

- (7):4-6.
- [9] 张洪存. 心神宁联合黛力新治疗心脏神经官能症 126 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(7):26-27.
- [10] 刘洁云, 杨文, 秦雷. 乌灵胶囊联合黛力新治疗心脏神经官能症 40 例疗效观察[J]. 山东医药, 2011, 51(6):22.
- [11] MUSCATELLO M R, BRUNO A, PANDOLFO G, et al. Effect of aripiprazole augmentation of serotonin reuptake inhibitors or clomipramine in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: a double-blind, placebo-controlled study[J]. J Clin Psychopharmacol, 2011, 31(2):174-179.
- [12] 陈莹, 兰光华. 首次发病的强迫症患者认知功能的研究[J]. 临床精神医学杂志, 2013, 23(4):241-244.
- [13] 康瑞, 康永兵. 无抽搐电休克与喹硫平联合氟伏沙明治疗难治性强迫症的疗效比较[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(11):65-66.
- [14] 熊学智. 氟伏沙明治疗 48 例强迫症患者的临床体会[J].
- 按摩与康复医学, 2011, 2(3):108.
- [15] 邓怀丽, 王斌红, 张俊鸿. 氟伏沙明联合阿立哌唑治疗强迫症的疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(5):719-720.
- [16] 张丽霞, 冀成君, 范宏振, 等. 图式治疗合用氟伏沙明治疗强迫症的随机对照研究[J]. 中国心理卫生杂志, 2015, 29(10):726-728.
- [17] 庞秀梅. 倍他乐克治疗扩张型心肌病的效果及药理作用分析[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(14):61-62.
- [18] 王巨会. 通脉养心丸联合倍他乐克治疗室性早搏的疗效评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(14):1563-1565.
- [19] 周海平, 钟远惠, 何晓华, 等. 氟伏沙明联合思维阻断疗法治疗强迫症的效果观察[J]. 四川精神卫生, 2015, 28(5):407-410.

(收稿日期:2018-01-06 修回日期:2018-05-19)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.033

芯片法和飞行时间质谱法在非综合征性耳聋基因筛查中的应用比较^{*}

付华钰, 李 娇, 李 萌, 许涓涓, 黄萍丽, 陈碧艳, 杜 娟[△]

(广西壮族自治区妇幼保健院, 南宁 530003)

摘要:目的 通过对比芯片法和飞行时间质谱法在非综合征性耳聋基因筛查中的优劣, 为非综合征性耳聋筛查方法的选择提供依据。方法 应用芯片法和飞行时间质谱法对 710 例研究对象(儿童、成年人及胎儿)进行耳聋基因筛查。结果 芯片法检出异常 37 例, 其中杂合突变 25 例, 纯合/同质突变 11 例; 飞行时间质谱法检出异常 45 例, 其中杂合突变 32 例, 纯合/同质突变 11 例。两种方法 GJB2 的检出率均为 3.24%, 在所有基因中检出率最高, 其次为 SLC26A4。两种方法的检测结果比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 耳聋基因检测应用于疾病筛查, 可早期发现疾病、明确病因, 通过早期干预延缓疾病进程; 芯片法和飞行时间质谱法各有其优缺点, 医疗或研究机构可根据自身条件选择合适的筛查方法。

关键词:非综合征性耳聋; 耳聋基因; 芯片法; 飞行时间质谱法

中图法分类号:R764.43

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)20-3111-03

我国每年约出生 2 000 万个新生儿, 据资料显示, 约有 1% 新生儿患先天性耳聋^[1], 每年将新增约 2 万名听力障碍新生儿, 其中 60% 与遗传因素有关^[2-4]。韩明昱等^[5] 研究显示, 我国常见耳聋基因携带率为 5.3%。周怡等^[1] 对北京地区新生儿筛查, 耳聋基因的携带率为 3.6%。耳聋对患儿的认知、学习、交流能力有严重影响, 在成长过程中的教育、治疗等费用支出巨大, 给社会和家庭造成了严重的负担。因此, 开展孕前和孕期夫妇耳聋基因筛查, 并对高风险孕妇进行产前诊断、遗传咨询和医学干预, 才是早期预防、减少耳聋患儿出生的有效措施之一。

非综合征性耳聋是指以耳聋为唯一症状的疾病, 多为中重度、极重度感音神经性聋^[6]。目前国内常见导致遗传性非综合征性耳聋的致病基因为 GJB2、

GJB3、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 等^[7]。目前用于耳聋基因筛查的方法有很多种, 如测序法、变性高效液相色谱分析、限制性片段长度多态性分析、限制性酶切指纹-单链构象多态性分析、芯片法以及飞行时间质谱法^[8]。前 3 种方法成本高、操作复杂, 不适于临床应用和大规模筛查。芯片法可检测中国人常见的 4 个耳聋致病基因的 9 个位点。飞行时间质谱法的全称为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 该技术可检测常见的 4 个耳聋基因的 20 个位点。本研究旨在探讨芯片法和飞行时间质谱法在耳聋基因筛查中的作用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 5 月至 2015 年 4 月在本院耳鼻喉科、儿科、遗传门诊就诊并自愿接受耳聋

^{*} 基金项目:广西壮族自治区科技厅课题[桂科攻(1140003B-82)]; 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z2016702)。

[△] 通信作者, E-mail:xyycmz@163.com。

基因筛查的儿童、成人及胎儿,共 710 例。其中男 371 例,女 335 例,胎儿 4 例;年龄 1~44 岁,中位年龄 21.6 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集受检者外周静脉血 4 mL、抽取胎儿羊水 10 mL。

1.2.2 提取 DNA 将外周血和羊水离心后的沉淀细胞按照 Qiangen 公司 DNA 提取试剂盒说明书,经裂解、吸附、洗脱、溶解的步骤,提取标本 DNA。并用紫外分光光度计测定 DNA 溶液的浓度和纯度。

1.3 基因检测

1.3.1 芯片法 采用博奥生物工程有限公司的晶芯九项遗传性耳聋基因检测试剂盒(微阵列芯片法)进行检测。主要仪器、设备:聚合酶链反应(PCR)仪、晶芯 BioMixer II 杂交仪、晶芯 Slide Washer 芯片洗干仪、晶芯 LuxScan 10K-B 芯片扫描仪和数据判别系统(博奥生物工程有限公司)。该微阵列芯片包含 9 个检测位点,具体位点见表 1。根据试剂盒说明进行核

酸扩增、杂交、洗片、扫描及信号读取。根据说明书进行结果判读。

表 1 芯片法的检测位点

基因名称	突变位点
GJB2	35delG、176del16、235delC、299delAT
GJB3	538C>T
SLC26A4	IVS7-2A>G、2168A>G
12S rRNA	1494C>T、1555A>G

1.3.2 飞行时间质谱法 与华大基因公司合作,借助其飞行时间质谱的技术和设备进行基因检测。仪器设备:Mass ARRAY DNA 质谱阵列基因分析系统、ABI 3130XL 测序仪、PCR 仪、Mass ARRAY 微量点样系统以及试剂盒。样本 DNA 进行提取、扩增、消化、延伸和纯化,产物质谱检测(详细步骤参照 Sequenom Spectro CHIP Arrays 操作说明书),最后测序和数据分析。检测 20 个耳聋基因位点,具体位点见表 2。

表 2 飞行时间质谱法的检测位点

基因名称	突变位点
GJB2	35delG、176del16、167delT、235delC、299delAT
GJB3	538C>T、547G>A
SLC26A4	IVS7-2A>G、2168A>G、281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T
12S rRNA	1494C>T、1555A>G

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

710 例研究对象中,芯片法检出异常 37 例,其中杂合突变 25 例,纯合/同质突变 11 例,235delC 杂合突变复合 1555A>G 同质突变 1 例;飞行时间质谱法检出异常 45 例,其中杂合突变 32 例,纯合/同质突变 11 例,235delC 杂合突变复合 1555A>G 同质突变 1 例和 1229C>T 与 1975G>C 双重杂合突变 1 例。两种方法的检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、4。

表 3 两种方法的检测结果(n)

基因突变位点	芯片法		飞行时间质谱法	
	杂合/异质	纯合/同质	杂合/异质	纯合/同质
GJB2				
235delC	15	2	15	2
299delAT	2	2	2	2
176del16	1	0	1	0
GJB3				
538C>T	1	0	1	0
547G>A	0	0	1	0
SLC26A4				
IVS7-2A>G	6	2	6	2
1174A>T	0	0	1	0
1229C>T	0	0	5	0

续表 3 两种方法的检测结果(n)

基因突变位点	芯片法		飞行时间质谱法	
	杂合/异质	纯合/同质	杂合/异质	纯合/同质
1975G>C	0	0	0	0
12S rRNA				
1555A>G	0	5	0	5
复合突变				
235delC 杂合并 1555A>G 同质		1		1
1229C>T、1975G>C				
双杂	0		1	
合计	37		45	

表 4 两种方法的检出率比较

方法	异常(n)	正常(n)	合计(n)	检出率(%)
芯片法	37	673	710	5.21
飞行时间质谱法	45	665	710	6.34

3 讨 论

中国人群中常见的非综合征性耳聋致病基因 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 中,GJB2 基因突变发生率最高,占 26%~33%,其中主要为 235delC、299delAT、176del16;SLC26A4 基因常见突变为 IVS7-2A>G,本研究的结果与文献[9-10]报道结果是一致的。本研究中应用芯片法和飞行时间质谱法进行耳聋基因筛查,芯片法的检测结果中,GJB2

的检出率为 3.24%，其次为 SLC26A4，检出率为 1.13%。飞行时间质谱法的 GJB2 的检出率与芯片法相同，SLC26A4 基因突变的检出率略高，为 2.11%。飞行时间质谱法包含的检测位点多，检出的基因携带者例数较芯片法高，但以上 2 种方法的检测结果，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这两种方法均包含了以上常见基因及其位点，虽然飞行时间质谱法所含的基因位点更多，但芯片法的 9 个突变位点已经可以满足临床普通筛查的需要，这与统计学的结果：两种方法差异无统计学意义 ($P>0.05$) 是相符的。

耳聋基因筛查的目的是发现高危人群、预防疾病发生、降低出生缺陷。若儿童筛查的结果为基因纯合突变、双重杂合突变或线粒体同质突变，可进行相应的治疗改善其听力，或采取预防措施，避免患儿听力受损。对于双方均为基因携带者的夫妇，可进行相应的遗传风险咨询和婚育指导，必要时进行产前诊断，可避免耳聋患儿出生，以降低耳聋发生率。不同的基因发生突变，其导致耳聋的机制是不同的，预防和治疗的措施也是不同的。

GJB2 位于染色体 13q11-12，为常染色体隐性遗传，编码连接蛋白 CX26，负责细胞间的信号传导，维持耳蜗内淋巴液高钾形成的正电位，保证细胞的正常功能。当 GJB2 基因发生突变后，编码连接蛋白 CX26 产量下降，直接影响 K^+ 进入淋巴系统循环，从而导致神经性耳聋^[11]。GJB3 位于 1 号染色体 1p33-35，为常染色体隐性或显性遗传，编码缝隙连接蛋白 CX31，该基因发生致病性突变可导致高频听力损失^[6]。SLC26A4 位于 7 号染色体 7q22-31.1，常染色体隐性遗传，编码蛋白质 Pendrin，SLC26A4 基因致病性突变可导致 Pendred 综合征或大前庭导水管综合征。大前庭导水管综合征主要表现为迟发性语后聋。12S rRNA 为中国人人群中常见的线粒体耳聋致病基因^[11]，为母系遗传，携带该基因的个体对氨基糖苷类抗菌药物具有高度的敏感性。致病突变在 12S rRNA 的 A 区形成一个新的结合碱基对，使 12S rRNA 的二级结构与细菌的 16S rRNA 更为相似，新结合碱基对促进了氨基糖苷类药物与线粒体 12S rRNA 相结合，抑制线粒体蛋白合成、使 ATP 产量下降，细胞内外离子浓度失衡，导致细胞损伤或凋亡^[7]，使得携带该类突变的个体在使用氨基糖苷类药物后会发生听力缺失^[11]。本研究主要通过对比线粒体 12S rRNA、SLC26A4、GJB2、GJB3 4 个基因致病位点的检出率，探讨芯片法和飞行时间质谱法在非综合征性耳聋基因筛查的优劣，为临床疾病筛查工作提供相关依据。

我国人口众多，耳聋基因的携带率和耳聋发病率均较高，因此开展耳聋基因筛查、降低耳聋发病率是一项长期而艰巨的任务。本研究中应用的两种筛查方法各有其优、缺点。芯片法包含了常见耳聋基因的 9 个突变位点，该方法所需的仪器设备少，成本低，操作和数据读取简单，适用于在临床工作中进行常规筛

查。飞行时间质谱法涵盖了 4 个常见基因的 20 个位点，可检测范围广，检出率高，可以在一定程度上降低漏诊率，可应用于大规模人群的筛查和研究^[12]。但该方法所需的仪器设备成本较高，且操作流程复杂，需要专业技术人员进行操作和读取数据，推广至一般的医疗机构有一定的困难。

随着人们优生优育意识的提高和医学的不断进步，耳聋基因筛查将会广泛地进行开展，各医疗或研究机构可根据自身的条件选择筛查的方法。总之，医务工作者的目标是通过耳聋基因筛查，做到早发现、早预防、早诊断、早治疗，尽可能地保护患儿听力，降低耳聋发病率及出生率。

参考文献

- [1] 周怡, 刘海红, 郝津生, 等. 15 343 例新生儿耳聋基因普遍筛查结果分析[J]. 中国听力语言康复科学杂志, 2014, 12 (2): 109-112.
- [2] 陆小梅, 彭琪, 黎四平. 非综合征型遗传性耳聋基因突变及检测方法的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2016, 43 (2): 421-425.
- [3] 常亮, 赵楠, 刘平, 等. 耳聋基因芯片技术在孕妇耳聋基因突变检测中的应用[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28 (30): 5048-5050.
- [4] 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.
- [5] 韩明昱, 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.
- [6] CHEN T, JIANG L, LIU C, et al. Update of the spectrum of GJB2 mutations in 107 patients with nonsyndromic hearing loss in the Fujian population of China[J]. Ann Hum Genet, 2014, 78 (3): 235-242.
- [7] 范文露, 时雯雯, 王必斌, 等. 浙江省 1 822 例非综合征性感音神经性聋患者 GJB2 基因突变分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 5 (31): 352-355.
- [8] DYLAN K, CHAN K W. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype[J]. Laryngoscope, 2014, 124 (2): 34-53.
- [9] 刘玉和, 袁慧军. 遗传性聋的基因诊断与遗传咨询[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 48 (12): 1051-1056.
- [10] FU C, ZHENG H, ZHANG S, et al. Mutation screening of the SLCA26A4 gene in a cohort of 192 Chinese patients with congenital hypothyroidism[J]. Archi Endocrinol Medab, 2016, 60 (4): 323-325.
- [11] 陈方方, 郭紫芬, 轩贵平. 线粒体 12S rRNA 突变与耳聋相关性研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40 (3): 228-233.
- [12] 唐燕青, 文春秀, 陈碧艳, 等. 21 386 例新生儿听力筛查与聋病易感基因联合筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25 (10): 66-67.