

韶关地区 1 242 例新生儿耳聋易感基因筛查结果分析

马占忠, 许红雁, 张浔, 钟永红, 范舒舒, 刘玉兰, 李嘉兴

汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东 韶关 512026

摘要: **目的** 研究韶关地区新生儿耳聋易感基因携带情况, 为开展遗传咨询和建立耳聋防控体系提供科学依据。 **方法** 采用多重 PCR 联合导流杂交技术检测 1 242 例新生儿的 4 个耳聋基因的 13 种突变位点。 **结果** 耳聋基因携带者共检出 53 例(4.27%, 53/1 242), 其中 *SLC26A4* 检出 24 例(1.93%, 24/1 242); *GJB2* 检出 19 例(1.53%, 19/1 242); mtDNA 检出 8 例(0.64%, 8/1 242); *GJB3* 检出 2 例(0.16%, 2/1 242)。 **结论** 韶关地区人群最主要的耳聋基因是 *SLC26A4*, *IVS7-2A>G* 为其突变热点; 其次是 *GJB2* 基因, 235delC 为其突变热点。对新生儿人群进行耳聋易感基因筛查, 有助于遗传性耳聋的早发现、早干预, 具有良好的临床应用价值。

关键词: 耳聋; 基因突变; 基因筛查

中图分类号: R764.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1452-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.012

Screening results of deafness susceptibility genes among 1,242 newborns in Shaoguan region

MA Zhan-zhong, XU Hong-yan, ZHANG Xun, ZHONG Yong-hong, FAN Shu-shu, LIU Yu-lan, LI Jia-xing

The Affiliated Yuebei People's Hospital, Medical College of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026, China

Abstract: **Objective** To study the carrying status of deafness susceptibility genes among newborns in Shaoguan region, and to provide a scientific basis for developing genetic counseling and establishing a deafness prevention and control system. **Methods**

Multiplex PCR combined with diversion hybridization technology was used to detect 13 hotspot mutations of four deafness-associated genes in 1,242 newborns. **Results** A total of 53 (4.27%, 53/1,242) deafness-associated gene carriers were detected, of which *SLC26A4* was detected in 24 cases (1.93%, 24/1,242), *GJB2* in 19 cases (1.53%, 19/1,242), mtDNA in 8 cases (0.64%, 8/1,242) and *GJB3* in 2 cases (0.16%, 2/1,242). **Conclusions** The main deafness-associated genes in Shaoguan region are *SLC26A4* and *GJB2*, and their mutation hotspots are *IVS7-2A>G* and 235delC respectively. Screening the neonatal population for deafness susceptibility genes is conducive to early detection and early intervention of hereditary deafness, and has a good clinical application value.

Key words: deafness; gene mutation; gene screening

据 WHO 估计全球耳聋患者 3.6 亿, 新生儿听力障碍的发病率为 0.1%~0.3%^[1-2]。耳聋也是我国第二大出生缺陷疾病, 我国现有听力残疾人 2 780 万, 7 岁以下聋哑儿童高达 80 万, 每年新增聋儿约 3 万, 如果加上迟发性耳聋及药物性耳聋, 每年新增听障儿童超过 6 万, 其中约 60% 的耳聋属于遗传性耳聋^[3]。我国人群的耳聋分子流行病学研究表明, 遗传性耳聋大多数为常染色体隐性遗传, 主要由 *GJB2*、*GJB3*、*SLC26A4* 和线粒体 DNA (mtDNA) 基因缺失或突变引起^[4]。本研究采用 PCR 联合导流杂交技术对韶关地区 1 242 例新生儿进行耳聋基因检测, 明确该地区新

生耳聋基因携带情况, 为开展遗传咨询和建立耳聋防控体系提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 调查对象 研究对象为 2017 年 1-6 月在粤北人民医院出生的 1 242 例新生儿, 在新生儿监护人签署知情同意书的情况下采集足跟血进行耳聋基因检测。

1.2 研究方法 按照采血规范采集新生儿足跟血三滴于专用采血卡滤膜上, 待自然晾干后装入封口袋中, 送至实验室立即检测或者 2℃~8℃ 保存备用。

1.2.1 耳聋基因检测 采用耳聋基因检测试剂盒 (广东凯普生物科技股份有限公司) 检测 4 个耳聋基因的 13 种突变位点。其中 *GJB2* 基因包括 35del G、155delTCTG、176del16、235del C 和 299del AT, *SLC26A4* 基因包括 1229C>T、2168A>G 和 *IVS7-2A>*

基金项目: 韶关市科研计划项目 (2017CX/016); 韶关市卫生计生科研项目 (Y17059)

作者简介: 马占忠 (1981-), 男, 硕士, 副主任检验师, 主要从事分子诊断工作。

G,mtDNA 基因包括 1555A>G 和 1494C>T,7445A>G、12201T>C,*GJB3* 基因含 538C>T,具体操作参照标准操作规程和试剂盒说明书。

1.2.2 测序验证 对较为严重的耳聋基因和疑为罕见突变类型的样本寄至广州凯普医学检验所进行测序。PCR 反应体系:基因组 DNA 40 ng,10×Buffer(含 MgCl₂ 25 mmol/L)2 μl,10×dNTP(4 mmol/L)2 μl,引物(2 μmol/L)各 1 μl,加 Taq 酶(2.5 U/μl)0.5 μl,加 ddH₂O 至 20 μl。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存。PCR 扩增产物经纯化后在 ABI3500 基因测序仪(ABI,美国)测序。

2 结果

2.1 耳聋基因检测结果 1 242 例样本中检测出耳聋基因突变阳性 53 例,突变率为 4.27%。其中 *SLC26A4* 检出 24 例(1.93%,24/1 242);*GJB2* 检出 19 例(1.53%,19/1 242);mtDNA 检出 8 例(0.64%,8/1 242);*GJB3* 检出 2 例(0.16%,2/1 242)。见表 1。

表 1 韶关地区 1 242 例新生儿耳聋基因检测结果

基因	突变类型	例数	阳性率(%)
mtDNA	1494C>T	0	0.00
	1555A>G 均质突变	7	0.56
	7445A>G 均质突变	1	0.08
	12201T>C	0	0.00
<i>SLC26A4</i>	IVS7(-2)A>G	14	1.13
	1229C>T	4	0.32
	2168A>G	6	0.48
<i>GJB2</i>	35del G	0	0.00
	155delTCTG	0	0.00
	176del16	0	0.00
	235del C	17	1.37
	299del AT	2	0.16
<i>GJB3</i>	538C>T	2	0.16
合计		53	4.27

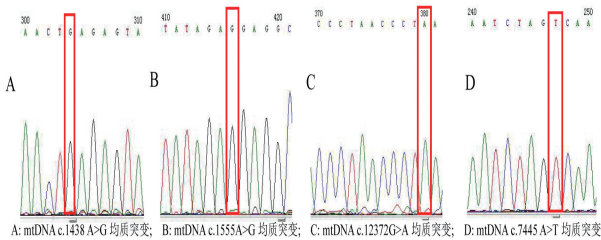
2.2 测序验证结果 测序样本共 10 例,涉及到 mtDNA 的 1494 和 7445 对照点不显色或显色弱以及先天性耳聋等异常结果,需要测序查因。测序结果发现在检测靶位点附近发生突变,同时还发现 2 例试剂盒检测范围外的致病突变位点,分别为 mtDNA 基因的 c.12372G>A 均质突变和 c.7445 A>T 均质突变,见表 2 和图 1。

表 2 10 例样本测序结果

样本编号	试剂盒检测结果	测序验证结果	致病性
17030	mtDNA 7445N 不显色	c.7440T>G 均质突变	未明

续表 2

样本编号	试剂盒检测结果	测序验证结果	致病性
17126,17472	mtDNA 7445N 不显色	c.7419 G>A 均质突变	未明
17480	mtDNA 1494N 显色弱	c.1438 A>G 均质突变	未明
17594,17600	mtDNA 1494N 显色弱	c.1438 A>G 均质突变	未明
		c.1503G>A 均质突变	不致病
17668	mtDNA c.1555A>G 均质突变 (患者父亲先天性耳聋,母亲 药敏性耳聋,测序查因)	c.1555A>G 均质突变	药敏性耳聋
		c.12406G>A 均质突变	未明
17669	阴性 (患者先天性耳聋,测序查因)	c.12396T>C 均质突变	未明
		c.12372G>A 均质突变	与遗传性视神经病有相关性[5]
17743	mtDNA 7445N 不显色	c.7445 A>T 均质突变	感觉神经性耳聋[6]
17836	mtDNA 7445N 显色弱	c.7250A>G 均质突变	未明



注: A:mtDNA c.1438 A>G 均质突变; B:mtDNA c.1555A>G 均质突变; C:mtDNA c.12372G>A 均质突变; D: mtDNA c.7445 A>T 均质突变。

图 1 耳聋基因 mtDNA 测序结果

3 讨论

在 1 242 份标本中检测出耳聋基因突变阳性 53 例,突变率为 4.27%。其中,突变率最高的是 *SLC26A4* 基因(1.93%,24/1 242),IVS7-2A>G 为其突变热点(1.13%,14/1 242);其次是基因 *GJB2* (1.53%,19/1 242),235delC 为其突变热点(1.37%,17/1 242)。经测序后发现试剂盒检测范围外的致病耳聋基因 2 例,分别为 mtDNA 基因的 c.12372G>A 均质突变和 c.7445 A>T 均质突变。蓝培基等[7]在韶关地区的 328 例新生儿耳聋基因筛查中未检出 *GJB3* 基因突变,而本研究在韶关地区检出 *GJB3* 基因的 538C>T 杂合突变 2 例,这与扩大样本量以及检测方法不同有关。此外,本研究还发现存在 mtDNA 基因对照点不显色或显色弱现象,这是因为 mtDNA 无组蛋白保护,其突变率较核基因高 10~20 倍,靶基因附近碱基突变或多态性导致与探针结合效率降低致使杂交后正常对照点不显色或者显色弱,结果也通过测序得以验证。

GJB2 基因突变是遗传性耳聋常见的病因,尤其以 235delC 突变最常见,本研究中 235delC 突变占 1.37%(17/1 242),这与孙晓勉等[8]报道的深圳市耳聋基因

235delC 突变占 1.37% 一致, 低于熊怡等^[9]报道的中山市的 235delC 突变占 2.65%。明确 *GJB2* 基因突变致聋对治疗和预后具有指导意义, 因 *GJB2* 耳聋基因携带者的螺旋神经节细胞数量正常, 人工耳蜗植入后语言理解能力强, 适合人工耳蜗植入。当患者为 *GJB2* 纯合突变, 表现为重度先天性耳聋, *GJB2* 杂合突变或与其他耳聋基因组成复合杂合突变时, 患者无明显耳聋表现或病情较轻, 无需过度治疗^[10]。

SLC26A4 基因突变是引起感音神经性耳聋的病因。其突变谱具有种族和地区差异, 在我国突变频率高的是 IVS7-2A>G 和 H723R^[11]。本研究中的 IVS7-2A>G 突变占 1.13% (14/1 242), 高于其他研究报道的结果^[8-9]。当患者为 *SLC26A4* 纯合突变或复合杂合型突变时, 临床表现为后天迟发性耳聋^[12]。此类患者要避免用力打喷嚏、用力擤鼻涕、坠床、头部外伤、感冒发烧、噪音和情绪波动等引起的颅内压增高诱发的耳聋。当患者为 *SLC26A4* 杂合突变, 患者无明显耳聋表现或病情较轻^[13]。

mtDNA 是药物致聋又叫“一针致聋”的易感载体, 遗传方式为母系遗传。本研究中 mtDNA 突变占 0.64% (8/1 242), 高于相关文献报道的 0.34% 和 0.22%^[8-9]。当患者 mtDNA 出现均质突变、异质突变或复合杂合突变时, 患者听力损失程度从正常到极重度都有可能, 且大部分先证者都有明确的正常剂量氨基糖甙类抗生素应用史。患者使用氨基糖甙类药物会导致或加速重度耳聋的发生, 表现为迟发性听力下降^[14-15]。此类患者及其母系成员应当终身禁用链霉素、卡那霉素、庆大霉素、小诺霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、妥布霉素、大观霉素、威地霉素、西索米星、阿司米星、奈替米星、核糖霉素、依克沙、小儿利宝等氨基糖甙类药物。对其进行用药指导可以有效避免药物性耳聋的发生, 具有极好的预防效果^[16]。

GJB3 基因可以引起常染色体显性或隐性遗传性非综合征型耳聋, 临床表现为后天迟发性感音神经性耳聋, 患者青少年时期听力正常, 当发育至青壮年时, 听力逐渐下降, 导致不同程度的耳聋。在我国各地研究中发现 *GJB3* 基因突变的发生率较低^[17], 本研究中 *GJB3* 基因突变也仅占 0.16% (2/1 242)。

我国因聋致哑问题突出, 给聋哑人及其家庭带来了巨大的痛苦和沉重的负担, 传统的听力筛查局限于听力下降的检查, 开展新生儿耳聋基因筛查是预防因遗传因素引发的迟发性耳聋和药物性耳聋的有效措施。针对耳聋高危人群开展产前诊断和遗传咨

询^[18-19], 有效降低耳聋出生缺陷。

参考文献

- [1] Yao GD, Li SX, Chen DL, et al. Combination of hearing screening and genetic screening for deafness susceptibility genes in newborns[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(1): 218-222.
- [2] Abed AB, Saad H, Mustpha R, et al. Early hearing screening by otoacoustic emissions and auditory brain stem response in Nabeul[J]. Tunis Med, 2013, 91(11): 643-647.
- [3] 孙雪晶, 席作明, 张静, 等. 11 046 名新生儿听力与聋病易感基因联合筛查结果分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(6): 766-770.
- [4] 丁珂珂, 尹爱华. 非综合征遗传性耳聋的基因诊断进展[J]. 中国产前诊断杂志, 2015, 7(1): 48-53.
- [5] Roshan M, Kabekkodu SP, Vijaya PH, et al. Analysis of mitochondrial DNA variations in Indian patients with congenital cataract[J]. Mol Vis, 2012, 18: 181-193.
- [6] Chen J, Yuan H, Lu J, et al. Mutations at position 7,445 in the precursor of mitochondrial *tRNA*^{Ser(UCN)} gene in three maternal Chinese pedigrees with sensorineural hearing loss[J]. Mitochondrion, 2008, 8(4): 285-292.
- [7] 蓝培基, 陈亚军, 刘毅, 等. 2014 年韶关市 328 例新生儿 *GJB2*、*SLC26A4* (PDS)、*GJB3*、*MT-RNR1* (12SrRNA) 耳聋基因突变调查[J]. 实用预防医学, 2016, 23(7): 829-831.
- [8] 孙晓勉, 陆洋, 黄旭丽. 深圳市福田区新生儿听力及耳聋基因联合筛查分析[J]. 中国妇幼保健研究, 2015, 26(6): 1119-1121.
- [9] 熊怡, 钟梅, 李欣, 等. 中山市新生儿听力筛查联合耳聋基因检测结果分析[J]. 产与遗传(电子版), 2016, 6(1): 25-29.
- [10] 张祥, 刘世国, 王艺霖, 等. 基因芯片在非综合征型耳聋基因突变中的应用[J]. 医学检验与临床, 2017, 28(1): 35-37.
- [11] 项延包, 李焕铮, 徐雪琴, 等. 12 个前庭导水管扩大耳聋家系的致病基因分析及产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志, 2017, 34(3): 336-341.
- [12] 刘闽, 胥亮, 刘水霞, 等. 广西地区 222 例感音神经性聋患者常见耳聋基因筛查结果分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2017, 25(1): 5-8.
- [13] 王世媛, 孙晓勉, 陆洋, 等. 新生儿听力与聋病易感基因联合筛查模式探讨[J]. 中国妇幼保健研究, 2017, 28(2): 156-159.
- [14] 王芳, 刘星辰, 郭玉芬. 线粒体 DNA 突变与遗传性聋[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(4): 405-409.
- [15] 徐彬, 余元勋, 王迎新, 等. 安徽省汉族人氨基糖苷类抗生素致耳聋患者基因突变的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(11): 1653-1657.
- [16] 杨雪, 吴忠琴, 朱晓西, 等. 线粒体遗传性耳聋一家系[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(48): 3912-3913.
- [17] 李彦琼, 刘德胜, 吕超绍, 等. 云南 337 名非综合征型聋患者 *GJB3* 基因 C538T 和 G547A 突变分析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(12): 2024-2029.
- [18] 任淑敏, 吴庆华, 刘宁, 等. 遗传性耳聋家系的产前诊断及遗传咨询[J]. 中国产前诊断杂志, 2016, 8(1): 26-29.
- [19] 李红娟, 王雅莉, 杨艳. 1 024 例新生儿耳聋易感基因携带情况调查[J]. 实用预防医学, 2018, 25(1): 87-89. 收稿日期: 2017-12-13