

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

陈红胜¹,梅凌云¹,贺楚峰¹,陆小净¹,崔相凝¹,张 华²,蒋 璐¹,冯 永¹

(1. 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;2. 新疆医科大学第一附属医院 耳鼻咽喉科,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘 要: **目的** 研究湖南地区汉族非综合征型耳聋 (NSHL) 患者中 GJB2、SLC26A4 基因的突变频率和突变热点,了解线粒体 DNA (mtDNA) 12SrRNA A1555G 突变的频率。**方法** 收集湖南地区汉族 NSHL 患者共 139 例,抽取外周静脉血并提取 DNA;分别采用直接测序、变性高效液相色谱法 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 和聚合酶链-限制性片段变态 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术对患者进行 GJB2、SLC26A4 基因和 mtDNA 12SrRNA A1555G 突变的检测;对 SLC26A4 基因突变者进行回访并行高分辨颞骨 CT 检查。**结果** 61 例 (43.9%) NSHL 患者至少携带一种常见耳聋相关基因突变, GJB2、SLC26A4 和线粒体 DNA 12SrRNA A1555G 突变的检出率分别为 23%、18.7% 和 3.6%;共发现 6 种 GJB2 和 13 种 SLC26A4 基因已报道致病性突变,235delC 和 IVS7-2A>G 分别是 GJB2 和 SLC26A4 基因最常见的突变类型,分别占这两个基因突变等位基因的 87.5% 和 46.5%;与 SLC26A4 基因突变有关的 EVAS 的发生率为 14.4%,低于该地区 GJB2 基因相关性耳聋的发生率 17.3%。**结论** 湖南地区汉族 NSHL 中 43.9% 的患者携带常见耳聋基因突变,反映湖南地区遗传性耳聋高发的现象。GJB2 基因突变是该地区 NSHL 最常见的原因,其次为 SLC26A4 基因。235delC、IVS7-2A>G 和 A1555G 突变分别是 GJB2、SLC26A4 和线粒体 DNA 基因的热点突变,占有所有突变的 71.2%。通过筛查,为其中 35.3% 的患者明确了分子病因。为该地区进一步开展遗传咨询、基因诊断和产前诊断提供了重要的依据,并为临床用药提供指导。

关 键 词: 非综合征型耳聋;基因突变;前庭水管;线粒体 DNA
中图分类号: R764.43; Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)06-0475-06

Common deafness genes detection and hot mutation spots analysis in Han people with congenital non-syndromic hearing loss in Hunan province

CHEN Hong-sheng, MEI Ling-yun, HE Chu-feng, et al.
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Key Laboratory of ENT major disease research in Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence and hot spots of GJB2 and SLC26A4 genes mutations and to estimate the incidence of the mitochondrial 12S ribosomal RNA A1555G mutation in Han people with non-syndromic hearing loss (NSHL) in Hunan province. **Methods** The study included 139 subjects in Hunan area (80 males, 59 females, a mean age of 7.6). The genomic DNA samples were extracted from peripheral blood. Screenings of GJB2, SLC26A4 gene mutations and mtDNA 12SrRNA A1555G were carried out by direct sequence, DHPLC and PCR-RFLP respectively. All individuals found with SLC26A4 mutation were given temporal bone CT scan. **Results** The study showed 43.9% of the patients carried at least one of the common deafness gene

基金项目:国家自然科学基金(81170923,81260160);省科技计划项目院士基金(2013FJ4110)。
作者简介:陈红胜,女,博士,主管技师。
通讯作者:冯 永,E-mail:fyong@xysm.net

mutations. The detection rates of GJB2, SLC26A4 gene mutations and mtDNA A1555G were 23%, 18.7% and 3.6% respectively. 6 GJB2 and 13 SLC26A4 gene mutations were identified. 87.5% of GJB2 mutant alleles was 235delC and 46.5% of SLC26A4 was IVS7-2A>G, which implied 235delC and IVS7-2A>G were the most common mutations in these two genes. The incidence of enlarged vestibular aqueduct syndrome EVAS related to SLC26A4 mutation was 14.4%, which was lower than that of deafness related to GJB2 (17.3%). **Conclusion** 43.9% of the patients with NSHL carry the common deafness gene mutations, which indicates high incidence of hereditary deafness in Han people of Hunan province. GJB2 gene mutation is the most common cause of NSHL, SLC26A4 is another common gene causing deafness in this area. 235delC, IVS7-2A>G and A1555G are the hot spots in GJB2, SLC26A4 and mtDNA gene mutations respectively, accounting for 71.2% of all three gene mutations. The molecular etiology in 35.3% of the patients with NSHL has been made clear through this study, which provides important data for further steps in genetic counseling, gene diagnosis and prenatal diagnosis, and also instructions for clinical medication.

Key words: Non-syndromic hearing loss; Gene mutation; Vestibular aqueduct; Mitochondrial DNA.

耳聋是最常见的感觉障碍性疾病之一,新生儿重度听力障碍者占 1‰~3‰,其中约 50% 属于遗传性耳聋。而约 70% 的遗传性聋为非综合征型耳聋(nonsyndromic hearing loss, NSHL)。目前研究显示,GJB2 基因和 SLC26A4 基因突变是导致常染色体隐性遗传性非综合征型耳聋的主要原因,而且在不同地域、不同种族的 NSHL 人群中,GJB2、SLC26A4 基因具有不同的突变频率和突变类型。此外,线粒体 DNA12SrRNA 基因 A1555G 突变与氨基糖甙类抗生素导致的耳聋有密切关系,也是导致非综合征型耳聋的重要原因。国内学者戴朴等^[1]已在全国绝大部分省市对非综合征型耳聋患者进行了常见耳聋基因 GJB2 基因 235delC, SLC26A4 基因 IVS7-2A>G 和线粒体 DNA A1555G 热点突变的分子流行病学调查,但尚未在湖南地区同时对该 3 个突变进行检测分析。

因此,本研究收集湖南地区聋哑学校非综合征型耳聋患者 139 例,针对遗传性耳聋基因 GJB2、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 的分子结构特点,拟采用 3 种不同的检测方法,分析湖南地区汉族非综合征型耳聋患者中 GJB2 和 SLC26A4 基因的突变频率和突变热点,了解 mtDNA 12SrRNA A1555G 突变的频率。临床期望通过耳聋相关基因的突变分析能够进一步推动聋病遗传咨询、基因诊断和产前诊断的开展,指导临床用药,为该地区聋病的早期诊断、早期治疗和早期干预发挥积极的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

笔者收集湖南地区 3 所聋校耳聋患者 139

例,其中男 80 例,女 59 例;年龄 3~30 岁,平均 7.6 岁;均为汉族。所有病例门诊完善声导抗、听性脑干诱发电位和耳声发射等听力学专科检查,结合病史排除感染、耳毒性药物、肿瘤、外伤所导致的听力损害和综合征型耳聋,均诊断为遗传学非综合征型耳聋。同期选取 104 例正常对照样本(来自医学遗传学国家重点实验室样本库)。所有患者及正常对照均签署知情同意书并经本院伦理委员会论证批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提 抽取耳聋患者的外周血各 5~10 ml,肝素抗凝,常规苯酚-氯仿抽提基因组 DNA。

1.2.2 直接测序法检测 GJB2 基因突变 根据 UCSC 数据库 GJB2 基因序列(NM_004004)设计引物(上海博亚生物工程公司合成)^[2],对患者的 GJB2 基因进行扩增,扩增目的片段包括编码区及其上游的 105 bp 和下游的 83 bp。PCR 反应体系为 10 μl,含基因组 DNA 30 ng, dNTP 200 μmol/L, 10×PCR Buffer(含 15 mmol/L MgCl₂), Q Buffer, HotStar Taq (Qiagen) 酶 0.05 U。PCR 反应在 2720 型基因扩增仪(ABI 公司)上进行,采用 Touchdown PCR: 95℃ 预变性 15 min; 95℃ 变性 30 s, 64℃ 复性 30 s, 每循环降 0.5℃, 72℃ 延伸 40 s, 12 个循环; 95℃ 变性 30 s, 56.5℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 22 个循环; 72℃ 充分延伸 10 min, 10℃ 保存。PCR 产物经 6% PAGE 胶检测具有较高的产量及特异性以后,用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理,处理完后的产物用 ABI 3100 自动测序仪进行测序。测序结果采用 DNASTAR 软件进行分析。

1.2.3 运用变性高效液相色谱(DHPLC)技术检测 SLC26A4 基因突变 扩增 SLC26A4 基因

的所有 21 个外显子,其中 7,8 外显子同在一个扩增子内,11、12 外显子同在一个扩增子内。共扩增 19 个片段以覆盖 SLC26A4 基因所有的外显子以及每个外显子前后的剪切区序列。扩增引物及各扩增子 DHPLC 检测温度见参考文献^[3]。PCR 反应体系为 10 μl,含基因组 DNA 30 ng, dNTP 200 μmol/L, 10 × PCR buffer (含 12.5 μmol/L MgCl₂), 5 × Q 缓冲液, Hot-Start Taq (Qiagen) 酶 0.05 U。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 35 s,59℃ 退火 40 s,每循环降 0.5℃,72℃ 延伸 60 s,16 个循环;95℃ 变性 30 s,51℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,20 个循环;72℃ 充分延伸 10 min,10℃ 保存。待检样本的 PCR 产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶检测具有较高的产量及较好的特异性以后,与经测序证实的野生型样本以 2:1 比例进行混合,95℃ 变性 5 min,然后缓慢冷却至 25℃ (每 4 s 降低 0.1℃),使之充分杂交,形成异源双链。每个扩增子均采用两个优化好的检测温度进行 DHPLC 筛查。将异常峰的样本送测序,测序结果采用 DNASTar 软件进行分析。

1.2.4 影像学检查 对检测到 SLC26A4 基因突变的患者回访,均进行耳部 HRCT 检查,以便明确是否存在前庭水管扩大或其它内耳畸形。发现内耳影像学异常的患者进一步行甲状腺功能及甲状腺 B 超检查。前庭水管扩大的 CT 诊断标准^[4]为:测量半规管总脚至前庭水管外口之间中点的最大管径宽带 > 1.5 mm。

1.2.5 聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态技术 (PCR-RFLP 法) 检测线粒体 DNA 12SrRNA A1555G 突变 应用 primer3 软件在线设计引物,正向引物序列为 5'-GGACATTTAACTA-

AAACC CCTACGC-3',反向引物序列为:5'-CTATTGCGCCAG GTTCAAT-3'。扩增包含 mtDNA 1555 位点的 262 bp 长度的目的片断,PCR 反应体系为 10 μl,含基因组 DNA 50 ng, dNTP 200 μmol/L, 10 × PCR buffer (含 12.5 μmol/L MgCl₂), Taq (Qiagen) 酶 0.05 U。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,61℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 40 s,10 个循环;94℃ 变性 40 s,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 40 s,25 个循环;72℃ 充分延伸 10 min,10℃ 保存。以 Alw 261 内切酶鉴定突变体,6% 非变性聚丙烯凝胶电泳检测可见突变体酶切后仍为 262 bp 一条带,而野生型片段则被酶切成 42 bp 和 220 bp 两条带。取相应的突变体及部分正常对照 PCR 产物纯化后用 ABIPrism 3700 测序仪直接测序,应用 DNASTar 软件判读和分析结果。

2 结果

2.1 GJB2 基因检测结果

32 例患者中检测到了 GJB2 基因突变,检出率为 23%,其中双等位基因突变 24 例 (17.3%),共发现了 10 种不同类型的碱基变异,包括 6 种已知的致病性突变和 4 种多态 (表 1)。其中 28 例携带突变 c.235delC,检出率达 20.1%,占有所有突变的 87.5%。分别在 3 例患者中检测到复合杂合突变 c.139G > T/c.235delC, c.550C > T/c.235delC 和 c.176_191del16/c.235delC。c.79G > A 和 c.341A > G 是两种最常见的多态,在患者中的等位基因频率分别为 20.2% 和 12.4%。

表 1 各类 GJB2 变异在患者中的检测情况

序号	碱基改变	氨基酸改变	突变类型	纯合	杂合	检出率 ^a	等位基因频率 ^b
1	c.571T>C	p.F191L	错义	-	1	0.7	0.36
2	c.139G>T	p.E47X	无义	-	1	0.7	0.36
3	c.176_191del16	p.G59fs	移码	-	2	1.4	0.72
4	c.550C>T	p.R184P	错义	-	1	0.7	0.36
5	c.235delC	p.L79fs	移码	21	7	20.1	17.6
6	c.344T>G	p.F115C	错义	-	2	1.4	0.72
7	c.341A>G	p.E114G	多态	5	25	21.6	12.6
8	c.79G>A	p.V27I	多态	6	45	36.7	20.5
9	c.109G>A	p.V37I	多态	7	18	18.0	11.5
10	c.608T>C	p.I203T	多态	1	13	10.1	5.4

注: ^a 检出率:携带突变的病例数/总病例数 (139); ^b 等位基因频率:该突变等位基因占有所有等位基因的比例

2.2 SLC26A4 基因突变检测结果

除 24 例 GJB2 双等位基因突变的患者外,共检测 115 例患者,其中 57 个样品检测到 DH-PLC 异常峰形。经测序分析,26 例患者携带有 SLC26A4 基因突变,检出率为 18.7%。共发现 14 种不同类型的碱基变异,包括 13 种已知突变和 1 种多态,其中 17 例为 SLC26A4 基因

纯合或复合杂合突变,9 例为 SLC26A4 杂合突变(表 2)。IVS7-2A>G 是最常见的突变类型,占有突变等位基因的 46.5%,其中 IVS7-2A>G 纯合突变 6 例,5 例携带 IVS7-2A>G 的复合杂合突变及 3 例 IVS7-2A>G 单等位基因突变;其次为 T410M,占有突变等位基因的 11.6%。

表 2 各类 SLC26A4 变异在患者中的检测情况

序号	外显子/内含子	碱基改变	氨基酸改变	突变类型	纯合	杂合	检出率 ^a	等位基因频率 ^b
1	2	c.23C>A	p.S8X	无义	—	1	0.7	0.36
2	6	c.679G>C	p.A227P	错义	—	1	0.7	0.36
3	IVS7	IVS7-2A>G	—	剪接	6	8	10.1	7.19
4	10	c.1174A>T	p.N392Y	错义	—	2	1.4	0.72
5	10	c.1229C>T	p.T410M	错义	—	5	3.5	1.80
6	10	c.1226G>C	p.R409H	错义	—	1	0.7	0.36
7	IVS10	IVS10-12T>A	—	剪接	—	3	2.1	1.08
8	15	c.1692_1693insA	p.C565fs	移码	—	1	0.7	0.36
9	16	c.1716A>T	p.F572L	错义	—	1	0.7	0.36
10	17	c.1975G>C	p.V659L	错义	—	2	1.4	0.72
11	17	c.2009T>C	p.V670A	错义	—	1	0.7	0.36
12	19	c.2162C>T	p.T721M	错义	—	1	0.7	0.36
13	19	c.2168A>G	p.H723R	错义	—	4	2.8	1.44
14	IVS11	IVS11+47T>C	—	多态	1	19	14.4	7.55

注: ^a 检出率:携带突变的病例数/总病例数(139); ^b 等位基因频率:该突变等位基因占有所有等位基因(278)的比例

2.3 影像学检查结果

26 例检测到突变的患者中回访 22 例,并进行颞骨 HRCT 检查,发现 15 例双等位基因突变者均表现为明显的双侧前庭水管扩大,7 例单等位基因突变者有 3 例双侧前庭水管扩大,4 例正常。甲状腺功能检查患者 1 例总 T3 稍偏高,2 例甲状腺 B 超显示甲状腺双侧偏大,结果经湘雅医院 B 超室和内分泌科专家会诊,无临床意义,认为正常。

2.4 mtDNA 12SrRNA A1555G 突变检测结果

5 例患者酶切后仍可见 262 bp 一条带,测序证实存在此突变,其中 2 例患者分别携带 GJB2c.235delC 杂合突变和 SLC26A4 IVS7-2A>G 杂合突变。而其余 134 例均无此突变,酶切后可见 220 bp 一条带(图 1)。

2.5 正常对照组结果

104 例听力正常者仅发现 IVS7-2A>G 和 c.235delC 单等位基因突变携带者各 1 例,未发现其他突变携带者。

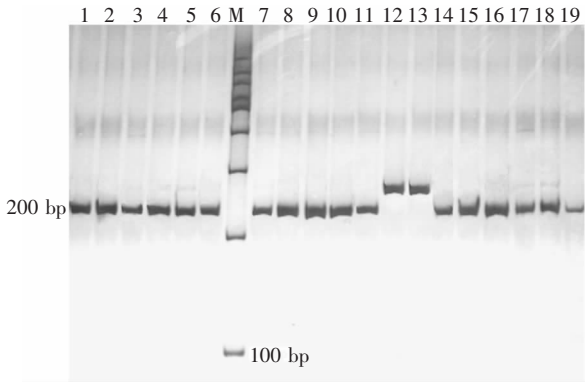


图 1 线粒体 DNA1555 位点的酶切检测图

注:泳道 12 和 13 示患者 A1555G 突变,酶切后仍可见 262 bp 一条带;M:100 bp ladder marker;其余泳道:示 104 例对照样品中 17 例病例的酶切结果,可见 220 bp 一条带。

3 讨论

目前用于检测点突变的方法很多,直接测序为检测点突变的金标准,但测序的成本较高。应用 RFLP 对已知的单碱基突变进行筛查是一种较为经济、简便的突变检测方法。而近

年来发展成熟的 DHPLC 在突变筛查方面敏感性和特异性高,据报道其检出率为 96% ~ 100%^[5],且与直接测序相比成本较低,适合多外显子基因的突变筛查。采用本研究中优化的检测条件,应用 DHPLC 对 SLC26A4 基因的 21 个外显子及其侧翼序列进行突变筛查,检测的敏感性和特异性都很高,出现异常峰形的样本经测序证实其检出率达 100%。

本研究中,我们发现 43.3% 的患者携带有常见耳聋基因突变,反映湖南地区遗传性聋高发的现象。其中, GJB2 基因突变的检出率最高,是导致湖南地区汉族 NSHL 最常见的原因。自从 1997 年发现 GJB2 基因与耳聋的关系以来,各国学者在不同种族人群中进行了大量有关 GJB2 基因的研究。目前已发现 200 多种 GJB2 基因突变位点。这些突变在不同种族人群中的发生频率和分布情况差异很大。如 35delC 在北欧及美国的高加索人种中占有 GJB2 突变的 70%^[6-7], 167delT 是犹太人群中最常见的突变^[8],而东亚人群中很少检测到这两种突变,其最常见的突变为 235delC。戴朴等^[9]对 2063 例以汉族为主的中国耳聋患者的大样本研究中发现, GJB2 基因在我国耳聋人群中总体致病突变频率约为 14.88%。本研究显示,湖南地区 GJB2 基因总体致病突变频率为 17.3% (24/139),高于 14.88% 的总体水平。其中 235delC 的检出率为 19.9%,占有所有突变等位基因的 87.5%,是 GJB2 主要的致病形式,与全国各省耳聋分子流行病学研究的数据 (18.16%)^[1]比较,湖南地区 NSHL 中 235delC 突变的检出率处于较高的水平, 235delC 是该地区 GJB2 的热点突变形式。郭玉芬等^[10]发现西北地区 NSHL 患者中除 235delC 外,较常见的突变为 299-300delAT,占有所有突变的 15.66%,而本研究中并未发现该突变, c. 176-191del16 和 344T > G 是仅次于 235delC 的突变,但突变率较低,各占有所有突变的 3.6%,进一步证实了 GJB2 基因突变具有明显的地域特异性。GJB2 基因相关性耳聋患者的螺旋神经节细胞数量正常,是人工耳蜗植入的理想候选者,较大范围的开展 GJB2 基因突变筛查对耳聋患者的治疗和预后有重要意义。

近年,对于不同人群 EVA 患者的 SLC26A4 基因筛查发现, SLC26A4 基因突变具有明显的

种族特异性,不同种族、不同地域的 EVA 患者 SLC26A4 基因突变的频率和突变热点不同。在北欧高加索人种中最常见的 2 个突变为 T416P 和 IVS8 + 1G > A^[11],日本和韩国人 SLC26A4 基因的主要突变方式为 H723R^[12-13], Wang 等^[14]对 107 例中国前庭水管扩大患者进行了 SLC26A4 基因 21 个外显子测序,发现位于第 7 外显子的 IVS7 - 2A > G 和第 19 外显子的 H723R 是中国人群的热点突变,两者在所有突变中分别占 57.63% 和 9.04%。本研究中 IVS7 - 2A > G 的检出率为 10.1%,低于全国平均水平 13.35%^[15],占有所有突变等位基因的 46.5%,为第一高发突变,证实了文献报道。其次为 T410M 和 H723R,分别占有所有突变等位基因的 11.6% 和 9.3%,未检测到高加索人种中最常见的两种 SLC26A4 基因突变,更加支持了 SLC26A4 基因突变具有种族特异性的观点。检出的 13 种致病性突变分别位于 PDS 基因的第 2, 6, 10, 15, 16, 17, 19 号外显子及第 7 和第 10 内含子上。其中突变 IVS7 - 2A > G 位于外显子 8 的侧翼序列,该区域共发现突变体 20 个,外显子 10、19、17 分别有 8、5、3 个突变体,发生在这 4 个区域的突变占有所有突变体的 83.7%,因此,该 4 个区域可能为汉族 NSHL 的 SLC26A4 基因突变的热点区域。

回访的 22 例携带 SLC26A4 基因突变的患者中,双等位基因突变者中 EVAS 的发生率为 100%,单等位基因突变者为 42.9%。根据文献报道^[16]结合本研究结果,所有携带 SLC26A4 基因纯合或复合杂合突变的患者均表现为 EVA 或内耳其他畸形,推断失访的另 2 例 IVS7 - 2A > G 纯合突变的患者亦可能为前庭水管扩大,则本研究筛查的 139 例耳聋患者中至少有 20 例为大前庭水管患者。因此,在湖南地区 NSHL 人群中,与 SLC26A4 基因突变有关的 EVAS 的发生率为 14.4% (20/139)。与该地区 GJB2 基因相关性耳聋的发病率 (17.3%) 比较,提示 SLC26A4 基因突变是仅次于 GJB2 基因的导致湖南地区汉族 NSHL 发病的重要原因。早期发现前庭水管扩大患者通过正确的指导和严格的活动限制来保存患者较好的残余听力,使得患者可以通过听力康复和语言训练或佩戴助听器来获得良好的交流能力,所以有必要进一步在本地区感音神经性耳聋患者

及相关可疑人群中进行此基因突变的筛查。

我们共检出 5 例患者携带 mtDNA12SrRNA A1555G 突变位点,该位点突变率为 3.6%,高于全国平均水平 2.86%^[1]。其中 4 例有明确的庆大霉素使用史。携带线粒体 DNA12SrRNA A1555G 点突变的个体对氨基糖甙类抗生素具有高度的敏感性,而且携带该突变的人在没有接触这类抗生素之前可能表现为正常的听力^[17-18],所以,在突变率较高的湖南地区开展 mtDNA12SrRNA A1555G 突变的筛查工作非常重要。在明确病因的同时,大大降低了家族成员发生药物性耳聋的危险性,这对于降低药物性耳聋的发病率具有深远意义。

本研究通过对常见耳聋基因 GJB2、SLC26A4 基因和 mtDNA A1555G 突变的检测,为其中 35.3% (17.3% + 14.4% + 3.6%) 的患者明确了病因。NSHL 患者来自湖南各个地区,具有一定的地区代表性,研究结果进一步丰富了我国聋病资源数据库,并对湖南地区因地制宜地开展基因诊断、遗传咨询和预防干预具有重要的指导意义。

参考文献:

[1] 戴朴,刘新,于飞,等. 18 个省市聋校学生非综合征型聋病分子流行病学研究[J]. 中华耳科学杂志, 2006,4(1):1-5.

[2] 李景之,胡艺俏,王树辉,等. 非综合征性耳聋 (NSHL) 患者 Cx26 基因突变分析及两种突变体的亚细胞定位[J]. 遗传,2009,31(7):705-712.

[3] 蒋璐,冯永,陈红胜,等. 中国湖南地区非综合征性聋患者 SLC26A4 基因突变研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2010,24(13):587-591.

[4] 孔维佳. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:519-521.

[5] Prasad S, Kolin KA, Cucci RA, et al. Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing highperformance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations[J]. Am J Med Genet A, 2004, 124A(1):1-9.

[6] Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, et al. Carrier frequency of GJB2 gene mutations c. 35delG, c. 235delC

and c. 167delT among the populations of Eurasia[J]. J Hum Genet, 2010,55(11):749-754.

[7] Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study[J]. Am J Hum Genet, 2005, 77(6):945-957.

[8] Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness[J]. N Engl J Med, 1998,339(21):1500-1505.

[9] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment[J]. J Transl Med, 2009,7: 26.

[10] 郭玉芬,刘晓雯,关静,等. 西北地区非综合征型耳聋患者 GJB2、SLC26A4 基因突变的分子流行病学研究[J]. 听力学及言语疾病杂志,2008,16(4):263-266.

[11] Campbell C, Cucci RA, Prasad S, et al. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/ SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations[J]. Hum Mutat, 2001,17(5):403-411.

[12] Ito T, Noguchi Y, Yashima T, et al. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan[J]. J Med Dent Sci, 2010, 57(1):1-10.

[13] Shin JW, Lee SC, Lee HK, et al. Genetic Screening of GJB2 and SLC26A4 in Korean Cochlear Implantees: Experience of Soree Ear Clinic[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2012,5 (Suppl 1):S10-13.

[14] Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, et al. A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China[J]. Clinical Genetics, 2007,72(3):245-254.

[15] 袁永一,黄莎莎,王国建,等. 27 个省市聋校学生基于 SLC26A4 基因 IVS7-2 A>G 突变的全序列分析[J]. 中华耳科学杂志,2011,9(1):17-23.

[16] 袁永一,戴朴,黄德亮,等. 内蒙古赤峰市聋校聋儿 SLC26A4 基因分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007,14(5):251-256.

[17] Lu J, Li Z, Zhu Y, et al. Mitochondrial 12S rRNA variants in 1642 Han Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss[J]. Mitochondrion, 2010,10(4):380-390.

[18] 杨烨,殷泽登. 线粒体 DNA 突变与氨基糖甙类抗生素致聋研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2010,16(5):398-401.

(修回日期:2013-10-21)