

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202222085

· 论著 ·

一个常染色体隐性遗传性耳聋家系中 *MYO7A* 基因的突变与遗传分析

李萌¹, 孙金仓¹, 刘敏¹, 文卫平^{1,2}

(1. 中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科 中山大学耳鼻咽喉科研究所, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第六医院耳鼻咽喉科, 广东 广州 510655)

摘要: **目的** 对一个常染色体隐性遗传的先天性耳聋核心家系进行遗传学分析, 探究该家系的致病基因。**方法** 对该耳聋家系成员进行病史采集、体格检查及听力学检查, 分析家系的遗传特征并绘制家系图, 通过高通量测序对先证者进行耳聋基因筛查, 使用 Sanger 测序在家系中对可疑致病位点进行共分离分析。**结果** 该家系 2 代 4 人, 1 例耳聋患者, 为常染色体隐性遗传; 高通量测序发现先证者 *MYO7A* 基因存在 NM_000260.3:c.765C>A (p.F255L) 和 c.275_278dupACCT (p.I94fs) 两个新的突变位点, 依据 ACMG 变异分类指南判定为可疑致病性和致病性变异; 经 Sanger 测序验证 c.765C>A 突变来自父亲, c.275_278dupACCT 突变来自于母亲, 姐姐携带 c.765C>A 突变, 变异在家系中与表型共分离。**结论** *MYO7A* 基因新的复合杂合突变 c.765C>A 和 c.275_278dupACCT 与上述常染色体隐性遗传性耳聋密切相关, 丰富了 *MYO7A* 基因突变谱, 为遗传性耳聋的遗传咨询提供依据。

关键词: 遗传性耳聋; 高通量测序; *MYO7A* 基因; 突变分析

中图分类号: R764.43

Mutation and genetic analysis of *MYO7A* in a family with autosomal recessive hearing loss

LI Meng¹, SUNJIN Cangjian¹, LIU Min¹, WEN Weiping^{1,2}

(1. Department of Otolaryngology, Otorhinolaryngology Institute, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Otolaryngology, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: **Objective** To analyze the causative mutation of a nuclear family with autosomal recessive congenital hearing loss. **Methods** Medical history collection, detailed physical examination and hearing test were performed on the family members. High throughput sequencing was conducted for screening of hearing loss genes. Suspected mutations were analyzed by Sanger sequencing. **Results** There were 4 people of 2 generations in this family, one member with hearing loss. High throughput sequencing and Sanger sequencing revealed the proband carrying compound heterozygous mutation of *MYO7A*, NM_000260.3:c.765C>A (p.F255L) from her father and c.275_278dupACCT (p.I94fs) from her mother, and her sister carried the c.765C>A mutation. According to the standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, c.765C>A was classified as likely pathogenic and c.275_278dupACCT classified as pathogenic. **Conclusion** Novel compound heterozygous mutation of *MYO7A* is identified as the causative mutation for congenital hearing loss in this family, which enriches the mutation spectrum of *MYO7A* and provides a basis for genetic counseling of hereditary hearing loss.

Keywords: Hereditary hearing loss; High throughput sequencing; *MYO7A* gene; Mutation analysis

基金项目: 中国博士后科学基金第 68 批面上资助二等 (2020M683099)。

第一作者简介: 李萌, 女, 博士, 主治医师。

通信作者: 文卫平, Email: wenwp@mail.sysu.edu.cn; 刘敏, Email: entliumin@126.com

耳聋是最常见的感觉功能障碍性疾病之一,新生儿中的发病率约 1‰~3‰。耳聋病因复杂,约 60% 与遗传因素相关^[1]。遗传性耳聋是一种高度异质性的疾病,根据是否伴有其他系统疾病可分为综合征型耳聋(30%)和非综合征型耳聋(70%)。非综合征型耳聋更为常见,其中 75%~80% 表现为常染色体隐性遗传,多表现为先天性极重度感音神经性聋^[2]。MYO7A 基因位于染色体 11q13.5,编码由 2 215 个氨基酸构成的非常规肌球蛋白 VIIA,广泛表达在视网膜上皮和内耳毛细胞静纤毛束中^[3]。MYO7A 基因变异所致耳聋表型具有高度的异质性,既可导致超过 50% 的 1 型 Usher 综合征型耳聋^[4],也可导致常染色体显性遗传性耳聋 11 型(deafness, autosomal dominant 11, DFNA11)^[5]和常染色体隐性遗传性耳聋 2 型(deafness, autosomal recessive 2, DFNB2)^[6]。

MYO7A 基因自 1996 年报道至今,已被证实有 500 多个突变位点与遗传性耳聋相关^[7]。本研究通过高通量测序对一个先天性耳聋家系进行基因型与表型分析,发现该家系的可能致聋突变为 MYO7A 未曾报道的复合杂合突变 NM_000260.3:c.765C>A(p.F255L)和 c.275_278dupACCT(p.I94fs),两个突变位点均为首次报道的 MYO7A 新的变异位点,丰富了 MYO7A 基因的变异谱,现总结报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为一个常染色体隐性遗传的核心家系,包括 2 代 4 人,3 名正常人,1 例耳聋患者(家系先证者 II-2)。先证者为 1 岁 11 月女童,因发现对声音反应差 1 年余,就诊于中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科门诊,经详细听力学检查确诊为双耳极重度感音神经性聋,并行耳聋基因检测。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料采集 本次研究获得中山大学附属第一医院医学研究伦理委员会的批准,家系成员均签署知情同意书,未成年成员由家长代为签署。由我科 2 名副主任以上医师对家系成员进行了详尽的病史采集和全身体格检查,并填写了耳聋信息调查表,排除药物、噪声及其它因素造成的耳聋,对先证者父母及姐姐(6 岁女童)进行了纯音听阈和声导抗测试,对先证者进行了声导抗、畸变产物耳声发射(distortion product otoacoustic emission, DPOAE),听性

脑干反应(auditory brainstem response, ABR),多频稳态(auditory steady-state response, ASSR)及颞骨高分辨 CT 以及中内耳 MRI 检查。采集家系成员外周血 5 mL 用以提取外周血 DNA 并进行高通量测序。

1.2.2 高通量测序及生物信息学分析 高通量测序由广州金域医学检验中心完成,对遗传性耳聋 518 个相关基因的全部外显子及剪接区进行靶向捕获测序。将家系先证者 II-2 基因组 DNA 片段化(180-280bp),制备 DNA 文库,通过基因芯片对目标基因外显子及邻近剪接区 DNA 进行捕获和富集,使用 Illumina HiSeq 平台进行高通量、高深度测序(平均测序深度 200×)。

对原始测序数据进行测序数据的质量评估,将符合标准的测序数据比对到参考基因组(GRCh37/hg19)上,检测样本的变异信息,并对变异数据进行统计和注释。通过基因组分析工具包(genome analysis toolkit, GATK)来检测分析单核苷酸变异(single-nucleotide variants, SNV)和 InDel 变异,使用 CNVnator v0.2.2 软件分析发现拷贝数变异(copy number variants, CNVs),利用 ANNOVAR 软件对变异信息进行注释,包含 dbSNP 数据库、1 000 g 数据库、国家心肺和血液研究所外显子组测序计划(NHLBI-ESP project, esp6500si_all 数据库)、外显子组聚集联盟(Exome aggregation consortium, ExAC)和其他已有的数据库的注释信息(clinvar, HGMD 等),注释内容涵盖变异的位置信息,类型,保守性预测等。过滤已报道的单核苷酸多肽性(single nucleotide polymorphism, SNP),同义变异(文献报道的致病变异除外),以及正常人数据库中频率 >0.01 的变异(GJB2 和 SLC26A4 除外)。

1.2.3 Sanger 测序验证 使用 UCSC 在线数据库(<https://genome.ucsc.edu/>)查询变异位点附近的参考序列并以此为 DNA 模板,使用 Primer3 在线引物设计软件(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计 PCR 引物,扩增包含变异位点的 DNA 片段,并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 产物的丰度和特异性,将符合测序标准的 PCR 产物进行 Sanger 测序,验证变异位点,并在家系内进行基因型与表型分析。

2 结果

2.1 家系遗传特征及临床表型分析

该家系为一个两代常染色体隐性遗传核心小家

系(图1),未诉家族耳聋病史,包含1例耳聋患儿(Ⅱ-2),1名具有正常听力表型的子代(Ⅱ-1)和双亲(Ⅰ-1、Ⅰ-2)。Ⅱ-2出生时听力筛查结果不详,家长未诉眼科相关异常,体格检查及生长发育未见明显异常,无特殊用药史、外伤及噪音暴露史,视力、视野及眼底检查不能配合。声导抗示双耳A型曲线, DPOAE 双耳各频率未引出, ABR 及 ASSR 示双耳极重度感音神经性聋。乳突 HRCT 及中内耳 MRI 未见明显异常。Ⅰ-1、Ⅰ-2、Ⅱ-1 体格检查及眼科检查(视力、视野、眼底)均未见明显异常,声导抗均为A型曲线,纯音听阈测试听力正常。

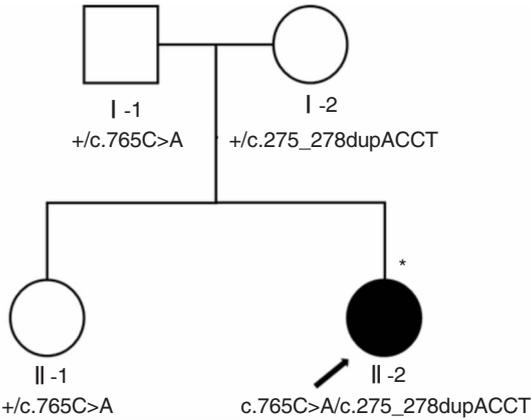


图1 家系图 黑色箭头标注成员为家系先证者; * 标注成员进行高通量测序

2.2 基因变异检测

高通量测序发现先证者 *MYO7A* 基因存在 NM_000260.3: c.765C > A (p. F255L) 和 c.275_278dupACCT (p. 194fs) 2 个候选致病变异。经 Sanger 测序验证示 c.765C > A 突变遗传自父亲, c.275_278dupACCT 遗传自母亲, 先证者姐姐为 c.765C > A 杂合携带, 在家系中耳聋表型与 *MYO7A* 基因型共分离(图1、2)。

2.3 *MYO7A* 基因变异致病性分析

c.275_278dupACCT 为移码突变, 在 HGMD、esp6500si_all、1 000g 数据库、gnomAD_all、ExAC_all、dbSNP 数据库中均未见收录 (PM2), 导致翻译蛋白氨基酸序列自 94 位开始移码并提前终止(图3、4), 该变异预计会导致所编码的蛋白发生截短而失去正常功能 (PM4), 依据 ACMG 变异分类指南^[8,9], 该变异为致病性变异 (PM2 + PM4)。

c.765C > A 为错义突变, 仅在 dbSNP 数据库中收录 (rs782702948), 为超稀有变异 (PM2); 多个变异有害性预测软件 [SIFT、PolyPhen2、Provean、LRT and

CADD (the combined annotation dependent depletion)] 预测均为有害或致病性 (PP3) (图4); 该变异位于明确缺少良性变异的功能结构域中, 位于变异热点区域 (PM1) (图3); 经分析该家系成员的基因检测结果与临床表型符合基因型 - 表型共分离 PP1-S (PS), 根据美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 变异分类指南综合分析, c.765C > A 可判为可能致病性变异 [PM1 + PM2 + PP1-S (PS) + PP3]。

3 讨论

MYO7A 具有高度的遗传异质性和基因多效性。*MYO7A* 基因突变既可导致非综合征型耳聋 (DFNA11 和 DFNB2), 也可引起同时伴有内耳和视网膜病变的综合征型耳聋 (Usher 综合征 1 型)。DFNA11 的主要临床表现为迟发性、渐进性语后聋; DFNB2 常表现为重度或极重度的语前或语后聋; Usher 综合征 1 型为常染色体隐性遗传, 主要临床表现为先天性重度或极重度感音神经性聋, 早发性视网膜色素变性, 还常合并前庭功能异常^[7]。本次研究的核心家系, 双亲和姐姐表型正常, 无听力和视觉障碍, 无头晕、耳鸣主诉, 先证者为 1 岁 11 个月女童, 双耳极重度感音神经性聋, 言语发育差, 视力、视野及眼底等眼科检查因患儿年幼不能配合而尚不明确, 该家系为常染色体隐性遗传方式, 尚不能排除 Usher 综合征型耳聋。

MYO7A 基因位于染色体 11q13.5 (图3), 于 1995 年由 Wei 等首次报道, 包含 49 个外显子, 编码 2 215 个氨基酸组成的蛋白 Myosin VIIA, 属于肌球蛋白家族成员, Myosin VIIA 为马达蛋白, 具有 ATP 酶活性, 能够利用水解 ATP 产生的能量与肌动蛋白结合, 并沿着肌动蛋白丝运动^[10]。Myosin VIIA 蛋白结构包含 3 个重要区域 (图3): ①氨基末端的马达区域, 主要功能是水解 ATP 并产生动能, 与肌动蛋白结合, 是肌球蛋白的核心功能区域; ②颈部的调节区, 与肌球蛋白轻链结合形成异亮氨酸 - 谷氨酰胺基序; ③尾端的羧基末端, 主要作用为调节 *MYO7A* 运动, 包括 SH3 结构域、2 个 FERM 结构域和 2 个 MyTH4 结构域^[11]。Myosin VIIA 蛋白在内耳和视网膜均表达, 内耳中主要分布在毛细胞静纤毛、细胞体和表皮板, 对维持毛细胞机械电转换通道的紧张度必不可少, 还影响毛细胞静纤毛的形态和功能^[12], 因此, 蛋白功能的改变将导致不同程度的听觉及前庭功能障碍^[13]。目前已报道 500 余个 *MYO7A* 致聋

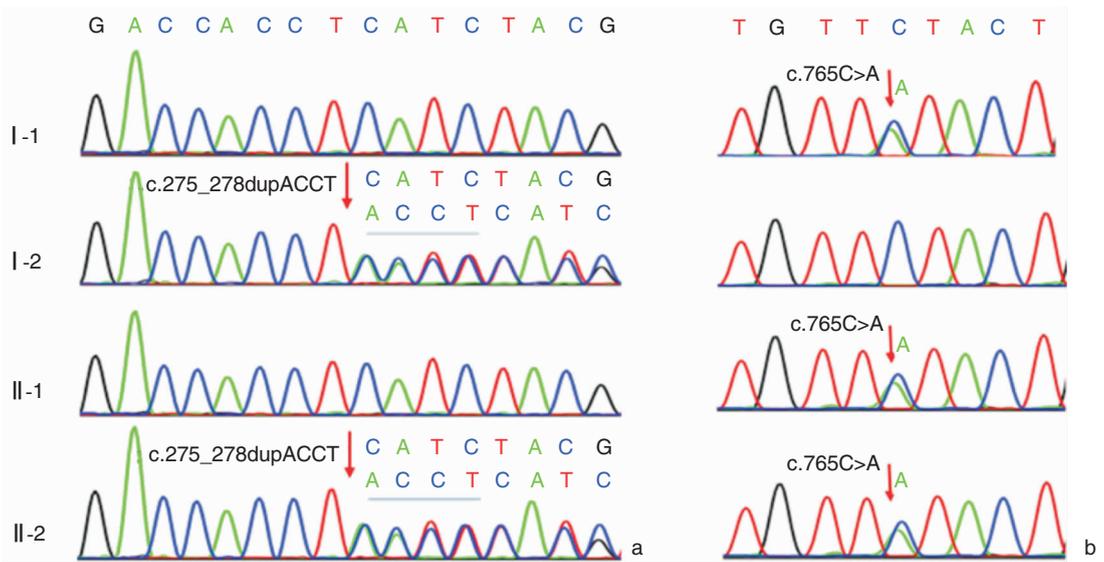


图2 *MYO7A* c. 275_278dupACCT (a) 和 c. 765C > A (b) 在家系成员中的 Sanger 测序图

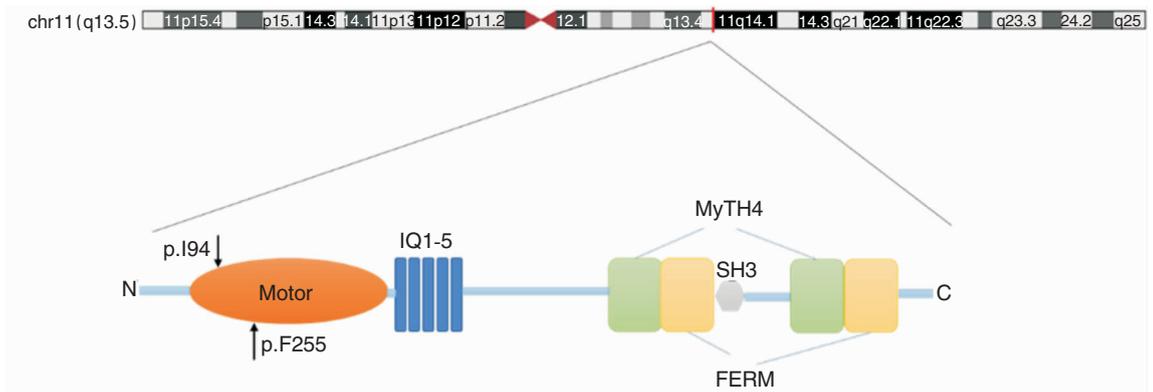


图3 *MYO7A* 基因结构及 p. I94 和 p. F255 两个突变在 Myosin VII A 蛋白结构示意图中的位置

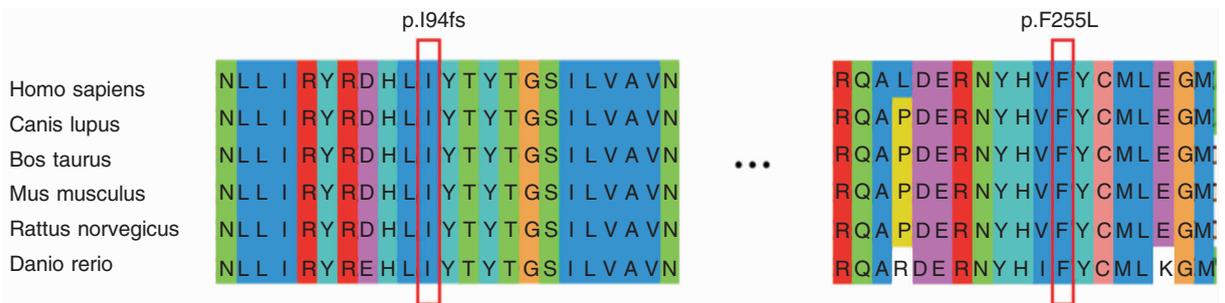


图4 多个物种间 *MYO7A* 基因突变位点氨基酸序列保守性分析

突变,类型涉及错义突变、无义突变、小片段插入/缺失、移码变异以及剪接变异等^[14],分布于蛋白的不同结构域并对蛋白功能产生不同程度影响^[15],是 *MYO7A* 基因突变导致耳聋遗传异质性的分子基础^[16]。

本研究通过对先证者行高通量测序,靶向 518 个耳聋相关基因的全部外显子及剪接区发现先

证者的 *MYO7A* 基因存在 NM_000260.3:c.765C>A (p.F255L) 和 c.275_278dupACCT (p.I94fs) 两个突变位点。通过 Sanger 测序在家系中进行基因型分析,发现先证者为 c.765C>A 和 c.275_278dupACCT 复合杂合突变,突变分别来自父亲和母亲,姐姐携带 c.765C>A 突变,变异在家系中与表型共分离(图 1、2)。c.275_278dupACCT 为移码

突变,未在人群及相关临床病例中报道过,导致编码氨基酸序列自94位开始移码并提前终止,预计会使Myosin VII A 蛋白出现截短而失去正常功能,依据ACMG变异分类指南,该变异为致病性变异(PM2 + PM4)。c.765C > A 为错义突变,也未在人群及相关临床病例中报道过,变异位于蛋白的马达区域(图3),序列在多个物种中高度保守(图4),为该基因的变异热点区域,多个变异有害性预测软件预测变异会影响蛋白功能,并在家系中与表型共分离,根据ACMG变异分类指南综合分析,c.765C > A 可判为可能致病性变异(PM1 + PM2 + PP1-S(PS) + PP3)。综合以上高通量测序、变异致病性分析以及基因型-表型验证,c.765C > A 和 c.275_278dupACCT 可能是MYO7A 基因的新致病位点,目前在国内外文献中尚未报道。本次研究丰富了我国遗传性耳聋的基因变异谱,为遗传性耳聋的诊断、产前咨询提供了新的参考。

该患儿为极重度感音神经性聋,言语发育差,乳突HRCT及中内耳MRI未见明显异常,在我院已行右侧人工耳蜗植入术,术中监测示右耳神经反应遥测技术反应好,术后患儿正常开机,并按计划进行听力及言语康复中。因此,建议对此型基因变异患儿尽早行人工听觉干预,以促进听力及言语康复。现患儿年幼无法配合眼底及视野检查,眼部情况尚不明确,不能排除Usher综合征,建议对该患儿的视力、视野及眼底情况进行动态监测,并及时干预保护患儿视力。遗传性耳聋致病基因检测和诊断技术的发展,不仅能够从基因型的角度预测临床表型,指导临床诊治;而且能够对遗传性耳聋家庭提供遗传咨询、产前诊断及出生干预,有效避免再次生育耳聋患儿,对遗传性耳聋的三级预防具有重要指导意义。

参考文献:

- [1] Croll PH, Vinke EJ, Armstrong NM, et al. Hearing loss and cognitive decline in the general population: a prospective cohort study [J]. *J Neurol*, 2021,268(3):860-871.
- [2] 冯永,刘亚兰.从遗传性聋基因筛查到基因诊断——我们的路还有多远[J].*中国耳鼻咽喉头颈外科*,2015,22(2):55-56.
- [3] Weil D, Levy G, Sahly I, et al. Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996,93(8):3232-3237.
- [4] Weil D, Küssel P, Blanchard S, et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene[J]. *Nat Genet*, 1997,16(2):191-193.
- [5] Li L, Yuan H, Wang H, et al. Identification of a MYO7A mutation in a large Chinese DFNA11 family and genotype-phenotype review for DFNA11 [J]. *Acta Otolaryngol*, 2018,138(5):463-470.
- [6] Riazuddin S, Nazli S, Ahmed ZM, et al. Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function[J]. *Hum Mutat*, 2008,29(4):502-511.
- [7] Jouret G, Poirsier C, Spodenkiewicz M, et al. Genetics of usher syndrome: New insights from a meta-analysis[J]. *Otol Neurotol*, 2019,40(1):121-129.
- [8] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. *Genet Med*, 2015,17(5):405-424.
- [9] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen) [J]. *Genet Med*, 2020,22(2):245-257.
- [10] Gibson F, Walsh J, Mburu P, et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1 [J]. *Nature*, 1995,374(6517):62-64.
- [11] Li S, Mecca A, Kim J, et al. Myosin-VIIa is expressed in multiple isoforms and essential for tensioning the hair cell mechanotransduction complex[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):2066.
- [12] 孙艺,袁慧军,王荣光. MYO7A 基因突变与遗传性耳聋[J]. *中华耳科学杂志*, 2010,8(1):63-67.
- [13] Mathur PD, Yang J. Usher syndrome and non-syndromic deafness: Functions of different whirlin isoforms in the cochlea, vestibular organs, and retina[J]. *Hear Res*, 2019,375:14-24.
- [14] Su MC, Yang JJ, Su CC, et al. Identification of novel variants in the Myosin VIIA gene of patients with nonsyndromic hearing loss from Taiwan [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009,73(6):811-815.
- [15] Mansard L, Baux D, Vache C, et al. The study of a 231 French patient cohort significantly extends the mutational spectrum of the two major usher genes MYO7A and USH2A [J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(24):13294.
- [16] 刘嘉,丁艳,胡亚.一个非综合征性遗传性耳聋家系中 MYO7A 基因的突变分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2022,36(1):27-31.

(收稿日期:2022-03-16;网络首发:2022-05-14)

本文引用格式:李萌,孙金仓健,刘敏,等.一个常染色体隐性遗传性耳聋家系中MYO7A基因的突变与遗传分析[J].*中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2022,28(3):36-40. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202222085

Cite this article as:LI Meng, SUNJIN Cangjian, LIU Min, et al. Mutation and genetic analysis of MYO7A in a family with autosomal recessive hearing loss [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022, 28(3):36-40. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202222085