

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201605004

· 论著 ·

GJB2 和 SLC26A4 基因部分罕见变异的致病性研究

何龙霞^{1,2,3}, 王晓雯^{1,2,3}, 朱亚忠^{1,2,3}, 吴皓^{1,2,3}, 杨涛^{1,2,3}

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院耳科学研究所, 上海 200092; 3. 上海市耳鼻咽喉疾病转化医学重点实验室, 上海 200092)

摘要: **目的** 通过对听力正常的耳聋人群亲属的基因筛查, 对隐性遗传性耳聋基因部分罕见错义序列变异的致病性提出一种简单而有效的排查方法。**方法** 收集 800 例具有不同程度听力障碍患者的 DNA 样本, 通过多聚酶链反应(PCR)扩增 GJB2 和/或 SLC26A4 基因片段(包括编码外显子和邻近的侧翼区域), 并对 PCR 产物进行 Sanger 测序和序列分析。当先证者含有明确致病突变时, 在取得同意的情况下进一步对其听力正常的亲属进行相应基因的突变检测。**结果** 在 3 个携带 GJB2 或者 SLC26A4 基因突变的先证者亲属中, 一些正常听力者以复合杂合的形式同时携带 GJB2 或者 SLC26A4 基因的一个致病性明确突变和一个致病性不明确的罕见序列变异, 包括 GJB2 基因 p. T123N/c. 235delC 突变(2 例)和 SLC26A4 基因 p. A434T/c. 919-2A>G 突变(1 例)。**结论** GJB2 基因 p. T123N 和 SLC26A4 基因 p. A434T 可基本排除为外显率较高的致病性突变的可能性。以上关于隐性遗传性耳聋基因疑似突变致病性的排除方法相对简便易行, 通过大样本量的基因筛查可以为临床遗传性耳聋基因诊断和遗传咨询提供更可靠、明确的依据。

关键词: 耳聋; GJB2; SLC26A4; 罕见序列变异; 致病性

中图分类号: Q789; R764.43 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)05-0353-04

Study on pathogenicity of some rare sequence variants in GJB2 and SLC26A4 genes

HE Long-xia, WANG Xiao-wen, ZHU Ya-zhong, WU Hao, YANG Tao

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To determine the pathogenicity of rare, missense variants in known causative recessive deafness genes by sequencing of unaffected family members of the deaf patients. **Methods** A total of 800 probands with hearing impairment were collected to screen the deafness-causing genes GJB2 and/or SLC26A4 by PCR and Sanger sequencing, including the coding exons and flanking sequences. When probands harbored the pathogenic mutations and if possible, some unaffected family members of probands were recruited to further analyze the mutations in the corresponding genes. **Results** Two rare missense variants were found in three unaffected family members in different families, including p. T123N ($n=2$) in GJB2 and p. A434T ($n=1$) in SLC26A4, with the opposite allele to a known pathogenic recessive mutation. **Conclusion** p. T123N in GJB2 and p. A434T in SLC26A4 are rare but benign variants for deafness. Sequencing of unaffected family members of the affected patients may be an efficient approach to clarify the pathogenicity of some rare variants for recessive genetic disorders with high penetrance. More reliable data will be provided for deafness-causing gene diagnosis and counseling through screening plentiful samples.

Key words: Deafness; GJB2; SLC26A4; Rare variants; Pathogenicity

耳聋是人类最常见的感觉神经系统缺陷, 发病

率约为 1/1 000 ~ 3/1 000, 其中约 50% 与遗传因素有关^[1-3]。遗传性耳聋的遗传方式主要包括常染色体显性遗传, 常染色体隐性遗传, X-连锁, 线粒体母系遗传。耳聋具有高度的遗传异质性, 据估计遗传性耳聋的致病基因超过 600 个, 目前已明确的非综

基金项目: 上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”生物医药产学研合作项目(14DZ1940102)。

作者简介: 何龙霞, 女, 在读博士研究生。

通信作者: 杨涛, Email: yangtfxl@sina.com

合征型耳聋基因超过70个,综合征型耳聋基因超过150个,仍有大量的致病基因还不明确,其中GJB2基因突变导致的耳聋占50%~70%,是最常见的耳聋基因^[4]。该基因编码由266个氨基酸残基组成的缝隙连接蛋白Connexin 26,此蛋白与相邻细胞的缝隙连接蛋白组成一个完整的缝隙连接通道,这些通道在信息传导和物质交换中起重要作用^[5]。除此之外,SLC26A4基因是另一常见遗传性耳聋基因,其突变导致的耳聋约占10%^[6]。SLC26A4基因编码由780个氨基酸残基组成的多次跨膜蛋白Pendrin,此蛋白是一个跨膜的离子交换器,在内耳、甲状腺等不同组织中均有表达。由于GJB2和SLC26A4基因致病突变导致耳聋的高发性,这两个基因已作为耳聋患者的主要筛查基因。但是,在筛查过程中,往往会有一些罕见的错义序列变异伴随着致病性明确的突变一同出现。尽管这些罕见错义序列变异的致病性可以通过功能实验(比如体外/体内实验)来确定,但是这些实验不仅耗时,而且成本高,甚至不能完全模拟人体内的情况。或者,错义序列变异的致病性可以通过以下方式确认,即此序列变异在多个家系中与表型发生共分离,同时在大样本的病例对照中,其等位基因频率具有显著的统计学意义,即可确定其为致病突变。但是,在大多数情况下,由于各种原因,这是不容易完成的,比如不能得到家系中所有的样本。面对这问题,本研究中,我们以GJB2和SLC26A4基因为例,通过筛查耳聋患者的正常亲属来初步排除一些罕见错义序列变异的致病性,这是一种简单而有效的方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究收集不同程度听力障碍的非综合征型耳聋患者800例。所有的患者均来自上海交通大学医学院附属新华医院遗传性耳聋咨询门诊。当先证者被检测含有GJB2和SLC26A4基因的致病突变,如果可能,将进一步对其正常听力的亲属进行筛查分析。所有受试者或患儿监护人均签署知情同意书。此研究经上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会论证认可。

1.2 临床资料

详细收集所有受试者的病史资料并做详细的体格检查。所有受试者进行听力学评估,包括耳镜检查,鼓膜镜检查,纯音测听/听觉脑干反应(ABR,针

对年龄较小的受试者)。听力损失程度以受试者听力较好耳的纯音听阈平均值确定,包括语言频率500, 1 000, 2 000, 4 000 Hz。听力损失程度分为4度,分别为轻度(20~40 dB),中度(41~70 dB),重度(71~95 dB),极重度(>95 dB)。正常听力定义为<20 dB。

1.3 GJB2和SLC26A4基因突变筛查

使用全血基因组DNA快速提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司)从血样中提取基因组DNA,严格按说明书进行操作。通过PCR和Sanger测序方法,进行目的基因筛查,筛查区域包括编码外显子和邻近区域,具体方法同前^[7-8]。测序结果分别与GJB2和SLC26A4基因的参考序列做对比。基因序列变异的等位基因频率来自于数据库NHLBI ESP(<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)和ExAC(<http://exac.broadinstitute.org>)。4种软件对相应的序列变异进行致病性预测,包括PolyPhen2/SIFT/PROVEAN/Mutation Taster。通过多物种的序列比对进行保守性评估。

2 结果

通过筛查,在3个不同的家系中,有3个听力正常的亲属含有GJB2或SLC26A4基因的复合杂合序列变异,即一个单等位基因的致病性明确的突变和一个单等位基因的致病性不明确的罕见错义序列变异。GJB2基因和SLC26A4各发现一个致病性不明确的罕见错义序列变异,分别为p. T123N和p. A434T。在D918家系中,先证者(D918-1)是一个先天性双侧中度感音神经性耳聋患者,含有c. 235delC/p. V371复合杂合突变。进一步筛查其听力正常的父母,父亲(D918-2)含有复合杂合序列变异p. T123N/c. 235delC,母亲(D918-3)含有杂合突变p. V371。在另一个家系D1281中,先证者(D1281-1)7岁时出现听力下降,为双侧中度感音神经性耳聋。通过检测发现其携带GJB2基因c. 235delC杂合突变,而这是不足以导致其耳聋的。关于其耳聋的真正原因可能有以下几种情况:①GJB2基因突变不是其耳聋的原因,其只是c. 235delC突变的携带者;②其致病突变位于未检测的区域,如GJB2基因的启动子区域;③可能是双基因突变导致耳聋,即与其他耳聋基因有关。以上各种推测,只有当另外的突变找到后才能得以证实。但是,其父亲(D1281-2)含有GJB2基因的复合杂合

序列变异 p. T123N/c. 235delC,其母亲(D1281-3)不含任何突变。关于 SLC26A4 基因,只在一个家系中发现一个罕见错义序列变异 p. A434T。在 D1597 家系中,先证者(D1597-1)是一个先天性双侧中度感音神经性耳聋的患者,其含有 SLC26A4 基因的复合杂合突变 c. 919-2A > G/c. 915insG。其父母的听力都正常,并且每人分别含有其中一个杂合突变。其舅舅(D1597-4,先证者母亲的弟弟)听力正常,检测发现含有复合杂合序列变异 p. A434T/c. 919-2A > G。3 个家系图见图 1。

罕见错义序列变异的等位基因频率来自于数据库 NHLBI ESP 和 ExAC,见表 1。在 NHLBI ESP 数据库未查到 p. A434T 的等位基因频率。GJB2 和 SLC26A4 基因的两个罕见错义序列变异潜在的致病性通过四种预测软件进行评估,包括 PolyPhen2, PROVEAN, SIFT, Mutation Taster; 4 种预测软件基本都一致地将 p. T123N 预测为多肽。而 p. A434T 的预测结果却不一致, Mutation Taster 将其认定为致病突变,而其他 3 种软件将其看作多肽。见表 1。

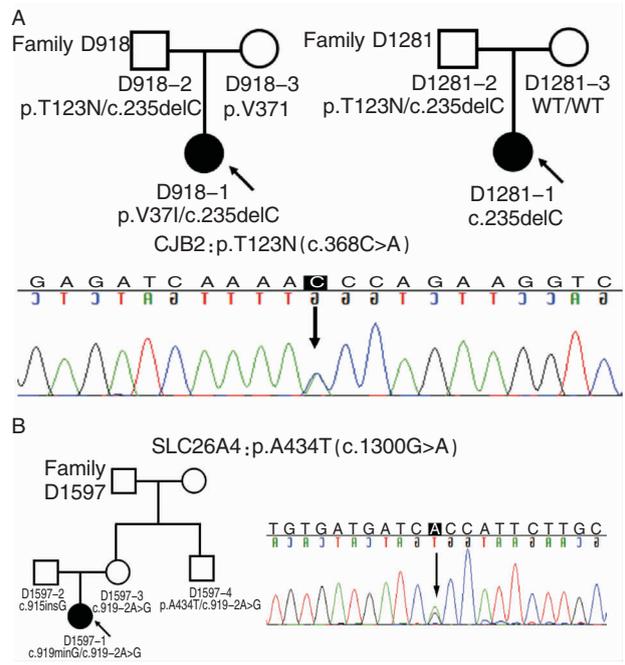


图 1 3 个家系图及对应的罕见错义序列变异 A:p. T123N 出现在 D918 和 D1281 两个不同的家系中;B:p. A434T 出现于 D1597 家系

表 1 两个罕见错义序列变异

Variant	Gene	Nucleotide change	Type of variant	mRNA	AF (ESP)	AF (ExAC)	Polyphen2	PROVEAN ^① (score)	SIFT ^② (score)	Mutation Taster
p. T123N	GJB2	c. 368C > A	Missense	NM_004004	0.000154	0.0005452	Benign	Neutral (0.79)	Tolerated (0.545)	Polymorphism
p. A434T	SLC26A4	c. 1300G > A	Missense	NM_000441	/	0.000008261	Benign	Neutral (-1.25)	Tolerated (0.209)	DC ^③

注:①:有害和无害的分界值为 -1.3;②:有害和无害的分界值为 0.05;③: disease causing(疾病原因)

将人类 GJB2 和 SLC26A4 基因的氨基酸序列和其他多个物种进行比对,结果见表 2。氨基酸 T123 和 A434 在人类及其他多个物种中保守。

表 2 氨基酸 T123 和 A434 在多个物种中的序列比对

物种	p. T123N	物种	p. A434t
Human	IKTQKVRIEGSL	Human	AAIVMIAIALG
Mouse	IKTQKVRIEGSL	Mouse	AGIVMVAIVALG
Rat	IKTQKVRIEGSL	Rat	AVIVMVAIVALG
Chimpanzee	IKTQKVRIEGSL	Dog	AGIVMIAIVALG
Chicken	IKTQKVRIEGSL	Chimpanzee	AAIVMIAIALG
		Chicken	AGIVLIAIVALG
		Clawed frog	AGIVLIAIVALG

3 讨论

本研究通过对耳聋患者及其听力正常的亲属进行耳聋基因 GJB2 和 SLC26A4 的筛查,在 3 个不同的家系中发现两个罕见的错义序列变异,包括 GJB2 基因 p. T123N 和 SLC26A4 基因 p. A434T。p. T123N 在数据库 NHLBI ESP 和 ExAC 的等位基因

频率分别为 0.000154 和 0.0005452,低于隐性耳聋基因致病频率 0.5% 的判断标准^[9]。然而 4 种预测软件都将其看作非致病序列变异。氨基酸 T123 在人类,小鼠,大鼠等物种中是保守的。之前的文献报道 p. T123N 以单杂合形式出现在耳聋患者和正常人群中^[10-12]。同时,在两个独立的研究中,一个日本患者和伊朗患者检测到 p. T123N 分别与突变 c. 176-191del16 和 c. 35delG 以复合杂合的形式出现,在研究中均被看作致病性突变^[13-14]。但在其他的一些研究中 p. T123N 被认定为多肽^[15-17]。

关于 SLC26A4 基因的罕见错义序列变异 p. A434T,其在数据库 ExAC 中的等位基因频率为 0.000008261,低于隐性耳聋基因致病频率 0.5% 的判断标准。4 种预测软件对其致病性的预测结果不一致, Mutation Taster 将其认定为致病的,而 PolyPhen2、SIFT 等将其视为良性或可容忍的。氨基酸 A434 在人类,小鼠,大鼠,爪蛙等多个物种中保守,说明了其重要性。而在本研究之前,并未有关于

p. A434T致病性的文献报道,所以其可能是一个新的罕见错义序列变异。

实际上,一个罕见错义序列变异的致病性可以通过以下方式确定,即此序列变异在多个家系中与表型发生共分离,同时在大样本的患者对照中,其等位基因频率具有显著的统计学意义,即可确定其为致病突变。但是,在大多数情况下,因为各种原因,这种判断致病性的方法是不容易实现的。面对这种情况,本研究中我们纳入先证者家系中正常听力的亲属,对他们进行耳聋基因筛查,发现两个罕见的错义序列变异,这是本研究的一个特别之处。通过此研究方法,可初步排除两个罕见错义序列变异 p. T123N 和 p. A434T 的致病性。p. T123N 和 p. A434T 都是与一个致病性明确的突变以复合杂合的形式在正常听力者中出现。众所周知,在非综合征型遗传性耳聋中,GJB2 和 SLC26A4 基因主要以常染色体隐性遗传的方式致聋。也就是说,这两个基因的序列变异以纯合或者复合杂合的形式致病。由此推测,如果 p. T123N 和 p. A434T 是致病突变,那么这 3 个家系中含有 p. T123N 或 p. A434T 的 3 个受试亲属应该会有听力障碍。但目前这 3 例受试者都从未出现听力障碍,病史资料和听力评估都显示为正常听力。综合以上结果可初步确定这两个罕见错义序列变异不是致病突变。当然,这个结论必须以高外显率的表型为前提。

综上所述,以上关于隐性耳聋基因高外显率的疑似突变致病性的排除方法相对简便易行,在大样本量基因筛查的基础上可通过不断的数据积累和共享对既往报道数据进行修正和更新,为临床遗传性耳聋基因诊断和遗传咨询提供更可靠、明确的依据。

参考文献:

- [1] Khabori MA, Patton MA, Consanguinity and deafness in Omani children[J]. *International journal of audiology*,2008,47(1):30-33.
- [2] Mehl AL, Thomson V, The Colorado newborn hearing screening project, 1992 - 1999: on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening[J]. *Pediatrics*,2002,109(1):E7.
- [3] Nadol JB Jr. Hearing loss[J]. *N Engl J Med*,1993,329(15):1092-1102.
- [4] Huijun Y, Yu L. Application of next generation sequencing in gene identification and genetic diagnosis of hereditary hearing loss [C]. *Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji, Yi chuan*,2014,36(11):1112-1120.
- [5] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel [J]. *Cell*,1996,84(3):381-388.
- [6] Park HJ, Shaikat S, Liu XZ, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness[J]. *Journal of medical genetics*,2003,40(4):242-248.
- [7] Green GE, Scott DA, McDonald JM, et al. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness[J]. *Jama*,1999,281(23):2211-2216.
- [8] 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 family[J]. *American journal of human genetics*,2004,74(1):139-152.
- [9] Shearer AE, Eppsteiner RW, Booth KT, et al. Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants[J]. *American journal of human genetics*,2014,95(4):445-453.
- [10] Park HJ, Hahn SH, Chun YM, et al. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss [J]. *Laryngoscope*,2000,110(9):1535-1538.
- [11] Tang HY, Fang P, Ward PA, et al. DNA sequence analysis of GJB2, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls, *American journal of medical genetics* [J]. Part A,2006,140(22):2401-2415.
- [12] Wu BL, Lindeman N, Lip V, et al. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing, *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*,2002,4(4):279-288.
- [13] Bonyadi MJ, Fotouhi N, Esmaeili M, Spectrum and frequency of GJB2 mutations causing deafness in the northwest of Iran[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*,2014,78(4):637-640.
- [14] Oguchi T, Ohtsuka A, Hashimoto S, et al. Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns[J]. *Journal of human genetics*,2005,50(2):76-83.
- [15] Chen T, Jiang L, Liu C, et al. Update of the spectrum of GJB2 mutations in 107 patients with nonsyndromic hearing loss in the Fujian population of China[J]. *Annals of human genetics*,2014,78(3):235-242.
- [16] Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness[J]. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*,2003,5(3):161-165.
- [17] Zainal SA, Md Daud MK, Abd Rahman N, et al. Mutation detection in GJB2 gene among Malays with non-syndromic hearing loss [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*,2012,76(8):1175-1179.

(收稿日期:2016-04-22)