

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201502005

· 论著 ·

# 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

马 静, 林 垦, 毛志勇, 李正才, 赵丽萍, 张铁松

(昆明市儿童医院 昆明医科大学附属儿童医院 耳鼻咽喉头颈外科, 云南 昆明 650118)

**摘要:** **目的** 分析云南省部分地区极重度非综合征型耳聋(non-syndromic hearing loss, NSHL)患者常见耳聋基因 GJB2 和 GJB3 的突变特点, 了解其分子流行病学特征。**方法** 采集 2010 年 1 月~2013 年 12 月我院门诊散发的 118 例极重度非综合征型感音神经性耳聋患儿和 236 例双亲外周血, 提取 DNA。应用飞行质谱技术对 GJB2、GJB3 编码区域中 7 个突变位点, 包括 GJB2(35delG、167delT、176-191del16、235delC、299-300delAT)、GJB3(538C→T、547G→A)进行检测, 同时结合耳声发射、听性脑干反应测试、颞骨 CT 和头颅 MRI 检查。**结果** 118 例患儿中 22 例存在基因位点突变, 占 18.64%, 其中 235delC 纯合突变 8 例, 235delC 单杂合突变 6 例, 235delC/299-300delAT 复合杂合突变 8 例; 299-300del AT 无纯合突变。未检出 GJB3 基因突变。236 例双亲 GJB2 基因突变 38 例占 16.10%, 其中无 235delC 纯合突变, 235delC 单杂合突变父亲 10 例、母亲 20 例, 299-300del AT 单杂合突变父亲 8 例, 299-300del AT 无纯合突变, 无 235delC/299-300delAT 复合杂合突变; 未检出 GJB3 基因突变。**结论** 云南省部分地区极重度非综合征型聋患儿 GJB2 突变率及突变形式与国内大部分报道基本一致, 235delC 是其最主要的突变形式, 其次为 299-300delAT。在以家庭为单位的耳聋基因筛查中, 发现有基因突变患儿, 对应其父母至少有一方存在基因突变, 显示重要遗传特征。对于 GJB3 在云南地区的流行特征, 有待进一步扩大研究 GJB3 的样本量。

**关键词:** 非综合征型聋; GJB2 基因; GJB3 基因; 突变

中图分类号: Q786; R764.43 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)02-0099-05

## Mutation analysis of GJB2 and GJB3 genes in patients with non-syndromic sensorineural hearing loss in Yunnan Province

Ma Jing, LIN Ken, MAO Zhi-yong, LI Zheng-cai, ZHAO Li-ping, ZHANG Tie-song

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Children's Hospital of Kunming City, Children's Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650118, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze mutation features of common deafness genes GJB2 and GJB3 in patients with severe to profound non-syndromic sensorineural hearing loss in some areas of Yunnan Province. **Methods** 118 children with severe and profound non-syndromic sensorineural hearing loss sporadically identified in otological clinics and their parents ( $n=236$ ) were included in this study. Their peripheral blood specimens were collected and DNA templates were extracted. MALDI-TOF-MS technology was used for detecting the seven mutation sites in coding region of GJB2 and GJB3, including GJB2 (35delG, 167delT, 176-191del16, 235delC, 299-300delAT), and GJB3 (538C→T, 547G→A). All of them received otoacoustic emission(OAE), auditory brainstem response(ABR), temporal bone CT and MRI scan. **Results** GJB2 gene mutations were confirmed in 22 of the 118 children ( $n=22$ , 18.64%), including 235delC homozygous mutation ( $n=8$ ), 235delC single heterozygosity mutation ( $n=6$ ), 235delC/299-300delAT double heterozygosity mutation ( $n=8$ ). 299-300del AT homozygous mutation could not be detected. GJB3 mutation was not found. In the 236 parents, GJB2 gene mutations were confirmed in 38 (16.10%) including 235delC single heterozygosity mutation ( $F_n=10$ ,  $M_n=20$ ), 299-300del AT a single heterozygosity mutation ( $F_n=8$ ). GJB3 gene mutation was not detected. **Conclusions**

基金项目: 云南省科技厅和昆明医科大学联合专项(2012FB110); 云南省科技厅应用基础研究项目(2013FZ243)。

作者简介: 马 静, 男, 博士, 副主任医师。

通信作者: 张铁松, Email: tsz68420@sina.com

GJB2 mutation rate and mutant forms in children with severe and profound non-syndromic sensorineural deafness in Yunnan are consistent with most of the domestic literature reports. 235delC is the main mutant form, followed by the 299-300delAT mutation. Deafness genes screening based on family unit finds that gene mutations exist in at least one person of the spouse whose child has gene mutations.

**Key words:** Non-syndromic hearing loss; GJB2 gene; GJB3 gene; Mutation

耳聋是一类严重影响人类健康和造成人类残疾的常见疾病,根据我国2006年第2次残疾人抽样调查显示,我国听力和言语残疾患者高达2780万例,其中7岁以下聋儿高达80多万,且每年以3万聋儿的速度在增长<sup>[1]</sup>。绝大部分耳聋是由遗传因素造成的,在耳聋人群中其中70%的遗传性耳聋患者除耳聋外不伴有其他症状,这类耳聋为非综合征型耳聋(non-syndromic hearing loss, NSHL)。本文通过飞行质谱技术对国内较常见的耳聋基因GJB2、(35delG、167delT、176-191del16、235delC、299-300delAT)、GJB3(538C→T、547G→A)进行突变位点检测,了解云南省非综合征型耳聋的分子流行病学特征。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

采集2010年1月~2013年12月我院门诊散发的118例极重度非综合征型感音神经性耳聋患儿及其236例双亲外周血,所有患儿均为拟行人工耳蜗植入手术的极重度感音神经性聋患者,年龄10个月至16岁。其中男68例,女50例,男女比例1.36:1,患者来自:汉族80例、彝族9例、回族8例、傈僳族2例、纳西族6例、白族8例和基诺族5例。所有研究对象均接受全面的临床检查和听力学评估,均确诊为非综合征型极重度感音神经性耳聋。试验方案经医学伦理委员会审查同意,患儿监护人签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 临床资料的采集 通过家长填写问卷调查表和询问病史的方式掌握被检测者的病史及家族史资料,并建立详实的病历档案,其内容包括基本信息、耳聋病史、家族史、聋儿出生史、用药史、个人史等。所有患者均行耳鼻咽喉常规检查未发现先天性耳畸形,行耳声发射、听性脑干诱发电位、多频稳态、颞骨CT和头颅MRI检查,排除中耳炎和外伤等其他因素致聋。听力损失以ABR反应阈为参考,极重度标准为听阈 $\geq 90$  dB。

1.2.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(ma-

trix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术 利用样品在电场中的飞行时间与分子的质荷比成正比的原理,通过检测样品分子的飞行时间,测得分子量,推知突变位点。基本原理:用一定强度的激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,样品解吸附,基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,电离的样品在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同来加以区分检测(离子的质量电荷比与其飞行时间成正比),并可获得样品分子的相对分子质量。

1.2.3 主要仪器和试剂 美国ABI 9700 PCR仪,美国Sequenom公司的Mass ARRAY DNA质谱阵列基因分析系统、Mass ARRAY微量点样系统以及试剂盒,ABI 3730XL测序仪。

1.2.4 检测过程 所有对象均静脉采取10ml血液样本备用,应用DNA提取试剂盒提取DNA,紫外分光光度计进行定量和纯度检测。根据突变位点的位置和基因型设计扩增引物和延伸引物(扩增程序为:94℃预热5 min,然后94℃、45 s,72℃、45 s;共30个循环,最后72℃延伸5 min)。虾碱式磷酸酶消化:利用虾碱式磷酸酶对PCR产物进行处理,以去除扩增反应中剩余的dNTP。用延伸引物分别对纯化后的PCR产物进行单碱基延伸反应。用阳离子交换树脂对PCR延伸产物进行纯化,去除盐离子。针对位点设计测序引物,对样本进行直接测序及数据分析,以上实验过程在深圳华大基因公司完成。

## 2 结果

### 2.1 听力学情况

研究对象中118例拟行人工耳蜗植入的非综合征型耳聋患者均为极重度感音神经性聋,畸变产物耳声发射和瞬态耳声发射均未通过,听性脑干反应(ABR)阈值 $\geq 90$  dB。

### 2.2 患儿双亲耳聋基因检测结果

236例患儿双亲中发现父亲GJB2基因突变18例,母亲GJB2基因突变20例对应其患儿都有GJB2基因突变,父母亲均未检出纯合突变及GJB3

基因突变。检测结果发现父母均为杂合突变,并无耳聋发生,这符合常染色体隐性遗传,见表 1。

表 1 236 例双亲受检者 GJB2、GJB3 耳聋基因突变检测结果(例)

基因	检测位点	杂合突变		纯合突变		复合杂合突变		突变率(%)
		父亲	母亲	父亲	母亲	父亲	母亲	
GJB2	35delG	-	-	-	-	-	-	-
	167delT	-	-	-	-	-	-	-
	176-191del16	-	-	-	-	-	-	-
	235delC	10	20	-	-	-	-	12.71
	299-300delAT	8	-	-	-	-	-	3.39
GJB3	538C→T	-	-	-	-	-	-	-
	547G→A	-	-	-	-	-	-	-

### 2.3 患儿耳聋基因检测结果

118 例患儿中,22 例存在被检测基因位点突变,占 18.64%。其中 235del C 纯合突变 8 例,均为汉族;235delC 单杂合突变 6 例,其中纳西族、基诺族和

汉族各 2 例;235del C/299-300delAT 复合杂合突变 8 例,均为汉族;未检出 299-300del 纯合突变和 GJB3 基因突变,见表 2。

表 2 118 例患儿 GJB2、GJB3 耳聋基因突变检测结果(例)

基因	检测位点	杂合突变		纯合突变		复合杂合突变		突变率(%)
		男	女	男	女	男	女	
GJB2	35delG	-	-	-	-	-	-	-
	167delT	-	-	-	-	-	-	-
	176-191del16	-	-	-	-	-	-	-
	235delC	6	-	8	-	4	4	18.64
	299-300delAT	-	-	-	-	-	-	-
GJB3	538C→T	-	-	-	-	-	-	-
	547G→A	-	-	-	-	-	-	-

### 2.4 影像学检查

对检出 GJB2 基因突变的 22 例患者行颞骨薄层高分辨率 CT 检查,未发现有颞骨 CT 异常。

## 3 讨论

NSHL 是一种高度遗传异质性疾病,通过基因检测可以对部分患者做出病因诊断,而且此法可以对耳聋患者提供遗传信息及婚育帮助。在国内外耳科学家和遗传学家的共同努力下,迄今为止,已成功定位的非综合征型耳聋(NSHL)基因位点共 133 个,包括<sup>[2]</sup>:常染色体显性聋(DFNA)54 个、常染色体隐性聋(DFNB)71 个、X-连锁聋(DFN)5 个、修饰基因(DFNM)2 个和 Y-连锁聋(DFNY)1 个;克隆致病核基因 62 个,其中 DFNA 相关基因 27 个,DFNB 相关基因 40 个,DFN 相关基因 3 个,部分基因同时为 DFNA 与 DFNB。另外发现 2 个线粒体基因与 NSHL 相关(<http://hereditaryhearingloss.org/>)。遗传性耳聋的病因学有了很大进展,国内研究发现大部分非

综合征型耳聋主要与少数几个基因突变密切相关,这为我们大规模开展耳聋基因筛查和基因诊断提供依据。遗传性耳聋基因检测是目前最为有效的病因学分析方法之一。

GJB2 基因编码缝隙连接蛋白(connexin 26)<sup>[3]</sup>,在耳聋人群中,GJB2 基因突变导致的耳聋表现为双侧对称性语前聋,听力损失程度变异较大,多数为重度或极重度耳聋。文献报道 GJB2 基因突变是多数常染色体隐性遗传性耳聋的责任基因<sup>[4-6]</sup>。在中国遗传性耳聋患者中 GJB2 基因突变也占有相当比例<sup>[7-8]</sup>,Dai 等<sup>[9]</sup>报道 GJB2 突变在非综合征性耳聋人群的检出率在中国的不同地区为 4%~30.4%,其主要突变为 235delC。GJB2 的基因突变类型主要有错义突变、移码突变、无义突变等。GJB2 基因突变主要是导致隐性遗传耳聋。GJB2 基因突变具有种族差异性,在中国人群中,最常见的 GJB2 基因突变主要有 235delC、299\_300delAT、176\_191del16 等,约占 GJB2 基因突变人群的 80% 以上<sup>[10-11]</sup>。多项研究表明此类患儿接受人工耳蜗植入后听力语言康复效

果好。本研究发现 118 例患儿中,22 例存在检测基因位点突变,汉族 18 例、纳西族 2 例、基诺族 2 例, GJB2 基因突变 22 例占 18.64%,其中 235delC 纯合突变 8 例,235delC 单杂合突变 6 例,235delC/299-300delAT 双杂合突变 8 例,299-300del 未检出纯合及单杂合突变,与国内湖南郴州地区报道 GJB2 突变率及突变方式高度吻合<sup>[12]</sup>。未检出 GJB3 基因突变。云南部分地区极重度非综合征型耳聋患者 GJB2 突变率及突变形式与国内报道的平均发生率基本一致。118 例患儿中 GJB2 突变位点 235delC 纯合突变时,对应其父母亲双方同时均为 235delC 杂合突变;235delC 单杂合突变时,对应其单方父亲或母亲 235delC 杂合突变;235delC/299-300delAT 复合杂合突变时,对应其母亲 235delC 杂合突变和父亲 299-300delAT 杂合突变,女性患儿中 GJB2 基因突变位点中未检出 235delC 纯合突变及杂合突变。患儿携带有 GJB<sub>2</sub> 突变,其父母必有一方是杂合突变。父母双方都有突变的,还会出现患儿纯合突变或双杂合突变情况,8 例 235delC 纯合突变耳聋患儿明确耳聋病因,携带耳聋致病基因的家庭使其下一代携带耳聋致病基因的风险提高,如果与携带同样基因的异性结合,致出现耳聋患儿的几率增大。所以根据遗传性耳聋基因筛查结果对遗传性耳聋的二级预防有重要意义。GJB3 基因突变可引起常染色体显性或者隐性遗传性非综合征型遗传性耳聋<sup>[13-14]</sup>,其突变造成缝隙连接蛋白 Connexin-31 第二胞外区的结构发生改变,主要表型为语后进行性高频听力感音神经性耳聋。本次检测对象 118 例先天性感音神经性耳聋,根据飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术检测位点多、覆盖率高,相比市场上使用较多的检测试剂盒及其他检测技术,飞行时间质谱技术能一次检测 20 个热点突变,包含了中国人群中高发的突变位点,覆盖率高。就此检测条件该研究同时筛查的 GJB3 基因未检出有突变病例,其流行病学特征有待于进一步阐明。

本研究采用飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术进行检测,其优点在于直接检测 DNA 的分子量(质荷比),确定碱基类型,不需经过任何形式的信号转换;曾云等<sup>[15]</sup>报道的 MALDI-TOF-MS 的检测结果与直接测序的结果完全一致,其具有高度灵敏性和准确性,能区分相对分子质量只差 1 的分子,同时使用的试剂耗材相对简单,不需要荧光染料等价格昂贵的试剂,反应可以在微量体系中进行,减少样本和各种消耗品的使用。但是,此项技术只能检测特

定的耳聋基因位点,无法对检测范围外的突变位点进行检测。在本研究选取的病例中都是门诊确诊为非综合征型先天性耳聋并拟行人工耳蜗手术的患者,其父母亲均未发现有听力异常情况。根据云南地区在我院门诊就诊的散发病例以汉族居多,检出率相对也以汉族居多,在针对全国不同区域、不同民族的耳聋人群进行深入研究的情况下,掌握确凿的听力学和遗传学数据,明确地区民族耳聋基因突变的频率、特定耳聋基因突变和多态性特点,以便能够为耳聋基因筛查和基因诊断提供详细的参考依据,制定个性化的遗传咨询服务,指导优生优育有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 王国建,袁永一,李荣,等.不同听力学表型人群中常见耳聋基因突变检出率的分析[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2011,25(10):445-448.
- [2] Marcolla A, Bouchetemble P, Lerosey Y, et al. Genetic deafness [J]. Ann Otolaryngol Chir Cervicofac, 2006, 123(3):143-147.
- [3] Todt I, Hennies HC, Basta D, et al. Vestibular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26 [J]. Neuroreport, 2005, 16(11):1179-1181.
- [4] Smith RJ, Bale JF, White KR. Sensorineural hearing loss in children [J]. Lancet, 2005, 365(9462):879-890.
- [5] Dai P, Liu X, Han D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families: implication for early detection and prevention of deafness [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1):194-199.
- [6] Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness [J]. Clin Genet, 2006, 69(5):371-392.
- [7] Ji YB, Han DY, Lan L, et al. Molecular epidemiological analysis of mitochondrial DNA 12SrRNA A1555G, GJB2, and SLC26A4 mutations in sporadic outpatients with nonsyndromic sensorineural hearing loss in China [J]. Acta Otolaryngol, 2011, 131(2):124-129.
- [8] Chen D, Chen X, Cao K ORL, et al. High prevalence of the connexin 26 (GJB2) mutation in Chinese cochlear implant recipients [J]. J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2009, 71(4):212-215.
- [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, 14(7):26.
- [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].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013,19(6):475-480.
- [11] 李磊,杨涛,吴皓,等.耳聋基因的筛查与诊断[J].诊断学理论与实践,2010,9(5):409-412.
- [12] 胡鹏,邓忠,谭东辉,等.湖南郴州非综合征型聋患者 GJB2、

SLC26 A4 和线粒体 DNA12Sr RNA 基因突变分析[J]. 听力学及言语疾病杂志,2012,20(1):12-16.

- [13] Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, et al. Mutations in connexin 31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss [J]. Hummol Genet, 2000, 9(1):63-67.
- [14] Xia JH, Liu CY, Tang BS, et al. Mutation in the gene encoding

gap junction Protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment [J]. Nat Genet, 1998, 20(4):370-373.

- [15] 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):985-989.

(修回日期:2014-10-01)

(上接第 98 页)

- [11] Cohenca N, Karni S, Rotstein I. Extraoral sinus tract misdiagnosed as an endodontic lesion[J]. J Endod,2003,29(12):841-843.
- [12] McWalter GM, Alexander JB, del Rio CE, et al. Cutaneous sinus tracts of dental aetiology [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1988,66(5):608-614.
- [13] Versiani MA, Cristescu RC, Saguy PC, et al. Enamel pearls in permanent dentition: case report and micro-CT evaluation [J]. Dentomaxillofac Radiol,2013,42(6):20120332.
- [14] de Medeiros EH, Pepato AO, Sverzut CE, Trivellato AE. Orbital abscess during endodontic treatment: a case report [J]. Endod, 2012,38(11):1541-1543.
- [15] Nair UP, Nair MK. Maxillary sinusitis of odontogenic origin: cone-beam volumetric computerized tomography aided diagnosis [J]. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod,2010,110(6):e53-e57.
- [16] Brown RS, Jones R, Feimster T, et al. Cutaneous sinus tracts (or emerging sinus tracts) of odontogenic origin: a report of 3 cases [J].

Clin Cosmet Investig Dent, 2010,2(1):63-67.

- [17] Cantatore JL, Klein PA, Lieblisch LM. Cutaneous dental sinus tract, a common misdiagnosis: a case report and review of the literature [J]. Cutis,2002,70(5):264-267.
- [18] Rahpeyma A, Khajehahmadi S. Needle subcision: a conservative treatment for facial dimpling after elimination of odontogenic infection source: a technical note [J]. Oral Maxillofac Surg, 2014,18(4):415-418.
- [19] Lee BK. One-stage operation of large oroantral fistula closure, sinus lifting and autogenous bone grafting for dental implant installation [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,2008,105(6):707-713.
- [20] Haas R, Watzak G, Baron M, et al. A preliminary study of monocortical bone grafts for oroantral fistula closure [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,2003,96(3):263-266.

(修回日期:2014-11-24)

## · 消息 ·

### 《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》实行优质论文网上优先数字出版

为进一步提高期刊学术质量,缩短出刊周期,及时有效地传播优秀学术成果,提高作者学术成果的认可、传播和利用价值,作者可尽快发表成果,争取成果首发权,也为广大学者提供良好的文献查阅条件,我刊已加入“中国知网”学术期刊优先数字出版平台。并于2014年5月开始对优质稿件实行优先数字出版。

优先出版是数字化出版的一种创新与革命,凡已达到本刊正式出版水平的论文,在正式按期次成册印刷出版前,均可在“中国知网”学术期刊以单篇论文为单位、以 PDF 文档的形式在线优先发表。优先出版通常比印刷出版提前几周或几个月。作者所投本刊论文在通过外审、定稿及编辑加工后,能够第一时间在“中国知网”上发表。

如果作者同意所投本刊的论文于期刊印刷出版前在中国学术期刊(光盘版)电子杂志社主办的“中国知网”上进行优先数字出版,并许可“中国知网”在全球范围内使用该文的信息网络传播权,作者可在本刊远程投稿系统“作者投稿查稿”中下载“中国知网”优先出版授权书,签字后寄回。优先数字出版期刊的名称与印刷版期刊相同,其编辑单位是期刊编辑部。论文的网上优先数字出版由编辑部完成。