突变为 11 例,占 SLC26A4 基因突变的 78.6%(11/14)。在 13 例(1 例患者未查)患者经中耳 CT 或 MRI 平扫发现有 11 例一侧或双侧大前庭导水管扩张,占 84.62%,较报道的比率低。

1993 年 Prezant 等^[11]证实使用了氨基糖苷类抗生素致聋患者与线粒体 12SrRNA 基因突变有关。表明线粒体 12SrRNA 基因突变与母系遗传性氨基糖苷类药物中毒性耳聋相关联。如果发现该基因突变,那么氨基糖苷类药物均不能在该患者的所有母系家庭成员中使用,避免发生“一针致聋”的悲剧。本项研究中,共检出 2 例线粒体 12SrRNA 基因突变,其中 1 例为 25 岁女性检出 1555 均质(纯合)突变,1 例 2 岁男性 1494 杂合突变。

遗传性耳聋基因检测的意义在于能够预防聋儿的出生、药物性耳聋和迟发型耳聋的发生,是降低耳聋发病率的重要检测方法之一。王苹等^[12]报道了 52 对聋哑夫妇后代可发病率和耳聋基因类型,结果表明只要聋哑夫妇不携带相同的耳聋基因,后代可表现为听力正常的耳聋基因携带者。由于聋-聋婚配引起耳聋的概率为 7.69%,而健康夫妇携带耳聋基因的概率为 0.1%。在聋哑人群中进行基因检测,了解自己的耳聋原因,不与携带相同耳聋基因的异性结合,尽可能规避 GJB2 和 SLC26A4 纯合或复合杂合聋儿出生。但由于目前遗传性耳聋基因检测的局限性,罕见耳聋基因和罕见位点的存在,还有耳聋基因的异质性,对预测生育风险时需要结合综合的临床资料,做出合理的解释和指导。随着耳聋基因检测位点的增加,会越来越多地揭示耳聋的内在病因,降低耳聋的发生率,减少耳聋患者对家庭、社会的负担。(下转第 1022 页)

- et al. Vertical transmission of hepatitis C virus infection. [J]. *Hepatology*, 2004, 39(3): 137-140.
- [4] Zeuzem S, Heathcote EJ, Shiffman ML, et al. Twelve weeks of follow-up is sufficient for the determination of sustained virologic response in patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(1): 106-111.
 - [5] Neumann UP, Berg T, Bahra M, et al. Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2004, 41(5): 830-836.
 - [6] 赵秀丽, 单祥年, 张建琼, 等. 树状 DNA 杂交技术在 HCV 检测中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2003, 21(1): 27-30.
 - [7] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(5): 369-375.
 - [8] 杨瑞锋, 魏来. 丙型肝炎病毒感染的检测 [J]. *临床肝胆病杂志* 2011, 27(1): 1-7.
 - [9] 杨东亮. 丙型肝炎的病毒学检测指标及其临床意义 [J]. *中华肝病杂志*, 2004, 12(2): 104.
 - [10] Echevarría JM, Avellón A, Jonas G, et al. Sensitivity of a modified version of the ARCHITECT Anti-HCV test in detecting samples with immunoblot-confirmed, low-level antibody to hepatitis C virus [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(4): 368-372.
 - [11] 郑怀亮. 献血者丙型肝炎病毒“窗口期”感染的筛查技术展望 [J]. *中华肝病杂志*, 2002, 10(2): 159-160.
 - [12] 李桂珍, 梅秀珍, 刘兴祥, 等. 丙肝抗 HCV 与 HCV RNA 定性、荧光定量之间的关系 [J]. *江西医学检验*, 2003, 21(6): 508.
 - [13] 徐明忠, 王赤林. 抗-HCV 阳性反应血清的 HCV 核酸检测分析 [J]. *中国输血杂志*, 2006, 19(5): 393-394.
 - [14] 蔡红军, 袁克宇, 丁玉美, 等. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 和 ELISA 检测抗-HCV 的比较 [J]. *临床输血与检验*, 2008, 10(1): 54-55.
 - [15] Gretsch D, Corey L, Wilson J. Assessment of HCV RNA levels by QC-PCR: high titer viremia correlates with advanced stage of disease [J]. *J Infect Dis*, 1994, 169(17): 1219-1225.
 - [16] Kumar U, Thomas HC, Monjardino J. Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay; correlation with serum AST [J]. *J Virol Methods*, 1994, 47(1/2): 95-102.
 - [17] 季阳, 庄文, 杨翠, 等. 丙型肝炎病毒感染的献血者 10 年追踪观察 [J]. *中国输血杂志*, 2004, 17(6): 399-403.
 - [18] 吴超良. 胶体金法与酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体的比较 [J]. *临床医学工程*, 2011, 18(5): 701-702.
 - [19] 王志明, 谭复明, 陈伟华, 等. 输血后丙型肝炎病毒感染的血清病毒定量研究 [J]. *中华传染病杂志*, 2000, 18(1): 37-38.
 - [20] 宿振国, 刘义庆, 卢志明, 等. 多指标联合检测在丙型肝炎诊断中的应用 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(10): 1455-1456.
 - [21] Puoti C, Guarisco R, Bellis L, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 322-325.

(收稿日期: 2013-10-05 修回日期: 2013-12-11)

(上接第 1019 页)

参考文献

- [1] 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.
- [2] Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4): 758-764.
- [3] Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans [J]. *Br Med Bull*, 2002, 63(4): 73-94.
- [4] 韩明显, 戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展 [J]. *北京医学*, 2011, 33(5): 419-421.
- [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 12SrRNA A1555G 突变筛查报告 [J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 1(1): 1-5.
- [6] Iatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(10): 1589-1597.
- [7] Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness [J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 80-83.
- [8] Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(9): 1605-1609.
- [9] 于飞, 韩东一, 戴朴, 等. 1190 例非综合征性耳聋患者 GJB2 基因突变序列分析 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40): 2814-2819.
- [10] 郑文波, 罗建红, 郦云, 等. 中国人语前非综合征性耳聋患者 GJB2 基因的突变分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(10): 610-613.
- [11] Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness [J]. *Nat Genet*, 1993, 4(3): 289-294.
- [12] 王苹, 赵佳, 于姝媛, 等. 应用耳聋基因芯片探讨聋哑夫妇的生育风险 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(6): 475-479.

(收稿日期: 2013-09-28 修回日期: 2013-12-05)