

遗传性耳聋家系的产前诊断及遗传咨询

任淑敏 吴庆华 刘宁 亢鸿飞 白楠 孔祥东

(郑州大学第一附属医院 遗传与产前诊断中心,河南 郑州 450052)

【摘要】 目的 对有明确耳聋致病基因的常染色体隐性耳聋家庭再次生育时行产前诊断,并给予相应的临床咨询,降低生育风险。**方法** 在知情同意的原则下,通过超声引导下行介入性穿刺,对获取的胎儿标本 DNA 应用 STR 位点检测以排除母体基因组的污染,并采用 Taqman 探针法结合 Sanger 测序进行相关耳聋基因检测。**结果** 对 59 个家系胎儿进行相关基因(*GJB2*、*SLC26A4*)检测,16 个家系的胎儿为与先证者一致的患儿,25 个家系的胎儿为携带父母一方致病突变的携带者,18 个家系的胎儿为无致病突变携带的正常胎儿。出生后听力评估、基因诊断结果与产前诊断结果相符。**结论** 本研究中 *GJB2* 基因最常见的致病突变为 c. 235delC,其次为 c. 299-300delAT。*SLC26A4* 基因最常见致病突变为 IVS7-2A>G,其次为 c. 2168A>G(p. H723R)。应用一代测序技术进行耳聋基因产前诊断,能准确诊断胎儿耳聋基因型,有效降低遗传性耳聋患儿的出生率。

【关键词】 遗传性耳聋;产前诊断;遗传咨询

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective Prenatal diagnosis were performed in 59 families with autosomal recessive inheritance hearing loss, give them clinical consultation, reduce the risk of deafness birth. **Method** Obtain the fetus specimens through interventional biopsy guided by ultrasound, test fetus' reative deafness gene with Sanger sequencing in combination with short tandem repeat(STR) test to eliminate maternal blood pollution. **Results** In 59 family cases, 16 cases were consistent with the results of proband, 25 cases were found heterozygous mutations, 18 cases were found no muation. The hearing evaluation results were consistent with the results of prenatal diagnosis. **Conclusions** The most common pathogenic mutation of *GJB2* is c. 235delC, the second is c. 299-300delAT, the most common pathogenic mutation of *SLC26A4* is c. IVS7-2A>G, the second is c. 2168A>G(p. H723R). Application of deafness genes test with Sanger sequencing in prenatal diagnosis can accurately diagnose fetus' genotype, effectively reduce the birth rate of deafness child.

【Key words】 hereditary deafness; prenatal diagnosis; genetic counseling

耳聋是影响人类健康和生活质量的重大疾病之一,在新生儿中的发生率达 1%~3%。耳聋可由环境及遗传因素作用导致,其中 60%以上的耳聋与遗传因素关系密切^[1]。遗传性耳聋具有高度的遗传异质性,包括综合征性耳聋和非综合征性耳聋,60%~70%的遗传性耳聋患者除耳聋外,不伴有其他症状及体征,称为非综合征型耳聋(non-syndromic hear-

ing impairment, NSHI)^[2]。国内过去十多年的流行病学研究中发现,*GJB2*、*SLC26A4*、线粒体 12SRNA 基因有很高的发病率^[3-5],为中国遗传性耳聋群体主要致病基因。本研究对有明确耳聋致病基因的常染色体隐性耳聋家庭再次生育时行产前诊断并给予遗传咨询,避免再次生育耳聋患儿。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集自 2011 年 7 月至 2015 年 12

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2016.02.008

* 通讯作者:孔祥东, E-mail: kongxd@263.net

月来郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心遗传咨询门诊咨询的有耳聋生育史 59 例家系,所有耳聋先证者均经本院耳科诊断为耳聋,均在本中心对耳聋患者及其父母行相关耳聋基因检测,确定为 *GJB2* 基因或 *SLC26A4* 基因突变型遗传性耳聋,夫妻双方为耳聋基因携带者或耳聋患者的家系,在知情同意的原则下,进行耳聋基因产前诊断。

1.2 方法

1.2.1 产前诊断前家系成员基因检测 采集患者及其父母外周静脉血, DNA 提取后,分两步基因检测,第一步采用济南英盛耳聋基因检测试剂盒(荧光 PCR-Taqman 探针法)检测常见耳聋 10 个位点检测(*GJB2* 基因 c. 176del16、c. 235delC、c. 299-300delAT、c. 512-513insAACG; *SLC26A4* 基因 c. IVS7-2A>G、c. 2168A>G、c. 1229C>T、c. 1174A>T; 线粒体 DNA12SRNA1555A>G、1494A>T),如果检出两个突变位点,直接测序验证,父母验证,如果检出 1 个杂合位点,进行相应的基因外显子及剪切区 Sanger 测序。

1.2.2 介入性穿刺术 18 例孕 11~14 周胎儿,采用 18G 一次性 GALLINI 针行绒毛活检术抽取胎盘绒毛 10mg;41 例孕 16 周后胎儿,采用 22G 一次性 GALLINI 针抽取羊水 20ml。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。

1.2.3 胎儿 DNA 提取、扩增、测序 采用 OMEGA 公司的 DNA 提取试剂盒提取绒毛、羊水 DNA,并用紫外分光光度计测量 DNA 浓度和纯度, DNA 浓度为 100~200ng/ μ l,纯度 OD_{260/280} 在 1.7~2.0 之间。将 DNA 加入反应体系中进行 PCR 扩增。

运用 PCR 纯化产物直接测序法对胎儿 DNA 进行家系耳聋致病基因位点检测,包括:*GJB2* 基因全编码区 DNA 序列,*SLC26A4* 基因部分外显子序列。

1.2.4 STR 基因型检测 采用 Promega 公司的 PowerPlex16 试剂盒,在 ABI3130 测序仪上分别对

相关家系的母亲及胎儿的 16 个 STR 位点(PentaE、D18S51、D21S11、TH01、D3S1358、FGA、TPOX、D8S1179、vWA、Amelogenin、Penta D、CSF1PO、D16S539、D7S820、D13S317、D5S818)进行测定,然后利用 GeneMapper 软件自动分析等位基因的基因型。

1.2.5 DNA 测序与数据分析 PCR 扩增产物进行 SAP 酶混合液纯化后,再行 CycleSequencing 反应。反应产物通过醋酸钠-乙醇法进行纯化,并于 ABI3130 DNA 全自动测序仪上进行测序反应(所有 DNA 目的片段均需进行正反双向测序)。测序数据用 sequencing analysis 软件读取,并用 Genetool 软件将所测序列与 NCBI 中的基因标准序列进行比对分析,记录序列比对结果。

1.2.6 随访 对经产前诊断后继续妊娠的胎儿行分娩后听力筛查,同时采集新生儿足跟血提取 DNA 进行基因诊断,以验证出生后新生儿听力筛查和基因诊断结果与产前诊断结果是否一致。

2 结果

2.1 家系产前诊断前基因检测 本研究共对 59 家系患者做了耳聋基因检测,33 例为 *GJB2* 基因突变导致的耳聋,26 例为 *SLC26A4* 基因突变导致的耳聋,同时检测患者父母相应基因突变追踪基因突变均来源于父母,父母均为杂合突变携带者,符合常染色体隐性遗传。

2.2 STR 基因型检测 将所有孕妇外周血 DNA 分别与对应的胎儿 DNA 进行 STR 位点检测与分析,结果显示所有胎儿与各自母亲存在亲生血缘关系,同时也排除了胎儿 DNA 受母体基因组 DNA 的污染。

2.3 基因检测结果 运用 PCR 产物直接测序法对 59 个家系胎儿进行相关基因(*GJB2*、*SLC26A4*)检测,结果显示:16 个家系胎儿为与先证者一致的患儿(27.1%),25 个家系胎儿为携带父母一方致病突变的携带者(42.4%),18 个家系胎儿为无致病突变携带的正常胎儿(30.5%)(见表 1)。

表 1 59 个家庭耳聋基因产前诊断结果(例)

致病基因	先证者基因型	例数	胎儿基因检测结果			
			患者	杂合携带者	正常	
GJB2	235delC/299-300delAT	14	5	6	3	
	235delC 纯合突变	12	5	4	3	
	299-300delAT 纯合突变	3	1	2	0	
	299-300delAT/E47X	1	0	0	1	
	235delC/599-604ins46	1	0	0	1	
	235delC/176-191del16	1	0	1	0	
	235delC/213-326del14	1	0	1	0	
	IVS7-2A>G/H723R	8	1	5	2	
	IVS7-2A>G 纯合突变	6	1	2	3	
	IVS7-2A>G/R409H	4	1	1	2	
	IVS7-2A>G/T410M	2	0	0	2	
	SLC26A4	IVS7-2A>G/916-917insG	1	1	0	0
		IVS7-2A>G/N392Y	1	0	1	0
		IVS7-2A>G/S448L	1	0	1	0
IVS7-2A>G/V659L		1	0	1	0	
IVS7-2A>G/L676Q		1	0	0	1	
413delT/V659L		1	1	0	0	
总计		59	16(27.1%)	25(42.4%)	18(30.5%)	

2.4 遗传咨询、妊娠结局与随访 16 个胎儿携带与先证者相同基因突变的孕妇夫妇经遗传咨询,均选择治疗性引产,其他 43 个家庭选择继续妊娠,新生儿娩出后听力筛查及基因筛查均正常。

3 讨论

在我国,遗传性耳聋最常见致病基因主要为 GJB2、SLC26A4、线粒体 DNA12S rRNA、GJB3 基因^[6-8]。根据遗传方式不同将遗传性耳聋分为常染色体隐性遗传常染色体显性遗传、线粒体遗传和 X 连锁遗传、Y 连锁遗传 5 类,目前约有 130 种耳聋致病基因被克隆^[9],其中以常染色体隐性遗传性耳聋最多见,约占 75%~80%。GJB2 基因、SLC26A4 基因导致的耳聋为常染色体隐性遗传,若夫妇为同一基因的突变携带者,那么将会有 25% 的几率生育耳聋患儿,再次怀孕应当进行产前诊断,线粒体 D12SRNA 基因是线粒体母系遗传,女性携带者所生子女均为 12SRNA 基因突变携带者,再次生育不需进行产前诊断,但孕期及胎儿出生后应该避免使用氨基糖苷类抗生素,避免药物性致聋。

GJB2 基因突变是遗传性耳聋最主要的致病基因,位于染色体 13q11-12 区域,该基因编码的缝隙连接蛋白 Connexin26(CX26),是相邻细胞间的特

殊通道,在细胞间信息传递和物质交换中起着重要作用^[10-12],东亚人群中以 235delC 突变最为常见。本研究 56 例耳聋家系中 33 例为 GJB2 基因突变导致的耳聋,且最常见的致病突变为 235delC,其次为 299-300delAT。

SLC26A4 基因又名 PDS 基因,定位于染色体 7q21 位点,有 21 个外显子,编码溶脂蛋白(Pendrin 蛋白),该蛋白在内耳中表达于内淋巴管、内淋巴囊、椭圆囊、球囊、血管纹纺锤形细胞、耳蜗外沟和螺旋突起,异常的 Pendrin 蛋白失去正常的离子转运功能,致使内淋巴离子环境失衡,进而导致耳聋,SLC26A4 基因突变导致的耳聋可能出现双侧不对称,病症出现波动或进行性改变^[13]。本研究群体中 SLC26A4 基因突变主要类型主要为 IVS7-2A>G,其次为 2168A>G(p. H723R)。

本研究对 59 个再生育的耳聋家庭进行产前诊断,结果显示 16 个家系胎儿为与先证者一致的患儿,家庭均选择引产,避免了这些家庭再次生育耳聋患者,一定程度上减轻了耳聋家庭的负担,其余 43 例胎儿为无突变或携带者,通过给予遗传咨询,夫妇保留胎儿,随访听力正常。从我院小样本的产前诊断结果也可以看出,胎儿基因诊断结果与孟德尔遗传规律预测概率相近。

目前常用的耳聋基因诊断的方法有 DNA 芯片法、Taqman 探针法、基因测序方法和高通量测序方法。DNA 芯片法敏感性好,但设备较昂贵,检测位点较少,操作也较为复杂,成本相对较高;Taqman 探针法简单、敏感、位点多于 DNA 芯片法,但仍不能覆盖所有基因突变位点;Sanger 测序法位点覆盖全面,是基因诊断的金标准,但操作及分析较复杂;高通量测序成本高,仅适合于罕见耳聋遗传病的诊断。本研究我们采用 Taqman 探针结合 Sanger 测序结合的方法进行患者基因诊断,先对常见位点采用 Taqman 探针法进行初筛,对于发现单个杂合突变的家系进行基因全外显子测序,对于临床症状符合 PDS,但未发现 *SLC26A4* 基因突变的家系也进行了全测序,一定程度上减少了耳聋基因诊断的复杂程度,同时也保证了基因诊断的全面和准确性。

目前遗传性耳聋的产前诊断只能通过基因诊断,其他手段,如胎儿听力筛查、超声筛查、酶学或蛋白质筛查均不能进行耳聋产前诊断。为保证耳聋产前诊断的可靠性,耳聋基因诊断及产前咨询应当注意以下事项:①耳聋家系必须明确是已知基因突变的遗传性耳聋家系,才能进行产前诊断,因为耳聋具有较强的遗传异质性,有些耳聋并非遗传性的,有些耳聋是线粒体 DNA 突变,这些是不能或不需要做产前诊断的,因此必须进行耳聋患者基因诊断,明确有致病基因突变后才能做产前诊断;②若是常染色体隐性遗传性耳聋,必须为同一个基因纯合或 2 个复合突变位点,而且必须对患者的父母进行突变追踪,证实位点来自双亲,而非来自同一个亲代,且所检出的突变位点为已有致病报道,非多态性位点;③如产前诊断为胎儿正常,告知胎儿父母仅能排除家族中所携带特定耳聋致病基因突变所致的耳聋,应嘱胎儿父母出生后进行新生儿听力筛查,因为约有 40% 的耳聋为非遗传因素所致;④对于杂合携带者胎儿,嘱其父母可以继续妊娠,但长大成人结婚后,应告知需进行配偶的相关耳聋致病基因筛查,避免配偶也为同一基因杂合突变携带者所带来的生育风险。

综上所述,耳聋是一种严重影响人类生活质量的常见先天性缺陷疾病,通过对孕期妇女进行相关遗传性耳聋基因检测,对其进行遗传咨询和生育指

导,避免耳聋家系再次生育耳聋患儿,降低耳聋残疾儿的出生率,有着重要的临床意义。

参考文献

- [1] Bitner GM. Hereditary deafness and phenotyping in humans [J]. *Br Med Bull*, 2002, 63:73-94.
- [2] 丁红珂,尹爱华. 非综合征性遗传性耳聋的基因诊断进展[J/CD]. *中国产前诊断杂志(电子版)*, 2015, 4:48-53.
- [3] Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the *GJB2* (connexin 26) gene[J]. *Hum Genet* 2000, 106:40-44.
- [4] Gabriel H, Kupsch P, Sudendy J, et al. Mutations in the connexin26/*GJB2* gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population[J]. *Hum Mutat*, 2001, 17:521-522.
- [5] Dai P, Yu F, Han B, et al. Features of nationwide distribution and frequency of a common gap junction beta-2 gene mutation in China[J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2007, 42:804-808.
- [6] 郑文波,罗建红,郦云,等. 中国人语前非综合征性耳聋患者 *GJB2* 基因的突变分析[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38:610-613.
- [7] Pu Dai, Fei Yu, Bing Han, et al. *GJB2* mutation spectrum in 2063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. *J Transl Med*, 2009, 7(26):1-12.
- [8] Dai P, Li Q, Huang D, et al. *SLC26A4* c. 919A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss[J]. *Genet Med*, 2008, 10:586-592.
- [9] Egilmez OK, Kalcioğlu MT. Genetics of nonsyndromic congenital hearing loss[J]. *Scientifica (Cairo)*, 2016, 2016:1-9.
- [10] Qu CH, Zhang N, Cao DH, et al. Analysis of common deafness genes screening in 240 patients[J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2014, 35(10):1019-1021.
- [11] Goodenough DA, Goliger JA. Connexins, connexons, and intercellular communication[J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65:475-502.
- [12] 于飞,韩东一,戴朴,等. 1190 例非综合征性耳聋患者 *GJB2* 基因突变序列分析[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40):2814-2819.
- [13] Qu CH, Zhang N, Cao DH, et al. Analysis of common deafness genes screening in 240 patients[J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2014, 35(10):1019-1021.

(收稿日期:2016-04-27)

编辑:宋文颖