

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.24.019

# 新生儿听力筛查联合 PCR-导流杂交技术在遗传性非综合征型耳聋患儿筛查中的应用

苏炳森<sup>1</sup>, 苏小杰<sup>1</sup>, 成立松<sup>2</sup>, 吴柳英<sup>2</sup>

广东省中山火炬开发区医院:1. 检验科;2. 产科, 广东中山 528437

**摘要:**目的 探讨新生儿听力筛查联合 PCR-导流杂交技术在遗传性非综合征型耳聋患儿筛查中的应用价值。方法 选取 2019 年 4—11 月于该院出生的 2 145 例新生儿作为研究对象,所有新生儿均进行听力筛查[自动听性脑干反应法(AABR)+耳声发射法(OAE)]和 PCR-导流杂交技术检测。比较耳聋患儿和正常听力新生儿的耳聋基因检出率;比较耳聋患儿和正常听力新生儿 GJB2 基因、GJB3 基因、sLc26A4 基因、mtDNA 基因中 9 个突变位点的分布情况。结果 共有 39 例(1.82%)新生儿未通过 AABR+OAE 筛查,均在听力诊断性检查中判定为耳聋,其中轻度、中度、中重度、重度耳聋分别为 7、11、13、8 例。39 例耳聋患儿中共检出 9 例患儿携带耳聋基因,检出率为 23.08%,正常听力新生儿中共检出 66 例携带耳聋基因,检出率为 3.13%,耳聋患儿耳聋基因检出率高于正常听力新生儿( $\chi^2=45.134, P<0.001$ )。耳聋患儿与正常听力新生儿 GJB2 基因 35delG、176del16、235delC、299delAT, mtDNA 基因 1494C>T、1555A>G, GJB3 基因 538C>T, sLc26A4 基因 IVS7-2A>G、2168A>G 9 个突变位点的构成比比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 AABR+OAE 筛查联合 PCR-导流杂交技术可筛查出各种致聋基因,指导临床对耳聋患儿进行及早干预。

**关键词:**新生儿; 自动听性脑干反应法; 耳声发射法; PCR-导流杂交技术; 遗传性非综合征型耳聋  
中图分类号:R764.43 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2020)24-3622-03

## Application of newborn hearing screening combined with PCR-guided hybridization technology in the screening of newborns with hereditary non-syndromic deafness

SU Bingsen<sup>1</sup>, SU Xiaojie<sup>1</sup>, CHENG Lisong<sup>2</sup>, WU Liuying<sup>2</sup>

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Obstetrics, Zhongshan Torch Development District Hospital, Zhongshan, Guangdong 528437, China

**Abstract: Objective** To explore the application value of newborn hearing screening combined with PCR-guided hybridization technology in the screening of newborns with hereditary non-syndromic deafness. **Methods** A total of 2 145 newborns born in the hospital from April to November 2019 were selected as the research objects. All newborns underwent hearing screening [automatic auditory brainstem response (AABR)+otoacoustic emission (OAE)] and PCR-guided hybridization technology. The detection rate of deaf newborns and normal hearing newborns was compared. The distribution of 9 mutation sites in the GJB2 gene, GJB3 gene, sLc26A4 gene and mtDNA gene were compared between deaf newborns and normal hearing newborns. **Results** A total of 39 newborns (1.82%) did not pass the AABR+OAE screening, all of which were judged to be deaf in the diagnostic hearing test. Among them, there were 7 cases, 11 cases, 13 cases, and 8 cases of mild, moderate, moderate-severe and severe deafness. A total of 9 newborns with deafness genes were detected in 39 deaf newborns, and the detection rate was 23.08%. A total of 66 normal hearing newborns were detected as carrying deafness genes, the detection rate was 3.13%. The composition rate of deafness genes in deaf newborns was higher than that in normal hearing newborns ( $\chi^2=45.134, P<0.001$ ). The composition ratio of 9 mutations of GJB2 gene 35delG, 176del16, 235delC, 299delAT, mtDNA gene 1494C>T, 1555A>G, GJB3 gene 538C>T, sLc26A4 gene IVS7-2A>G and 2168A>G between deaf newborns and normal hearing newborns were not statistically significant ( $P>0.05$ ). **Conclusion** AABR+OAE screening combine with PCR-guided hybridization can screen out various deafness genes and guide clinical early intervention for deaf newborns.

**Key words:** newborn; automatic auditory brainstem response; otoacoustic emission; PCR-guided hybridization technology; hereditary non-syndromic deafness

耳聋是由听觉传导通路发生器质性或功能性病变导致,每年有 1/1 000~3/1 000 的新生儿为耳聋患

儿,耳聋还会导致语言障碍,对患儿及其家庭造成严重影响<sup>[1]</sup>。耳聋患者 60% 以上为遗传性耳聋,而 60%~70% 的遗传性耳聋为遗传性非综合征型耳聋<sup>[2-3]</sup>。遗传性非综合征型耳聋发病原因为基因组异常导致听力功能障碍,但未合并其他系统异常,临床上以 GJB2 基因、GJB3 基因、sLc26A4 基因、mtDNA 基因突变最为常见。听力筛查可早期诊断新生儿耳聋,但筛查未通过的新生儿需要在 3 个月后再进行听力诊断,可能导致患儿错过最佳治疗时机。PCR-导流杂交技术具有操作简单、价格便宜、高通量等优点,是耳聋基因突变检测的新方法,可一次性检测 4 个耳聋基因的 9 个突变位点<sup>[4]</sup>。本文以新生儿作为研究对象,分析自动听性脑干反应法(AABR)+耳声发射法(OAE)、PCR-导流杂交技术对新生儿耳聋的筛查结果,比较听力筛查结果为耳聋的患儿和正常听力新生儿的耳聋基因检出率,分析 GJB2 基因、GJB3 基因、sLc26A4 基因、mtDNA 基因的 9 个突变位点在耳聋患儿和正常听力新生儿中的分布情况,现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2019 年 4—11 月于本院出生的 2 145 例新生儿作为研究对象,其中男 1 098 例,女 1 047 例;出生体质量 2 758~4 367 g,平均(3 438.83±588.48)g。本研究经本院伦理委员会批准,患儿家属签署知情同意书。

#### 1.2 方法

**1.2.1 听力筛查** 采用 AABR+OAE 在新生儿出生 2 d 时进行听力初筛,未通过者在出生 42 d 时行听力复查,仍未通过者在出生 3 个月时行听力诊断性检查,确定是否为耳聋。

**1.2.2 PCR-导流杂交技术** 抽取 100 μL 全血进行抗凝处理,采用潮州凯普生物化学有限公司生产的血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。从数据库中选择 GJB2 基因、GJB3 基因、sLc26A4 基因、mtDNA 基因序列,设计 4 对引物,对 GJB2 基因 35delG、176del16、235delC、299delAT, GJB3 基因 538C>T, sLc26A4 基因 2168A>G、IVS7-2A>G, mtDNA 基因 1494C>T、1555A>G 共 9 个突变位点进行扩增。取 2 μL 提取好的 DNA 标本作为模板,取 28 μL 扩增试剂,一同加入 PCR 反应管中进行 PCR 扩增。扩增条件:95 ℃ 9 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环 40 次;72 ℃ 5 min,16 ℃ 10 s。将 PCR 产物于 95 ℃ 变性 5~10 min,冰水浴 2 min。进行膜条杂交,准备好杂交仪后,加入已变性的 PCR 产物 DNA 到已预热至 45 ℃ 的 0.8 mL 杂交液中,混匀,进行 20 min 导流杂交。然后用 45 ℃ 的洗脱液冲洗膜 3~4 次,每次间隔 5 s,每次 0.8 mL;调整温度为 25 ℃,用 0.5 mL 封阻液封闭膜,重复 1 次。加入 0.5 mL 酶标液,温育 5 min;调整温度至 35 ℃,用溶

液 A(2×枸橼酸钠缓冲液、0.1% 十二烷基磺酸钠)彻底洗膜 4 次,每次 0.8 mL。加入 0.5 mL 显色液,显色 6 min;用杂交液洗膜 3 次,每次 0.8 mL,再用 2.0 mL 蒸馏水漂洗,1 h 内分析结果。

**1.3 观察指标** 分析 AABR+OAE 筛查结果;比较耳聋患儿与正常听力新生儿的耳聋基因检出率;比较 GJB2 基因 35delG、176del16、235delC、299delAT, GJB3 基因 538C>T, sLc26A4 基因 2168A>G、IVS7-2A>G, mtDNA 基因 1494C>T、1555A>G 9 个突变位点在耳聋患儿和正常听力新生儿中的分布情况。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AABR+OAE 筛查结果** 2 145 例新生儿中,有 2 106 例通过筛查,为正常听力新生儿;有 39 例(1.82%)未通过筛查,在行听力诊断性检查中判定为耳聋,其中轻度、中度、中重度、重度耳聋分别为 7、11、13、8 例。

**2.2 耳聋患儿与正常听力新生儿的耳聋基因检测结果比较** 39 例耳聋患儿中共检出 9 例患儿携带耳聋基因,检出率为 23.08%,正常听力新生儿中共检出 66 例携带耳聋基因,构成比为 3.13%,耳聋患儿耳聋基因检出率高于正常听力新生儿( $\chi^2=45.134, P<0.001$ )。

**2.3 耳聋基因突变位点在耳聋患儿与正常听力新生儿中的分布情况比较** 耳聋基因中, GJB2 基因 235delC 突变位点构成比最高,占 52.00%(39/75)。耳聋患儿与正常听力新生儿 GJB2 基因 35delG、176del16、235delC、299delAT, mtDNA 基因 1494C>T、1555A>G, GJB3 基因 538C>T, sLc26A4 基因 IVS7-2A>G、2168A>G 9 个突变位点的构成比比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 耳聋基因突变位点在耳聋患儿与正常听力新生儿中的分布情况比较[n(%)]

耳聋基因	突变位点	耳聋患儿	正常听力新生儿	$\chi^2$	<i>P</i>
GJB2	35delG	0(0.00)	2(3.03)	—	0.999
	176del16	0(0.00)	2(3.03)	—	0.999
	235delC	6(66.67)	33(50.00)	0.881	0.348
	299delAT	1(11.11)	5(7.58)	0.134	0.714
mtDNA	1494C>T	0(0.00)	4(6.06)	—	0.999
	1555A>G	0(0.00)	3(4.55)	—	0.999
GJB3	538C>T	1(11.11)	1(1.52)	2.810	0.094
	IVS7-2A>G	1(11.11)	14(21.21)	0.505	0.477
sLc26A4	2168A>G	0(0.00)	2(3.03)	—	0.999

注:—表示使用 Fisher 确切概率法进行检验,故无  $\chi^2$  值。

### 3 讨 论

耳聋是常见的新生儿出生缺陷,可对患儿智力、语言的发育造成不良影响<sup>[5]</sup>。因此,早期对新生儿进行听力筛查和诊断,并采取相应的措施具有重要意义。目前,新生儿听力筛查主要采用 AABR+OAE, AABR 筛查耳蜗以后部位异常导致的听力障碍, OAE 筛查耳蜗以前部位异常导致的听力障碍, AABR+OAE 筛查可全面覆盖听力传导过程中各部位异常导致的听力障碍<sup>[6]</sup>,但未通过 AABR+OAE 筛查的新生儿需要在 3 个月后才能进行听力诊断性检查,整个诊断过程耗时较长,可能会延误治疗的最佳时机。

相关研究表明,遗传也是导致耳聋的主要因素,有耳聋基因的新生儿其听力在出生后可能没有异常,但可能在以后的成长过程中出现听力障碍,因此检测耳聋基因可弥补听力筛查的不足<sup>[7]</sup>。对于耳聋基因的检测,目前常用的有微阵列基因芯片法、荧光 PCR 法等,但微阵列基因芯片法价格较高,荧光 PCR 法因检测通道限制而不能同时检测基因的多个突变位点,操作较为复杂。PCR-导流杂交技术只需将探针的膜条与扩增序列一次性杂交,即可对 DNA 中的多种突变进行同时筛查,其原理是利用扩增的 PCR 产物和标记的探针杂交后的斑点杂交信号强弱来判断是否突变,具有价格便宜、操作方便等优点<sup>[8]</sup>。本研究中, AABR+OAE 筛查时,共有 39 例(1.82%)患儿未通过,最终在听力诊断性检查中判定为耳聋; PCR-导流杂交技术共检测出 75 例耳聋基因携带者,包括 9 例耳聋患儿和 66 例正常听力新生儿,耳聋患儿的耳聋基因检出率明显高于正常听力新生儿。上述结果表明,耳聋基因突变在耳聋患儿中的检出率较高,是导致新生儿耳聋的重要原因,与张小娥等<sup>[9]</sup>的研究结果相同。

GJB2 基因是导致遗传性非综合征型耳聋的常见基因,有研究表明,耳聋基因中 GJB2 基因 235delC 突变位点的检出率最高。GJB2 基因与先天性听力障碍有关,且该基因导致的耳聋患者发病年龄多数为 6 个月至 20 岁,多数新生儿在出生后通过了听力筛查,但在成长过程中会慢慢出现听力障碍<sup>[10-11]</sup>。本研究分析了常见的 4 个遗传性非综合征型耳聋基因的 9 个突变位点,结果显示,耳聋基因中, GJB2 基因 235delC 突变位点构成比最高,占 52.00%(39/75),结果与彭陆衡<sup>[12]</sup>的研究结果类似。本研究结果还显示,耳聋患儿与正常听力新生儿 9 个突变位点的构成比比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),表明耳聋患儿与

正常听力新生儿不同耳聋基因的突变位点分布无明显差异。

综上所述,采用 AABR+OAE 对耳聋进行初筛,再联合 PCR-导流杂交技术对耳聋基因进行检测可筛查出各种致聋基因,早期指导临床对耳聋患儿进行干预,改善其预后,具有较高的临床应用价值。

### 参考文献

- [1] 汤超,冯益进.某医院 2016—2017 年二胎高龄产妇新生儿听力筛查结果分析[J].安徽医学,2018,39(7):835-838.
- [2] 刘丽琴,马彦萍,张恩东.重症监护病房新生儿听力联合耳聋基因筛查结果分析[J].听力学及言语疾病杂志,2019,27(4):388-391.
- [3] SUBASIOGLU A, DUMAN D, SIRMACI A, et al. Research of genetic bases of hereditary non-syndromic hearing loss[J]. Turk Pediatri Ars, 2017, 52(3):122-132.
- [4] 叶敏南,李文瑞,彭琪,等. PCR-反向斑点杂交膜芯片技术在遗传性非综合征耳聋患儿基因检测中的应用[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(23):1811-1814.
- [5] 孙晓艳,丁洁,张莺,等. 2013—2017 年嘉兴市 268 187 例新生儿听力筛查结果分析[J].中国儿童保健杂志,2019,27(4):453-456.
- [6] SHEIKH R M, LEENSEN M C, DE LAAT J A, et al. Cross-sectional evaluation of an internet-based hearing screening test in an occupational setting[J]. Scand J Work Environ Health, 2017, 43(3):279-286.
- [7] 白雪晶,冯磊,徐文波,等.玉溪市某特殊教育学校 131 例青少年耳聋患者耳聋基因分析[J].检验医学与临床,2018,15(16):34-36.
- [8] 余雪姣,陈英,张敏波.导流杂交技术检测浙西地区女性 HPV 病毒感染基因谱分析[J].中国卫生检验杂志,2018,28(19):2391-2394.
- [9] 张小娥,陈娟. NICU 新生儿听力筛查联合遗传性耳聋基因检测的结果分析[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(11):83-85.
- [10] 李璨,戴尉君,张焱,等.非综合征型聋相关基因研究进展[J].国际耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,42(6):354-358.
- [11] 徐晨阳,项延包,陈冲,等.浙南地区 GJB2 基因突变致聋家系的临床表型与致病突变分析[J].中华医学遗传学杂志,2017,34(4):519-523.
- [12] 彭陆衡.基于 PCR-RDB 技术的膜芯片开发并应用于遗传性非综合征耳聋检测[J].泰山医学院学报,2017,38(8):935-936.