

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201605002

· 论著 ·

# 荧光 PCR 法在非综合征型遗传性耳聋 基因诊断中的应用研究

刘亚兰,汪俊程,邓宇元,冯永

(中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室,湖南长沙 410008)

**摘要:** **目的** 分析 GJB2、SLC26A4 和 mtDNA12SrRNA 基因热点突变在非综合征型遗传性耳聋人群中的突变谱和突变频率。**方法** 采用荧光 PCR 法,针对本院收集的 126 例非综合征型耳聋患者进行中国人群常见的 3 个耳聋致病基因 GJB2、SLC26A4 和 mtDNA 12SrRNA 的 10 个热点突变的筛查,分析总结突变数据。阳性结果进一步采用直接测序法进行验证。**结果** 应用荧光 PCR 技术在 126 例非综合征型耳聋(non syndromic hearing loss, NSHL)患者中检测出携带基因突变的患者 31 例,阳性率为 24.6% (31/126),其中 GJB2 双等位基因突变、SLC26A4 双等位基因突变和 12SrRNA 的均质突变分别占该人群分子病因的 6.35% (8/126)、2.33% (3/126) 和 3.17% (4/126)。此外,IVS7-2A>G 单等位基因突变的检出率高达 11.11% (14/126)。GJB2 c.235delC 和 SLC26A4 IVS7-2A>G 是本研究中最为常见的热点突变。进一步采用直接测序法验证阳性位点,其结果与荧光 PCR 法一致。**结论** GJB2 双等位基因突变是本研究人群最为常见的分子致病因素,其次为 SLC26A4 双等位基因突变和 12SrRNA 的均质突变。GJB2 c.235delC 和 SLC26A4 IVS7-2A>G 是本研究中最为常见的热点突变。

**关键词:** 遗传性耳聋;基因诊断;荧光 PCR;热点突变

中图分类号:Q789;R764.43 文献标识码:A 文章编号:1007-1520(2016)05-0345-05

## Application of fluorescence PCR technique in gene diagnosis of non-syndromic hearing loss

LIU Ya-lan, WANG Jun-cheng, DENG Yu-yuan, FENG Yong

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the mutation frequency and spectrum of GJB2, SLC26A4 and mtDNA12SrRNA gene hotspot mutations in non-syndromic hearing loss (NSHL) population. **Methods** Mutation screening was performed on 126 cases with NSHL collected in our hospital by fluorescence PCR technique. Ten common mutations of three deafness-related genes GJB2, mtDNA12srRNA and SLC26A4 were included. Then the mutation data were analyzed and summarized, and the positive results were further validated by Sanger sequencing. **Results** Allelic variants were observed in 31 of the 126 patients with a positive rate of 24.6% (31/126). The incidences of biallelic mutations in GJB2, SLC26A4 and homogeneous mutations in 12SrRNA were 6.35% (8/126), 2.33% (3/126) and 3.17% (4/126) respectively. In addition, the prevalence of IVS7-2A>G single allele mutation was 11.11% (14/126). GJB2 c.235delC and SLC26A4 IVS7-2A>G were the most common hotspot mutations in our study. The positive results further validated by Sanger sequencing showed consistent with those by fluorescent PCR method. **Conclusion** In the NSHL population studied, GJB2 biallelic mutations are the most common molecular risk factors followed by SLC26A4 biallelic mutations and 12SrRNA homogeneous mutations. GJB2 c.235delC and SLC26A4 IVS7-2A>G are the most common hotspot mutations.

**Key words:** Hereditary deafness; Genetic diagnosis; Fluorescence PCR; Hotspot mutation

基金项目:国家自然科学基金(81470705,81301172);公益性行业基金(201302001);湖南省自然科学基金院校联合项目(14JJ7009);湖南省科技计划项目(S2012F1023)。

作者简介:刘亚兰,女,博士,助理研究员。

通信作者:冯永,Email:fengyong\_hn@hotmail.com

耳聋是影响人类健康和造成人类残疾的最常见原因,在每年出生的新生儿中,重度听力障碍者约占1%~3%<sup>[1]</sup>。临床上最为多见的重-极重度耳聋多属感音神经性耳聋,表现为先天性耳聋或语前聋,无法根据临床表现作出病因诊断,且无有效药物治疗方法,虽然配戴助听器或植入人工耳蜗等辅助手段可以帮助部分患者提高或恢复听力功能,但并未从根本上解决耳聋的病因及预防相同表型后代的出现,因此明确耳聋病因是关键。耳聋的病因包括听觉创伤、耳毒性药物聋、病毒感染、细菌感染等环境因素以及遗传因素,所占比例达到60%的遗传因素引起的耳聋称为遗传性耳聋(hereditary hearing loss, HHL),其中约70%为非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)<sup>[2]</sup>。国内外的研究已克隆NSHL致病基因93个(<http://hereditaryhearingloss.org/>),其中GJB2、SLC26A4及线粒体12SrRNA是中国NSHL人群最为常见的致病基因,其突变的人群携带率高达6%<sup>[3-5]</sup>,而这部分患者本来可以通过初级预防措施得以避免。

国内外流行病学研究结果表明,耳聋高发致病基因及突变热点存在种族和人群差异<sup>[6]</sup>。因此,采用基于中国人群的耳聋遗传特征的检测技术,针对遗传性耳聋患者进行高效准确的基因诊断、产前诊断,对降低耳聋发病率、早期实施临床干预等有重要意义。本研究采用荧光PCR法,针对本院收集的126例非综合征型耳聋患者进行中国人群常见的3个耳聋致病基因GJB2、SLC26A4和mtDNA 12SrRNA的10个热点突变的筛查,分析总结突变数据,为今后的防聋治聋工作提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2014年9月~2016年3月就诊于中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科的非综合征型耳聋患者126例,其中男69例,女57例;年龄0~63岁,听力损失的发病年龄从1~30岁不等。纳入标准:未知病因的非综合征型耳聋患者。排除标准:①合并有其他临床表现的综合征型耳聋患者;②其他致聋环境因素引起的耳聋。

### 1.2 研究方法

1.2.1 病史采集 对患者进行全身体格检查及耳鼻咽喉专科检查后,采用问卷调查及询问患儿家长等方式采集病史资料,内容包括基本情况、疾病史、

家族史、耳部外伤史、耳毒性药物史、母亲分娩史、新生儿期高危因素、全身其他系统情况(心脏病、骨骼发育、视力)、外耳和中耳疾病史和听力学检查资料等。所有患者均签署了知情同意书。

1.2.2 听力检查及采血 根据研究对象的年龄和配合程度进行听力学检查,包括纯音测听(PTA)、听性脑干反应(ABR)、声导抗、耳声发射(DPOAE)、听觉多频稳态诱发反应(ASSR)、行为测听等。纯音测听以听力水平的分贝值(dB)为单位,以频率500、1 000、2 000、4 000 Hz的听阈平均值计算,将听力损失的严重程度按照WHO标准分成5级:正常<25 dB;轻度:26~40 dB;中度:41~70 dB;重度:71~90 dB;极重度>90 dB。

1.2.3 基因检测方法 在经过中南大学湘雅医院伦理委员会批准并获得患者的知情同意后采集患者的外周血,采用荧光PCR法耳聋基因检测试剂盒(济南英盛生物技术有限公司),通过提取血液中的DNA作为模板,按照10个中国人群最常见耳聋基因突变位点(GJB2 c. 235delC、c. 299-300delAT、c. 176del6bp、c. 512insAAGG;SLC26A4 IVS7-2A > G、c. 2168A > G、c. 1229C > T、c. 1174A > T;12SrRNA A1555G、C1494T)的突变序列,设计双标记荧光的TaqMan突变序列探针,模拟天然DNA的复制,通过在ABI 7300实时荧光定量PCR仪上进行PCR扩增,与模板DNA高度特异的结合,收集荧光同时累积曲线,实时读取定性结果,判读是否存在相关基因位点的突变。阳性结果进一步采用直接测序法进行验证。

## 2 结果

### 2.1 临床资料分析

126例患者,均为中国汉族人群,临床表现为双侧对称性、重-极重度的感音神经性耳聋,除耳聋症状外,无其他系统症状的非综合征型耳聋。其中3例有氨基糖甙类药物接触史(男2例,女1例),占NSHL患者的2.3%(3/126)。听力学检查显示,听力损失程度为重度者48例,极重度者36例。此外,123例未接触氨基糖甙类药物的患者分别表现不同程度的听力损失,其中38例为极重度听力损失,53例为重度听力损失,32例为中度听力损失。

### 2.2 耳聋基因筛查结果

应用荧光PCR技术在126例NSHL患者中检测出携带基因突变的患者31例,阳性率为24.6%

(表 1)。进一步采用直接测序法验证阳性位点,其结果与荧光 PCR 法一致。

表 1 荧光 PCR 法在 126 例 NSHL 患者中的耳聋基因筛查结果 (例,%)

基因名称	基因型	遗传方式	突变形式		阳性例数	突变率
			纯合	杂合		
GJB2	c.235delC	常染色体隐性	8	1	9	7.14
SLC26A4	IVS7-2A>G	常染色体隐性	3	14	17	13.49
SLC26A4	c.2168A>G	常染色体隐性	0	1	1	0.79
12SrRNA	A1555G	线粒体遗传	3	0	3	2.38
12SrRNA	C1494T	线粒体遗传	1	0	1	0.79

本研究中,GJB2 双等位基因突变(纯合突变)是该人群最为常见的分子致病因素,其次为 SLC26A4 双等位基因突变(纯合突变)和 12SrRNA 的均质突变,它们分别占该人群分子病因的 6.35% (8/126)、2.33% (3/126) 和 3.17% (4/126)。其中,GJB2 c.235delC 和 SLC26A4 IVS7-2A>G 是最为常见的热点突变。本研究结果中 IVS7-2A>G 单等位基因突变(杂合突变)的检出率高达 11.11% (14/126),这些样本因携带复合杂合突变导致大前庭水管综合征的可能性较高,需进一步进行 SLC26A4 全序列分析以明确是否存在另一突变位点。

### 3 讨论

遗传性耳聋具有很强的遗传异质性,有常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、X-连锁遗传、Y-连锁遗传及母系遗传等多种遗传方式。其中,常染色体隐性遗传约占 80%<sup>[2]</sup>。我国常见耳聋基因突变的携带率高达 6%。在所有的耳聋致病基因中以 GJB2 突变最常见,占遗传性耳聋的 50% 左右<sup>[3]</sup>,其中 235delC 是东亚人群发生频率最高的突变,在日本、韩国和中国人群中的携带率为 1.0%~1.3%,占 GJB2 所有病理性等位基因的 80%<sup>[6]</sup>。而白种人中最常见的为 35delG,167delT 在德系犹太人中最常见<sup>[7-9]</sup>。本研究中,GJB2 235delC 纯合突变是本研究人群最为常见的分子致病因素,与以往研究结果基本一致<sup>[10-11]</sup>。我们通过对非综合征型耳聋家系进行检出率相对较高 GJB2 基因的突变检测,进一步地对携带突变的家系进行产前诊断并实施早期干预,是目前遗传性耳聋治疗手段匮乏的情况下,预防遗传性耳聋发生的最有效措施。我们的研究团队曾在我国首次确诊携带耳聋致病基因 GJB2 突变的胎儿并成功实施早期干预<sup>[12]</sup>。

SLC26A4 基因的致病率仅次于 GJB2 基因,其突变导致 5%~10% 的语前聋。SLC26A4 基因突变与大前庭水管综合征和耳蜗畸形关系密切,其中 SLC26A4 IVS7-2A>G 在中国人群最为常见,占有 SLC26A4 基因致病突变的 69.1%<sup>[4,13]</sup>。此外,中国人群中 SLC26A4 基因热点突变还包括 281C>T、589G>A、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T、2168A>G<sup>[14]</sup>。其中,2168A>G、1229C>T、1174A>T 是相对更为常见的突变类型。因此,选择突变等位基因频率较高的四种突变类型进行筛查,可节约筛查成本,从而提高筛查效率。本研究结果中 IVS7-2A>G 单等位基因突变的检出率高达 11.11% (14/126),SLC26A4 基因突变的遗传方式为常染色体隐性遗传,这些有耳聋症状的样本因携带复合杂合突变导致大前庭水管综合征的可能性较高,需进一步进行 SLC26A4 全序列分析以明确是否存在另一突变位点。但也有可能该样本仅为 IVS7-2A>G 携带者,此位点与该样本的发病无关。了解 SLC26A4 基因突变情况后,在进一步的结果分析和遗传咨询中,不仅能对患者进行婚育指导,还可对已孕或有生育需求的确证者或携带者进行产前诊断:①若确定患者携带有另一突变位点,则可建议患者父母进行相应位点的检测以确定是否携带突变位点,并在再生育前约怀孕 10 周时行产前诊断,以指导生育健康儿;②可建议患者婚育前,本人的配偶进行相应位点检测,从而预防其生育耳聋后代;③患者的同胞有 50% 的几率携带有致病突变,亲属携带此突变的可能性很大,建议在生育前行耳聋基因诊断检查。

对中国语前聋人群的研究发现,除了最为常见的 GJB2 基因和 SLC26A4 基因,线粒体基因(mtDNA 12SrRNA)突变所致的耳聋亦较常见,约占语前聋的 5%,且绝大部分系 1555A>G<sup>[5]</sup>。2004 年,有研究明确 mtDNA 1494CT 突变为另一导致耳聋的线粒体基因突变类型<sup>[15]</sup>。人类线粒体基因中 1555A>G 突变和 1494C>T 突变会在 12S rRNA 的高度保守的 A 位形成新的 1494C-G1555 或 1494U-A1555 碱基对,这些改变使得 12S rRNA 在二级结构上与细菌的 16SrRNA 的相应区域的二级结构更加相似,如果用药本人携带这种基因突变,可能就会导致药物识别错误,“攻击”健康的耳内细胞,进而致使耳内细胞的蛋白质合成异常,突变携带者在接触氨基糖甙类药物后便出现了听力损失的情况<sup>[16]</sup>。本研

究中的3例1555A>G突变携带者均有氨基糖甙类药物接触史,表明该耳聋患者对耳毒性药物如氨基糖甙类抗生素等高度敏感而使听觉细胞功能障碍引起耳聋<sup>[17]</sup>。值得注意的是,1555A>G突变除可通过促进氨基糖甙类抗生素与12SrRNA结合而致聋外,也可单独引起感音神经性耳聋,其耳聋表型还受核基因背景和单体型等因素的影响<sup>[18]</sup>。

耳聋高发致病基因及突变热点存在种族和人群差异<sup>[6]</sup>。因此,在实施遗传性耳聋的整体预防和诊治时,应充分考虑高发致病基因及突变热点在种族和人群中的差异,采用高效、可靠并符合中国人群的耳聋遗传特征的检测技术。现有遗传性耳聋的基因检测方法包括:直接测序法、PCR-RFLP、基因芯片、飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)、荧光PCR、导流杂交法等。直接测序法目前仍是基因诊断的金标准,其得出的结果直观、准确可靠,既可发现已知突变,也可发现未知突变,但其通量低,成本较高,不适用于临床推广;PCR-RFLP可以明确地确定突变的有无和位置,但需在突变位点处存在酶切位点或能够引入某种酶切位点;质谱分析分辨率低。上述方法还存在检测周期较长,实验操作繁琐等问题,不适于大规模筛查。近年来,随着基因组学、生物信息学等的快速发展,基因芯片技术和基于二代测序大规模平行测序也已应用于耳聋已知基因的大规模检测,并且已经得到大量热点突变数据,这些数据及成果对我们最终完成明确诊断有重要意义<sup>[19-20]</sup>。但这些大规模筛查针对性不强且目标不明确,会造成非特异性表型致病位点的冗余筛查,从而无形中增加成本浪费,同时其高昂的价格也极大地限制了其在临床上的推广。

上述传统方法繁琐的检测手段和高昂的费用不利于大规模应用于临床开展检测工作,而遗传性耳聋具有很高的遗传异质性,涉及到多个基因的检测,也给其临床应用带来极大困难,因此,建立一种高效、可靠、低成本、检测周期短、具有完全知识产权的且能应用于临床大规模筛查的检测技术,根据先证者的临床表现和相关的文献报道首先针对符合中国人群的耳聋遗传特征的已知致病基因或高频突变热点进行检测,再依次对其他基因进行检测,无疑将大大简化检测手段,减轻患者的经济负担。本研究采用的荧光PCR法耳聋基因检测耗时短,成本低,检测基因位点选择灵活,可实施个性化的检测方案,适合中国人群常见耳聋热点突变的初筛。在“小范围”的热点突变检测没有找到致病突变时,再进一

步进行大规模平行测序乃至全基因组检测,从而由基因热点筛查逐步达到明确基因诊断的目的。同时,检测结果判断需要遵循遗传学法则,结合家系和相关基因功能研究才能最终完成基因诊断。

#### 参考文献:

- [1] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(20):2151-2164.
- [2] Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4):758-764.
- [3] Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review[J]. *Genet Med*, 2002, 4(4):258-274.
- [4] 戴朴,韩东一,冯勃,等.大前庭水管的基因诊断和基因突变分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅颈外科*, 2006, 13(5):303-307.
- [5] 刘新,戴朴,黄德亮,等.线粒体突变大规模筛查及其预防意义探讨[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(19):1318-1322.
- [6] 刘学忠,欧阳小梅, Denise Yan,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.
- [7] Liu Y, Ke X, Qi Y, et al. Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population[J]. *J Hum Genet*, 2002, 47(12):688-690.
- [8] Kudo T, Ikeda K, Kure S, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 90(2):141-145.
- [9] Yan D, Park HJ, Ouyang XM, et al. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians [J]. *Human Genetics*, 2003, 114(1):44-50.
- [10] 陈红胜,梅凌云,贺楚峰,等.湖南地区汉族非综合征型耳聋相关基因检测及热点突变分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅颈外科杂志*, 2013, 19(6):475-480.
- [11] 马静,林昱,毛志勇,等.中国云南地区非综合征型感音神经性耳聋GJB2和GJB3基因突变分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅颈外科杂志*, 2015, 21(2):99-103.
- [12] 贺楚峰,冯永,夏昆,等.CX26基因在非综合征型耳聋中的产前诊断及早期干预[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2006, 20(13):579-581.
- [13] Hu H, Wu L, Feng Y, et al. Molecular analysis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct in the mainland Chinese: a unique SLC26A4 mutation spectrum [J]. *J Hum Genet*, 2007, 52(6):492-497.
- [14] 袁永一,王国建,黄德亮,等.大前庭水管相关基因热点突变区域筛查方案探讨[J]. *Chinese Journal of Otolaryngology*, 2010, 9(3):292-295.
- [15] Zhao H, Li R, Wang Q, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1):138-152.

(下转第352页)