论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1450-03

非综合征性耳聋儿童 GJB2 235delC 及线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 突变分析

王 冰,姚红兵,徐 洁,周 媛,汪 武 (重庆医科大学附属儿童医院耳鼻咽喉科,重庆 400014)

摘 要:目的 对耳聋患儿进行 GJB2 基因、线粒体 DNA A1555G 位点突变检测,为遗传性耳聋提供诊断依据。**方法** 对 195 例耳聋患儿进行遗传性耳聋问卷调查、全面的体格检查、耳鼻咽喉专科检查以及听力学评估(包括纯音测听、脑干诱发电位和耳声发射)。对 195 例非综合征性感音神经性耳聋患儿及 100 例健康对照个体分别进行 GJB2 基因 235delC 突变、线粒体 DNA 12S rRNA 基因 A1555G 点突变的限制性内切酶分析。**结果** 195 例患儿者中发现 GJB2 基因 235delC 纯合突变、235delC 与 176 – 191del16 复合及 235delC 与 299 – 300delAT 复合突变等共 46 例耳聋患儿与 GJB2 基因突变有关,占 23.58%。病患组 235delC 等位基因频率为 18.44%,对照组为 2.00%($P<0.01$)。同时在患儿组还发现了 7 例线粒体 DNA A1555G 突变,对照组未发现线粒体 DNA A1555G 突变。**结论** 重庆市非综合征型耳聋患儿存在较高的 GJB2 基因 235delC 和线粒体 DNA 12S rRNA 基因 A1555G 突变发生率,高于全国平均水平。耳聋基因诊断技术可以应用在地区性耳聋病因调查中有重要的意义。对基因型-表现型相关性的研究对遗传性耳聋的治疗及预期疗效判断、遗传咨询、产前诊断等具有重要意义。

关键词: 耳聋;GJB2 基因; 线粒体 DNA;突变分析

中图法分类号: Q754; R394.1; R764.43 **文献标识码**: A

Screening of GJB2 235delC mutation and mtDNA 12S rRNA A1555G mutation in Chongqing children with non-syndromic hearing impairment

WANG Bing, YAO Hong-bing, XU Jie, ZHOU Yuan, WANG Wu (Department of Otorhinolaryngology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To detect the mutations of GJB2 and mtDNA A1555G in Chongqing children with hereditary hearing loss. Methods Totally 195 deaf children were included to identify their medical history of hearing loss, use of aminoglycosides, and other clinical abnormalities through filling a questionnaire by their parents, with 100 normal children as control. The audiological and neurological examinations of these children were conducted, including otoscopy, pure-tone audiometry, acoustic brainstem evoked response (ABR) and otoacoustic emission. GJB2 gene 235delC mutation and mtDNA A1555G mutation were detected with specific restriction enzyme digestion. Results Homozygous deletion C at position 233 – 235 of GJB2 (235delC) resulted in frameshift mutation. GJB2 gene mutations were found in 46 patients (23.58%) with hereditary hearing loss. The allelic frequency of 235delC allele was 18.44% in the hearing loss children and 2.00% in the control children ($P<0.01$). Seven hearing loss children were found to carry mtDNAA1555G mutation. Conclusion The incidence of GJB2 gene and mtDNA A1555G mutations among the deaf-mute children in Chongqing is higher than the average level of overall Chinese deaf population. Molecular genetic screening for these mutations is effective method to prevent the occurrence of hereditary hearing loss.

Key words: hearing loss; GJB2 gene; mitochondrial DNA; mutation analysis

---

基金项目:重庆市卫生局课题(07-02-171)

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (07-02-171)

作者简介:王 冰,男,四川省自贡市人,硕士,主治医师,主要从事小儿聋病的临床医学诊断治疗及分子遗传机制基础方面的研究,发表论文 9 篇。电话:(023)61631860,E-mail:grafwb@163.com

通信作者:姚红兵,E-mail: yaohongbing@163.net

收稿日期:2008-09-20;**修回日期**:2008-10-15

重度耳聋在新生儿中发生率高达 1/800 ~ 1/1 000。造成耳聋有多方面的原因,遗传因素是最主要的,60% 的耳聋是由遗传缺陷引起的。其中综合征型耳聋(syndromic hearing impairment,SHI)约占 30%,另外 70% 为非综合征型(non-syndromic hearing impairment,NSHI)[1]。GJB2 基因异常被公认为遗传性耳聋最常见的病因,能导致常染色体显性和隐性非综合征耳聋,约占遗传性非综合征耳聋的 50%[2]。线粒体 12S rRNA A1555G 点突变与氨基糖甙类抗生素致聋有密切的相关性。我院近年来对重庆市非综合征性耳聋患儿进行了耳聋分子流行病学调查。探索重庆市特教学校的非综合征性耳聋患儿中 GJB2 和线粒体 DNA 12S rRNA 基因突变致聋的分子机制,了解 GJB2 和线粒体 DNA 12S rRNA 基因在重庆市非综合征性耳聋患儿中的突变情况。

1　资料与方法

1.1　研究对象

收集 2006 年 9 月至 2008 年 5 月本科门诊 195 例散发非综合征型耳聋患儿组成病患组,其中男性 136 例,女性 59 例;年龄 2 个月至 16 岁。语前聋 125 例,语后聋 70 例。均为双耳听力下降。病史资料采集由患儿家长填写问卷式调查表获取耳聋的相关信息,包括聋儿的一般信息、出生史、耳聋发病时间、家族史、个人史(聋前传染病史、耳毒性药物应用情况、头部外伤史等)、患儿母亲孕期情况、体格检查(全身及专科检查)等。所有受检者纯音测听及 ABR 均提示双侧重度至极重度感音神经性聋。耳声发射均未通过。对照组 100 例,选自本科听力检测正常的重庆市儿童,年龄 5 个月至 16 岁。

1.2　DNA 提取方法

采集受检者外周血 3 ~ 5 ml ,应用试剂盒提取 DNA(上海华舜生物工程有限公司),提取步骤参照试剂盒提供的使用说明进行。取适量提取 DNA 用紫外分光光度计进行定量和纯度检测,其余保存于 -70 ℃备用。

1.3　PCR 扩增及限制性内切酶分析

GJB2 基因,以 FN1(序列 5′-TTGGTGTTTGCTCAGGAAGA-3′)及 R3C(序列 5′-GGCCTACAGGGGTTTCAAAT-3′)为 PCR 反应扩增引物。应用 *Apa* Ⅰ限制性内切酶酶切法检测 GJB2 基因 235delC 突变,具体方法见文献[3]。线粒体 A1555G 基因,以 mtF(序列:5′-GCAGTAAACTAAGAGTAGAGT-3′)及 mtR(序列:5′-GGCTCTCCTTGCAAAGTTAT-3′)为 PCR 反应扩增引物,扩增条件及测序延伸反应条件参见文献[4]。

1.4　统计学方法

运用 χ^2 检验聋儿及听力正常者间 GJB2 基因致病突变染色体携带率的差别,组间比较通过校正 χ^2 检验完成,校正的 α' 为 0.012 5。采用 SPSS 12.0 统计软件完成。

2　结果

2.1　GJB2 基因突变分析

195 例患儿者中 235delC 突变共 46 例,占 23.58%(46/195);其中纯合突变 31 例,杂合突变 15 例,235delC 等位基因频率为 28.21%(55/195)。上述杂合突变中 235delC 合并 176 - 191del16 突变 7 例;235delC 299 - 300delAT 复合突变 15 例;235delC 突变合并 427C > T 多态性改变 3 例;2 例 235delC 杂合突变不伴有其他 GJB2 序列变化。对照组中未发现 235delC 纯合突变;有 4 例 235delC 杂合突变携带者;等位基因突变频率 2.00%(4/200),与患儿组 235delC 等位基因频率有显著性差异($P < 0.01$)。

2.2　线粒体 DNA A1555G 突变

195 例患儿者中 PCR 产物经酶切检测,7 例阳性,突变率为 3.59%。对照组未发现阳性。7 例阳性患儿,其中 5 例为语后聋,4 例有庆大霉素应用史,1 例有链霉素应用史,具体用药量不详。2 例无家族史,3 例有家族史。2 例为语前聋,其中 1 例庆大霉素应用史,1 例无明确氨基糖苷类抗生素用药史,无明确家族史。对照组 100 例中未发现 A1555G 突变。

3　讨论

耳聋是最为常见的感觉损害,在新生儿中的发病率约为 1/500 ~ 1/650[5]。约有一半的耳聋是遗传性的,遗传性耳聋中很大一部分为非综合征型耳聋(non-syndromic hearing loss,NSHL),其中常染色体隐性遗传性非综合征型聋(autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, ARNSHL)占 NSHL 的 80%,其特点是除了听力下降外没有其他疾病特征[6]。GJB2 基因相关表型主要和 ARNSHL 有关,多达 50% 的 ARNSHL 是由于 GJB2 基因突变引起的。

GJB2 基因编码的 Cx26 属于缝隙连结蛋白基因家族,与相邻细胞的缝隙连结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,是完成电解质、第二信使和代谢产物的细胞间转换的重要通道[7]。GJB2 基因突变后,使钾离子回流进入内淋巴的循环受到影响,导致感音神经性聋。致聋原因可能是 GJB2 基因编码区的突变导致蛋白质翻译过程中的移码突变,产生无功能的蛋白质,影响缝隙连接蛋白的结构,从而影响通道的正常开闭。由于连接通道的异常,使钾离子回流进入内淋巴液的循环受到影响,浓度发生异常改变,达到一定浓度会导致钾中毒,进而可导致感音神经性聋,而且大多数人表现为先天性聋。GJB2 基因突变中, GJB2 235delC 是中国人 NSHI 患者中的主要突变方式[8]。在中国人中,GJB2

基因突变检出率高达21.01%,GJB2基因相关性耳聋(双等位基因突变)有14.96%[9]。调查结果显示在重庆市GJB2基因235delC突变相关的非综合症型耳聋的发病率高达24.99%,其中纯合突变占10.93%,杂合突变占14.06%,根据双等位基因突变致聋的模式,可以确定纯合突变是耳聋的病因。解放军总医院的全国性耳聋分子病因学研究的数据表明,多数GJB2基因235delC杂合突变能够通过测序发现GJB2基因上的第二个突变,携带GJB2基因235delC杂合突变强烈提示耳聋发病的遗传因素。因此对GJB2 235delC突变的检测对进行产前诊断,避免同样耳聋患儿的出生,有重要的意义。

因GJB2基因相关耳聋患者的螺旋神经节细胞数量正常,通过基因诊断明确的GJB2耳聋可以排除其他神经系统疾病,提示耳蜗神经和听觉中枢的完整性适合人工耳蜗植入,该类患者在耳蜗植入后言语理解能力强,预后良好,故确定GJB2基因突变致聋对治疗和预后有重要意义。

1993年Prezant等首次确定mtDNA 12S rRNA基因A1555G突变是与非综合征型耳聋有关的线粒体。在我国大规模的耳聋基因筛查中,证实DNA A1555G突变为一基因热点突变,是最常见的引起药物性耳聋的突变[10]。线粒体DNA 12S rRNA基因突变引起的耳聋多表现为后天性。研究证实,携带线粒体DNA 12S rRNA A1555G点突变的个体对氨基糖甙类抗生素耳毒性具有高度的敏感性。应用单次剂量即可导致携带此突变个体的重度听力损失,且不可逆转。因此发现患儿有明确氨基糖苷类抗生素接触史、家族史且有母系遗传倾向的病例,可首选mtDNAA1555G检测;而且对于有家族遗传倾向且筛查结果阳性的个体、避免其应用氨基糖甙类抗生素是预防及减少此类耳聋发生的关键。此外,线粒体DNAA1555G突变在致聋方面还可以自发起作用,患者在没有使用氨基糖甙类抗生素的情况下也会致聋,早期筛查可以指导早期干预。

GJB2基因型相关表型表现形式多种多样,呈现高度的异质性。尽管GJB2基因相关的听力学研究取得了很大进展,仍然有一些疑问需要解决,如是否能由表型来预测基因型,如何解释GJB2致聋等位基因携带者的听力损失不同的差异,GJB2所致的迟发性听力损失的原因,这些均需要多中心的研究来查明一些少见突变的表型特点。这需要全体耳科学同仁共同努力来完成。同时由于线粒体遗传为母系遗传,每一个mtDNA 12S rRNA基因A1555G突变的先证者都有10~12名未发病的母系家庭成员,并且会持续出现携带致病突变的后代,因此,对这些人进行基因筛查,使其本人和后代避免应用耳毒性药物,这对防聋有重要的意义。我们也可看出,仅凭用药史作出药物性聋的临床诊断是不够准确的。在临床上开展mtDNA 12S rRNA基因A1555G突变的普查,进行用药前指导将是非常重要的。

参考文献:

[1] Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans [J]. Br Med Bull,2002, 63:73-94.

[2] Porceddu S V, Jarmolowski E, Hicks R J, *et al*. Utility of positron emission tomography for the detection of disease in residual neck nodes after (chemo) radiotherapy in head and neck cancer [J]. Head Neck, 2005, 27(3):175 - 181.

[3] 戴 朴,杨伟炎,韩东一,等. Prev-DAF试剂盒分析线粒体基因1555A-G突变[J].中华耳科学杂志,2004,2(1):37-41.

[4] 戴 朴, 于 飞, 康东洋, 等. 线粒体DNA1555位点和GJB2基因及SLC26A4基因的诊断方法及临床应用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(10): 769 - 773.

[5] Mehl A L, Thomson V. Newborn hearing screening: the great omission [J]. Pediatrics, 1998, 101(1): E4.

[6] Mehl A L, 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.

[7] Smith R J, Bale J F Jr., White K R. Sensorineural hearing loss in children[J]. Lancet, 2005, 365 (9462): 879-890.

[8] Todt I, Hennies H C, Basta D, *et al*. Vestibular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26 [J]. Neuroreport, 2005, 16 (11):1179 - 1181.

[9] 徐悦凡, 任鲁风, 宋文芹, 等. 中国人非综合征型听力损失患者Cx26基因的突变分析[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2002, 37(5): 348-351.

[10] 刘 新,戴 朴,黄德亮,等.线粒体DNA A1555G突变大规模筛查及其预防意义探讨[J].中华医学杂志,2006,86(19):1318-1322.

(编辑 栾 嘉)