

## 36 例遗传性耳聋的产前诊断分析

李玲 麦明琴 曾玉坤 饶腾子 丁红珂 刘玲

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 510010)

**【摘要】 目的** 通过超声引导下介入性穿刺术获取胎儿附属物标本进行遗传性耳聋基因产前诊断,降低遗传性耳聋患儿的出生率。**方法** 孕 11~14 周孕妇采用超声引导下绒毛活检术抽取胎盘绒毛;孕 16 周后孕妇在超声引导下抽取羊水;孕 25 周以上因有其他项目需同时产前诊断的,则在超声引导下抽取脐血。应用短串重复序列连锁分析(STR)进行母血污染鉴别,遗传性耳聋基因芯片检测技术对 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 mtDNA12SrRNA 4 个耳聋基因进行测序。**结果** 36 例产前介入性穿刺术均一次成功。36 例标本经 STR 鉴定均排除母血污染。7 例未检测到明确耳聋基因突变;16 例为耳聋基因杂合突变,3 例为耳聋基因杂合突变伴多态性位点突变,已出生的,生后随访新生儿听力筛查结果均正常;10 例为耳聋基因双重杂合突变,经遗传咨询后,孕妇及家人选择终止妊娠。**结论** 超声引导下介入性穿刺术是进行遗传性耳聋基因产前诊断获取胎儿附属物标本的有效途径。联合耳聋基因芯片检测技术及 STR 检测,可排除母血污染,准确诊断胎儿遗传性耳聋基因型,有效降低遗传性耳聋患儿的出生率。

**【关键词】** 遗传性耳聋;介入性穿刺术;产前诊断

**【中图分类号】** R714.53 **【文献标识码】** A

**【Abstract】 Objective** Prenatal diagnosis tests were performed under the guidance of ultrasound by chorionic villus sampling, amniocentesis and cordocentesis, all the fetal samplings were sent to detect the hereditary deafness genes in order to reduce the deafness birth defects. **Method** Chorionic villus sampling in gestation of 11~14 weeks, amniotic fluid by amniocentesis after 16 weeks in gestation, umbilical cord blood sampling after 25 weeks together with other prenatal diagnosis index. Sequencing the four hereditary deafness-related genes GJB2, GJB3, SLC26A4 and mtDNA12SrRNA, all the samples were excluded the maternal blood contamination by short tandem repeat test (STR). **Results** In 36 cases, no definite deafness-related gene mutation in 7 cases, 16 cases were found heterozygous, heterozygous with polymorphism were found in 3 cases, and double heterozygous in 10 cases. **Conclusions** Prenatal diagnosis procedure under ultrasonic guidance is a safe and effective way in hereditary deafness detection. Combining with the technique of deafness-related gene sequencing and STR, fetus with double heterozygous were diagnosed, then genetic consulting were offered to the parents to considering the baby's outcome. In that way, the birth rate of hereditary deafness can be reduced.

**【Key words】** hereditary deafness; interventional procedure; prenatal diagnosis

耳聋是人类最常见的致残原因之一,严重影响着人类的生活质量并带来沉重的社会及家庭经济负担。据估算,我国每年约有 2000 万的新生儿出生,而耳聋的发生率可达 1‰,其中至少约 60%~70%

与遗传因素有关<sup>[1,2]</sup>,即遗传性耳聋。它包括综合征性耳聋及非综合征性耳聋,非综合征性耳聋占遗传性耳聋的 70%,其中的 77%为常染色体隐性遗传。人类遗传学研究的开展和基因芯片等遗传学应用技术的进步,极大地推进了临床上遗传性耳聋的

基因诊断和遗传咨询。研究表明,在中国人群中,遗传性耳聋的主要致病基因包括 GJB2、GJB3、SLC26A4 和 mtDNA12SrRNA,其遗传方式为常染色体隐性遗传<sup>[3,4]</sup>,通过热点突变基因的筛查可以实现遗传性耳聋的早防早治。对有明确遗传学病因和遗传风险的耳聋家庭,选择产前诊断技术可有效避免遗传性耳聋儿的出生,切实降低出生缺陷。本院医学遗传中心在 2011 年 3 月至 2014 年 2 月期间,共为 36 个胎儿进行了适宜的产前诊断,现分析及总结如下。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 2011 年 3 月至 2014 年 2 月 32 例在广东省妇幼保健院医学遗传中心行胎儿耳聋基因产前诊断的孕妇。22 例孕妇曾生育过遗传性耳聋患儿,先证者均已行耳聋基因确诊,同时检测出夫妇双方均为耳聋基因携带者;14 例孕妇为孕检或婚检时耳聋基因筛查为耳聋基因携带者,随后配偶已诊断为耳聋基因携带者。

### 1.2 方法与仪器

1.2.1 超声引导下介入性穿刺术 36 例孕妇均行超声检查,排除无脑儿、严重胸腹壁裂、开放性脊柱裂、单心室等致死性畸形及明显的胎儿结构异常,并完善常规穿刺前检查。手术时,在超声定位下,选择安全及适宜位置进针。6 例孕 11~14 周胎儿,采用 18G 一次性 PTCD 针绒毛活检术抽取胎盘绒毛 10 mg;25 例孕 16~24<sup>+</sup> 周胎儿,采用 20G 一次性 PTCD 针抽取羊水 10 ml;5 例孕 25 周以上胎儿,夫妇双方均为耳聋基因携带者,同时因超声提示胎儿异常需行产前诊断,采用 22G 一次性 PTCD 针抽取脐血 3 ml。术后观察胎心,孕妇术后在休息室休息半小时,无异常后离院。术后定期复诊及随访。所有行产前诊断的孕妇均签署介入性产前诊断及耳聋基因诊断知情同意书。

1.2.2 STR 鉴别母血污染 采用 QT PCR 技术,ABI 公司 3500XL system,在测序仪上对母亲及胎儿的 26 个 STR 位点(AMEI、DXS981、DYS448、D21S1412、D13S256、DXYS267 等)进行测定,然后利用软件自动分析等位基因的基因型。

1.2.3 基因检测 采用厦门致善试剂盒提取绒毛、羊水、脐血 DNA,测量 DNA 浓度计纯度,DNA 浓度为 100~200 ng/ $\mu$ l,纯度 OD<sub>260/280</sub> 在 1.7~2.0 之间。将 DNA 加入反应体系中进行 PCR 扩增,扩增体系见表 1,反应条件见表 2。按照 8  $\mu$ l 杂交缓冲液、4  $\mu$ l A 体系 PCR 产物、4  $\mu$ l B 体系 PCR 产物的比例配制杂交溶液。按照杂交盒、垫片、芯片、盖片的顺序装配好杂交反应盒。运行遗传性耳聋基因检测芯片杂交程序,杂交条件为 50 °C 杂交 1.5 小时,速度为 15 rpm。反应结束后进行芯片洗涤。使用奥博基因芯片扫描仪进行芯片扫描,记录判读结果和芯片信息。

表 1 基因扩增体系表

反应物	体积( $\mu$ l)
A1 扩增引物混合物	12.5
A2 扩增试剂混合物	4.5
核酸模板	3
总计	20

表 2 遗传性耳聋基因检测 PCR 扩增条件

温度(°C)	37	95	96	94	RAMP	55	RAMP	70	60	4
时间(秒)	600	900	60	30	0.4 °C/秒	30	0.2 °C/秒	45	600	—
循环数	1	1	1			32			1	1

## 2 结果

2.1 36 例行介入性产前诊断孕妇均无感染、流产、早产、胎儿宫内窘迫等并发症。经 STR 鉴别,36 例全部排除母血污染。

2.2 36 例遗传性耳聋基因产前诊断结果中,7 例未检测到明确突变,随访新生儿听力筛查结果未见异常。7 例 GJB2 基因 109 杂合突变;7 例 GJB2 基因 235. del. c 杂合突变;2 例 SLC26A4 基因 IVS 7-2 A >G 杂合突变;1 例 SLC26A4 基因 IVS7-2A >G, GJB2 基因 c. 608. T > C 杂合;1 例 GJB2 基因 235. del. c 杂合突变, GJB2 c. 79G > A, c. 341A > G; 1 例 GJB2 基因 235. del. c 杂合突变, 79G > A 杂合(多态), 22 例随访新生儿听力筛查结果均未见异常, 4 例未出生。10 例双重杂合突变: 包括 6 例 GJB2 基因 109 G > A / 235 del C 双重杂合突变, 1 例 GJB2 基因 109 G > A / c. 250 G > A 双重杂合突

变,1 例 GJB2 基因 235 del C/c.176 del 16bp 双重杂合突变;1 例 SLC26A4 基因 c.1343 C>T/c.2086 C>T 双重杂合突变,均与先证者基因型一致;1 例 SLC26A4 基因 IVS 7-2 A>G/754 T>C 双重杂合突变。10 例随访结果孕妇均已选择终止妊娠。

### 3 讨 论

耳聋是影响我国出生人口素质的重要问题之一,目前临床上对遗传性耳聋缺乏有效的治疗手段。患儿往往需要使用辅助听力器械协助,部分患儿因未能及时诊治而影响生活与学习,并且可能对家庭造成较大经济负担。因此,遗传性耳聋的产前诊断在耳聋出生缺陷的防治工作中具有重要意义。遗传性耳聋产前诊断是应用耳聋基因测序技术了解胎儿携带耳聋基因的情况,从而做出是否为遗传性耳聋的诊断。目前研究发现我国人群遗传性耳聋的最常见的致病基因为 GJB2、GJB3、SLC26A4 和线粒体 12SrRNA,基因突变是中国人群中常见的致病原因,通过对热点突变的筛查可以实现遗传性耳聋的产前预防。我们通过超声引导下在胎盘上抽取绒毛组织、羊膜腔穿刺抽取羊水、脐带穿刺抽取脐血等微创性取样方法,提取胎儿 DNA 进行耳聋基因测序,获取胎儿耳聋基因的遗传信息。为了排除行产前诊断过程中母体 DNA 的影响,结合运用 STR 位点分析方法以排除母血污染。

3.1 GJB2 与遗传性耳聋 GJB2 是最常见的耳聋基因。GJB2 编码连接蛋白(connexin26),负责细胞间信号介导和离子传递,突变的 GJB2 可能导致产生不正常的连接蛋白,进而干扰细胞间隙连接的功能,引起内耳钾离子回收障碍而致聋。研究表明到目前为止已发现 GJB2 基因 110 余种突变方式,GJB2 突变导致的遗传性耳聋几乎遍布欧洲、美洲、亚洲等地,在不同人种间存在不同的 GJB2 基因突变及发生频率<sup>[5]</sup>。在我们的研究中,未检测到 GJB2 基因的纯合性突变。而发现 7 例 GJB2 基因 109 G>A 杂合突变,7 例 GJB2 基因 235. del. c 杂合突变,1 例 GJB2 基因 235. del. c 杂合突变合并 GJB2 c.79G>A、c.341A>G 突变,这 7 例孕妇均顺利分娩,随访结果显示,婴儿听力测试正常。发现的 6 例

GJB2 基因 235 del C 杂合突变伴 109 G>A 杂合突变,1 例 GJB2 基因 109 G>A 杂合突变伴 c.250 G>A 杂合突变,1 例 GJB2 基因 235 del C 杂合突变伴 c.176 del 16 bp 杂合突变,因胎儿患耳聋风险增加,回访显示孕妇均选择终止妊娠。有研究显示不仅致病突变的纯合性突变可以致聋,而且不同的两个致病突变形成复合杂合突变时也可致聋,临床表现为中重度耳聋,双耳多呈对称性,前庭功能基本正常,但在少数病例也存在临床表型的异质性。Wilcox SA 等<sup>[6]</sup>研究发现 109G>A 纯合和复合杂合突变和耳聋有关。陈帼玲等<sup>[7]</sup>在一项包括 233 名耳聋患者及 83 名患者直系亲属、100 名听力正常志愿者的研究发现,耳聋患者组中共发现 4 例 109 G>A 杂合突变伴 c.235 del C 杂合突变,而家属组和对照组中未发现此类型突变。250 G>A 突变是近年发现的一个致病位点,目前研究甚少,在国内尚未见报道。Matos 等<sup>[8]</sup>在一位葡萄牙女性耳聋患者的家系研究发现,-3438C-T 和 250G-A 突变为复合杂合子后会引引起亮氨酸变成蛋氨酸,从而导致耳聋的出现。这些研究结果提示了会导致听力障碍的复合突变,其突变位点之间可能存在内部修饰效应,也可能是由不同基因之间的相互影响造成。

### 3.2 SLC26A4(又称 PDS 基因)与遗传性耳聋

SLC26A4 基因编码 Pendrin 蛋白,研究表明 Pendrin 功能与离子和蔗糖转运有关<sup>[9,10]</sup>。有分析表明 95%~97% 的中国大前庭水管患者中至少可以发现一个 SLC26A4 基因突变,并且大多数患者可以发现纯合或复合突变,显示大前庭水管综合征的发病原因是 SLC26A4 基因突变<sup>[11]</sup>。在我们的研究中,发现 2 例 SLC26A4 基因 IVS 7-2 A>G 杂合突变,1 例 SLC26A4 基因 IVS7-2A>G/GJB2 基因 c.608. T>C 杂合,这 3 例孕妇均顺利分娩,回访结果显示婴儿听力测试正常。1 例 SLC26A4 基因 c.1343 C>T 杂合/c.2086 C>T 杂合,与先证者基因型一致,1 例 SLC26A4 基因 IVS 7-2 A>G 杂合突变/754 T>C 杂合突变,因胎儿患耳聋风险增加,回访显示孕妇均选择终止妊娠。754T>C 位点目前在国内外报道较少,冯永等<sup>[12]</sup>在一项家系研究中发现患耳聋的先证者为 1229C>T、754T>C 的复合

杂合突变,1229C>T来自其表型正常的父亲,754T>C来自其表型正常的母亲,与国外报道一致<sup>[13,14]</sup>。c. 2086 C>T(又称 Q696X)是第18号外显子2086位点的胞嘧啶突变为胸腺嘧啶,导致合成蛋白质时696位上的谷氨酸改变为终止密码,从而使蛋白的翻译提前终止<sup>[15]</sup>。胡鹏等<sup>[16]</sup>在一项研究中发现该突变的先证者为2086 C>T和IVS7-2A>G复合杂合突变,表现为前庭水管扩大伴极重度聋,其父母基因型分别为2086 C>T和IVS7-2A>G的单杂合子,听力正常。进一步对100例正常人DNA样本18号外显子进行PCR扩增并测序,未检测出相同突变,故认为c. 2086 C>T是一个新的致聋突变。沈姗姗等<sup>[17]</sup>对29个耳聋家系的42例耳聋患者及父母进行SLC26A4基因测序,结果显示IVS7-2A>G纯合性突变患者为极重度感音神经性耳聋,当中有两家系患者发生IVS7-2A>G杂合性突变,其中一家系患者伴随T410M杂合性突变表现为极重度感音神经性耳聋,另一家系未伴随其他突变,则听力正常。袁永一等<sup>[18]</sup>在一项人群研究中对SLC26A4基因IVS7-2 A>G突变相关的全序列分析,这项研究包括1552例聋哑学生和150例听力正常的对照组群,研究中显示1552例耳聋患者中IVS7-2A>G纯合突变及包含一个IVS7-2A>G突变的复合杂合突变携带者共161例,占10.37%,正常对照人群IVS7-2 A>G突变检出率为2%,均为单杂合突变,且均未找到另一个突变位点。事实上,携带SLC26A4单等位基因突变的耳聋患者中有一定比例也表现为不同程度听力障碍<sup>[19]</sup>,其原因在于另外的突变可能位于非外显子区域,通过现有方法尚不能检测出来。

在遗传咨询及产前诊断的过程中,我们发现充分地告知与知情选择尤为重要。大力进行遗传性耳聋相关知识的宣教是开展耳聋基因筛查的前提,在广大孕龄妇女及产检孕妇当中进行筛查是避免漏诊的关键,对有指征的胎儿适时行产前诊断是降低患儿出生的重点。

遗传性耳聋的产前诊断目前还有许多需改进的方面。首先,由于人类基因组的复杂性及耳聋基因的高度遗传异质性、检测费用昂贵等原因,临床上仅

对常见致病基因进行检测,其结论存在一定的局限性,对准确诊断及预防带来了一定的困难;其次,部分突变位点在不同人群研究中得出的结论并不一致,为产前诊断的指导带来一定困惑,尤其是对相互影响的复合突变位点的风险预测,更需要进一步深入的关联研究及生物功能学研究,以进一步阐明其具体致病机制。随着遗传学和无创性产前诊断技术的进步,我们相信遗传性耳聋的产前诊断在降低我国出生缺陷率的工作中将发挥着重要的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] 第二次全国残疾人抽样调查办公室. 第二次全国残疾人抽样调查主要数据手册[M]. 北京:华夏出版社,2007.
- [2] Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(9): 1605-1609.
- [3] 韩明显,戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展[J]. 北京医学, 2011, 33(5): 419-421.
- [4] Lu Y, Dai D, Chen Z, et al. Molecular screening of patients with nonsyndromic hearing loss from Nanjing city of China [J]. J Biomed Res, 2011, 25(5): 309-318.
- [5] Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(9): 1605-1609.
- [6] Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, et al. High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene[J]. Hum Genet, 2000, 106(4): 399-405.
- [7] 陈帼玲. 中国散发感音神经性聋患者 GJB2 基因突变的筛查分析[D]. 复旦大学, 2010.
- [8] Matos TD, Caria H, Simões-Teixeira H, et al. A novel hearing-loss-related mutation occurring in the GJB2 basal promoter[J]. J Med Genet, 2007, 44(11): 721-725.
- [9] 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.
- [10] Scott DA, Wang R, Kreman TM, et al. Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4) [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9

- (11):1709-1715.
- [11] 戴朴,韩东一,冯勃,等. 大前庭水管综合征的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2006, 13:303-307
- [12] 冯永,胡杰,夏昆,等. 前庭水管扩大患者人工耳蜗植入及 SLC26A4 基因的突变分析[J]. 中华耳科学杂志,2007,5: 14-17.
- [13] Kitamura K,Takahashi K,Noguehi Y,et al. Mutations of the Pendred syndrome gene(PDS)in patients with large vestibular aqueduct[J]. Acta Otolaryngol,2000,120(2):137-141.
- [14] Reardon W,OMahoney CF,Trembath R,et al. Enlarged vestibular aqueduct;a radiological marker of pendred syndrome, andmutation ofthe PDS gene[J]. QJM,2000,93(2):99-104.
- [15] Huang S, Han D, Yuan Y, et al. Extremely discrepant mutation spectrum of SLC26A4 between Chinese patients with isolated Mondini deformityand enlarged vestibular aqueduct [J]. J Transl Med,2011,9:167.
- [16] 胡鹏,邓忠,谭东辉,等. 湖南郴州非综合征型聋患者 GJB2、SLC26A4 和线粒体 DNA12SrRNA 基因突变分析[J]. 听力学及言语疾病杂志,2012,20: 12-16.
- [17] 沈姗姗,徐志勇,刘明,等. 遗传性耳聋患者的 SLC26A4 基因热点突变检测[J]. 中国妇幼保健,2011,26:2647-2649.
- [18] 袁永一,戴朴,朱庆文,等. 1552 例重度感音神经性聋患者与 SLC26A4 基因 IVS7-2 A>G 突变相关的全序列分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科,2009,44(6),449-454.
- [19] 袁永一,戴朴,黄德亮,等. 内蒙古赤峰市聋校聋儿患者 SLC26A4 基因分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科,2007,14: 251-256.

(收稿日期:2014-10-19)

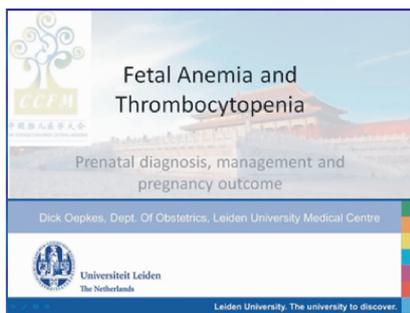
编辑:宋文颖

· 视频导读 ·

## 胎儿贫血与血小板减少的产前诊断、处理及妊娠结局

Dick Oepkes

(荷兰莱顿大学医学中心 产科)



据现今数据表明,约有 1%~2%的妊娠期妇女感染人类细小病毒 B19 (hParvo-B19),其中约有 30%~50%会通过垂直传播感染胎儿,其后果可造成胎儿贫血、血小板减少症、水肿,甚至死亡。

胎儿贫血可导致胎儿心衰、水肿,甚至宫内死亡;血小板减少则可引起胎儿颅内出血继而引发胎儿残障及死亡。如何准确诊断胎儿贫血及血小板减少是进一步治疗的前提。来自荷兰莱顿大学医学中心的 Dick Oepkes 教授向我们详细讲解了胎儿贫血与血小板减少的病因、诊断、并发症及治疗方法,值得临床医生学习。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2015.01.012