

耳聋基因诊断及其在遗传性耳聋预防和阻断中的应用研究

孙莉莉 张丽 柳爱华

(沈阳市妇女儿童保健中心,辽宁 沈阳 110032)

【摘要】 耳聋是人类最重要的残疾之一,随着人类基因组计划的完成以及分子遗传学的发展,人们不仅认识到一半以上的耳聋是由遗传因素导致的(重点的耳聋突变基因包括 GJB2、SLC26A4、线粒体 DNA 等),而且意识到耳聋基因检测在预防和阻断遗传性耳聋的重要作用,因此人们纷纷致力于耳聋基因的功能研究,检测方法以及预防策略的研究。

【关键词】 遗传性耳聋;耳聋基因;耳聋预防

耳聋是影响人类健康和造成人类残疾的常见疾病。据我国 2006 年第二次全国残疾人抽样调查显示,听力残疾者 2 780 万,占全国 8 296 万残疾人的 31%,占世界听障人群的 25%。其中 0~6 岁听障儿童 80 万,6~14 岁听障儿童 11 万,每年新生聋儿 > 3 万(不包括迟发性聋以及药物性聋)^[1]。欧美国家统计表明 1/2 000(0.05%)~1/1 000(0.1%)的新生儿中会有 1 名重度或极重度听力丧失患儿,其中一半以上属于遗传性耳聋^[2-4]。在我国 60%的耳聋是由于遗传的因素造成的,40%是环境因素导致的^[5]。

1 耳聋基因的情况

到目前为止,已有数百种耳聋综合征见于报道,但只有约 30%的遗传性耳聋病例属于遗传性综合征性耳聋,绝大部分的遗传性耳聋被定义为非综合征性耳聋。遗传性非综合征性耳聋按遗传模式又可分为:①77%的病例为常染色体隐性;②22%的病例为常染色体显性;③1%的病例为 x 连锁;④小于 1%的病例为线粒体遗传^[4]。自 1986 年以来,遗传性耳聋的病因学研究有了很大进展,已有 60 余个耳聋基因被克隆^[4]。到 2010 年为止,美国哈佛大学医学院耳聋突变基因数据库中保存着已发现的耳聋致病基因其中与常染色体隐性遗传有关的基因有 GJB2、GJB3、SLC26A4、MYO6 等 41 种;与常染色

体显性遗传有关的基因除了 GJB2、GJB3 以外还有 EYA4、COCH 等 25 种;与 X 连锁有关的基因为 PRPS1、POU3F4 2 种;与线粒体有关的突变基因为 MTRNR1、MTTS1 等 6 种还有大片段的缺失及复制^[6]。

同时在美国和欧洲的遗传性耳聋人群中,发现数个耳聋重点基因,如由 GJB2 基因突变导致的耳聋占常染色体隐性遗传非综合征性耳聋 50%以及 PDS 基因突变导致 Pendred 综合征,此 2 项基因检测已被美国哈佛大学儿童医院以及爱荷华大学医学中心列为常规临床检测项目^[7]。虽然耳聋具有很高的遗传异质性,加大了遗传性耳聋分子诊断的难度,但我国大范围的流行病学调查显示,GJB2、SLC26A4(PDS)和线粒体基因(mtDNA)的病理性突变导致遗传性耳聋占大部分^[8,9],这就为新的耳聋预防策略带来希望。

1.1 GJB2 基因相关耳聋 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。Connexin 26 对维护耳蜗的正常功能非常重要。研究表明 GJB2 突变导致的遗传性耳聋遍布美国、欧洲各国以及突尼斯、黎巴嫩、澳大利亚、新西兰等国家。在人种间,存在不同的 GJB2 基因突变及发生频率,到目前为止已发现 GJB2 基因 110

余种突变方式^[6]。目前来自中国和日本的资料揭示 GJB2 基因突变在亚洲人遗传性耳聋中的也有一定的发生比例。在中国人中,儿童语前聋的 26%~33% 为 GJB2 基因突变所致,占常染色体隐性遗传性聋的 28%,其突变的主要方式为 233-235delC,检出率为 13.64%~21.5%^[10-13]。临床特点:主要表现为双耳重度或极重度感音神经性耳聋,绝大多数患者均表现为先天性、对称性以及非进行性耳聋。

1.2 线粒体耳聋基因 线粒体 DNA 突变与遗传性耳聋有密切关系。1993 年 Prezant 等发现导致人类氨基糖甙类药物引起的非综合征型耳聋的分子病理基础为线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 点突变,据分析此突变通过改变线粒体 DNA 的空间结构使形成新的与氨基糖甙类抗生素结合位点而导致对此类药物敏感而致聋。1996 年起袁慧军研究员首先在国内开展了药物敏感个体耳聋致病机制的研究,在国内首先发现和报道了母系遗传药物性耳聋家系中 12S rRNA 的 A1555G 突变最为常见,确定此突变是导致药物敏感性的最根本原因,突变引起线粒体基因结构变异,使氨基糖甙类抗生素攻击内耳组织,导致一针致聋。线粒体遗传属于母系遗传的特点成为预防 mtDNA A1555G 突变携带者发生药物性耳聋的关键。平均发现一个携带者可以为 10 个以上的未发病的母系成员提供预警和用药指导。通过进行线粒体基因突变筛查,进而发现敏感个体,对其未发病的母系家庭成员进行预防宣教^[14,15]。据调查显示,mtDNA A1555G 在中国耳聋人群的携带频率为 3.8%,mtDNA C1494T 的携带率为 0.6%^[5]。

1.3 SLC26A4 基因 近年来国外的多项研究表明,大前庭水管综合征和 Pendred 综合征(前庭水管扩大或伴内耳畸形、神经性聋和甲状腺肿)与 SLC26A4 基因突变有密切的关系。SLC26A4 基因又称 PDS 基因,位于人类染色体 7q31,含有 21 个外显子,编码含有 780 个氨基酸的蛋白质 Pendrin。Pendrin 主要由疏水性氨基酸组成,属于离子转运体家族。研究表明 Pendrin 功能与氯/碘离子、氯/甲酸根、氯/碳酸氢根离子和蔗糖转运有关^[16,17]。由中国大前庭水管患者群的 SLC26A4(PDS)基因分析表明,在 95%~97% 中国人大前庭水管患者中

可以发现至少一个 SLC26A4(PDS)基因突变,并且大多数患者可以发现纯合或复合突变,显示中国人大前庭水管综合征是肯定的遗传性疾病,其发病原因是 SLC26A4(PDS)基因突变,其中 PDS 基因 IVS7-2A-G 突变是中国人大前庭水管综合征中的高发突变,占突变总数的 63.5%。约在 80% 的大前庭水管患者中可发现此突变,1% 的正常人携带此种杂合突变^[18]。临床特点是双侧感音神经性耳聋,CT 或 MRI 提示前庭水管或内淋巴囊扩大,一部分患者出生时可能听力正常,听力下降程度在不同的个体具有较大的差别,从听力完全正常至中重度听力损伤,因堕床、儿童玩耍或体育活动中的轻度碰撞或感冒可以造成明显听力下降,亦存在无明显诱因而发生听力下降的情况。

2 耳聋基因的诊断方法

2.1 酶切方法 限制性核酸内切酶是一类具有严格识别位点的酶类,它可以特异地识别和切割核苷酸序列,这些片段通过凝胶电泳法进行分离、鉴别^[19]。线粒体 DNA A1555G 突变检测试剂盒和大前庭水管相关 PDS IVS7-2A-G 突变检测试剂盒均采用这种方法。

2.2 序列测定 核酸序列测定是基因研究的重要手段,目前传统的手工测序方法及仪器自动测序方法均使用双脱氧链终止法。实验室所使用的全自动基因测序仪多数是美国应用生物系统公司所开发。主要分为测序模板的制备、测序反应 PCR、测序反应 PCR 纯化、上机检测等步骤。基因序列测定已成为许多遗传性疾病诊断的金标准,此项技术对人类认知疾病,诊断疾病以及预防疾病都有着深远的意义^[20]。

2.3 变性高效液相色谱技术 是一种基因检测技术平台,采用 DNA SepCartridge 分离柱进行核酸片段的分离和分析,通过色谱图判断序列突变非常直观。虽然 DHPLC 是一个定性的筛查技术,最终要通过测序确定突变类型,但通过色谱图可看出不同突变的图形都有各自的特点,借此可初步推测突变类型。优点:可以进行基因大片段缺失检测、染色体多倍体和大片段缺失检测、定量分析,方法准确、操

作容易、检测随机性、结果快速性、样品高通量性、消耗品低价性等。局限性:虽然可检测 1.5kb 片段大小,最佳检测大小为 200~450bp;对 PCR 的产量和质量要求高;不能检测大片段缺失、插入及一个或几个外显子的丢失^[20]。目前可采用此种方法进行 SLC26A4 突变基因的筛查。

2.4 基因芯片 又称 DNA 芯片、寡核苷酸微阵列。是通过光刻原位合成或点样技术,将已知序列的 DNA 或寡核苷酸片段按特定顺序密度地固定在玻璃等支持物上所组成的 DNA/cDNA 探针阵列。针对国人常见耳聋相关基因热点突变设计的耳聋基因芯片对非综合性重度和极重度耳聋患者的突变检出率高。与传统的检测方法相比,它具有快速、高通量、高准确性、低成本等特点。更重要的是它可以同时检测多突变位点,这是传统方法无法解决的问题。由我国研发的耳聋基因诊断芯片,采用的是基因芯片的方法,主要针对的是 GJB2、GJB3、SLC26A4 以及线粒体 DNA 4 种基因 9 个位点的检测。

3 耳聋基因诊断在遗传性耳聋预防和阻断中的意义

从 20 世纪 80 年代年代到目前为止,很多国家都已经进行了耳聋的预防和阻断,通过新生儿听力筛查,早期发现听力减退的患儿,采取一定的措施来保证患儿的正常发育。但这仅仅是从听力学的角度进行的检测,无法从根本上解释耳聋的病因,以及进行耳聋的预防和阻断。随着人类基因组计划的完成,人们对耳聋的研究也越来越深入,已经从分子遗传学上找到了耳聋的真正病因,这为从根本上预防和阻断耳聋奠定了理论基础。但由于耳聋高度遗传异质性的特点,给耳聋的分子学诊断及预防带来了一定的困难。对于我国来说,首先我们必须认识中国人耳聋的真正病因,特别是各种遗传性致病因素,以及耳聋相关基因的特点才有可能采取相应的预防和阻断措施。解放军总医院聋病分子诊断中心自 2003 年起进行了全国范围的聋病分子流行病学调查,共收集 28 个地区聋哑人病例及 DNA 标本 3 564 例,结果发现 21% 的聋人带有 GJB2 基因突变(其中 15% 为双等位基因突变);14.5% 的聋人带有 SLC26A4 基因突变(其中 10.5% 为双等位基因突

变);另分别有 3.8% 和 0.6% 的聋人带有线粒体 DNA A1555G 和 C1494T 突变^[9]。因此对广大中国聋人群体的常见遗传病因的调查和分析结果可以指导遗传性耳聋的总体预防。中国聋儿中 GJB2、SLC26A4 和线粒体基因突变导致的耳聋比例非常高的事实也催生了新的耳聋预防思路和方法的诞生^[21]。

3.1 药物性耳聋敏感个体的筛查和发现是前瞻性预防药物性耳聋发生地科学方法 大量的研究证实,线粒体突变与耳聋关系密切,目前确定与药物性耳聋发病密切相关的线粒体 DNA 突变是 A1555G 和 C1494T,通过进行线粒体基因突变筛查,进而发现敏感个体,对其未发病的母系家庭成员进行预防宣教,告之终身禁用氨基糖甙类抗生素,使他们避免接触危险环境而使听力得到保护^[21]。

3.2 认识青少年聋人的遗传性病因是预防“聋聋”垂直传递的基本 在聋人社会中比较流行聋-聋婚配的模式,这就意味着耳聋的同证婚配会导致耳聋出生缺陷率大幅度的升高。我们可以在聋人婚恋前鉴定常见遗传性耳聋的基因型,据此指导聋人之间的基因互补型婚姻,避免悲剧的再次发生^[22]。

3.3 耳聋基因诊断配合产前诊断是保障耳聋家庭再生育的关键技术 基于基因诊断的耳聋遗传咨询及产前诊断可使咨询对象获得更加科学准确的遗传信息,通过后续的遗传指导和必要的干预措施,最终达到防止聋儿后代出生、减少耳聋发病率的目的。

3.4 新生儿的听力筛查和基因筛查联合应用是一个具有很好前景的革命性工作 近 10 年全国范围开展的新生儿听力筛查存在一个重大的局限或缺陷,即并不是所有的听力损失均会在出生后立即表现出来。因此将听力筛查和基因筛查联合应用作为早期发现处于语前听力损失或迟发型高危患儿的方法,是目前最为有力的筛查策略^[23]。其意义在于:①对于先天性听力损伤患儿至少 40% 可以明确病因;②可早期发现处于语前听力损失或迟发型的高危患儿(目前最为有力的筛查策略);③更为重要可以发现大量潜伏的耳聋基因携带者。

尽管在聋人社会和家庭进行耳聋基因筛查和预防具有投入少、产出大特点,但由于中国人常见耳聋

突变的携带率非常高,仅依赖聋人的筛查和干预尚不足以从根本上阻止遗传性耳聋在整个人群中的传递和发病。年轻夫妇在婚检或生育前进行耳聋基因突变的筛查,是前瞻性阻止可诊断的遗传性耳聋下传的科学方法,这一过程也可以提前到新生儿出生后,其优越性在于及早发现的迟发性遗传性耳聋,予以用药指导、早期治疗、干预和康复,对于其成年后的配偶选择和优生优育作出指导。

综上所述,随着基因组科学的进步和对中国人遗传性耳聋认识的深入,遗传性耳聋预防和阻断的时代已经到来,科学的预防理念、准确全面的基因诊断和筛查技术、配套的遗传咨询和干预体系、全体国民的知识普及和教育将是规模化预防中国遗传性耳聋出生和药物性耳聋发生的关键。

4 耳聋基因诊断目前存在的问题及展望

耳聋基因诊断目前在我国是刚刚起步,在预防遗传性耳聋中还存在着很多的问题。第一,目前国内外基因检测的主要方法是测序法,此方法复杂、费时、价格昂贵,一般的医疗机构很难开展,仅仅应用于科研机构。因此临床上需要一种简单、快速、准确的基因检测方法—耳聋基因芯片应运而生。它的检出率高、通量高、准确性高、操作简便等特点使它开始在临床上得到广泛的应用。第二,由于人类基因组的复杂性及耳聋基因的高度遗传异质性,加大了基因检测的难度,给遗传性耳聋的诊断及预防带来了一定的困难。因为到目前为止,已知的耳聋基因很多,尚还有待发现的未知基因,因此一些检测的结果并不理想(有的基因并未检测到),这给遗传咨询工作带来了一定的困扰。随着人们对遗传性耳聋认识的深入以及基因芯片检测方法的完善,相信遗传性耳聋基因检测在预防和阻断聋儿的出生,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] 中国残联网站. 2006 年第二次全国残疾人抽样调查表[EB/OL]. http://www.cdpc.org.cn/sjcx/node_50872.htm.

[2] Marazita ML, Ploughman L, Rawlings B, et al. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U. S.

school-age population[J]. *Am J Med Genet*, 1993, 46: 486-491.

- [3] Latzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(10):1589-1597.
- [4] Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11 (10): 1229-1240.
- [5] 戴朴. 遗传性耳聋的预防和阻断[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40):1-3.
- [6] <http://hereditaryhearingloss.org/>. 2010-11-02
- [7] Smith RJH, Robin NH. Genetic testing for deafness—GJB2 and SLC26A4 as causes of deafness [J]. *Communication Disorders*, 2002, 35:367-377.
- [8] 袁永一,戴朴,黄德亮,等. 内蒙古赤峰市聋校聋儿 SLC26A4 基因分析[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2007, 5(14): 251-256.
- [9] 戴朴,刘新,于飞,等. 18 个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究(I)—GJB2 235delC 和线粒体 DNA 12SrRNA A1555G 突变筛查报告[J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 4:1-5.
- [10] Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6: 1605-1609.
- [11] Sugata A, Fukushima K, Sugata K, et al. High-throughput screening for GJB2 mutations—its clinical application to genetic testing in prelingual deafness screening for GJB2 mutations[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2002, 29(3): 231-239.
- [12] 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(10): 610-613.
- [13] 王莘,王新美,安秀芬,等. Connexin26 基因 233delC 突变与中国人先天性耳聋的研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2001, 8(1):24-26.
- [14] 袁慧军,姜泗水,杨伟炎,等. 氨基糖甙类抗生素致聋家系线粒体 DNA1555G 点突变分析[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 33(2):67-70.
- [15] P Dai, X Liu, DY Han, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA mutation in 16 Chinese families; Implication for early detection and prevention of deafness [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340:194-199.
- [16] Campbell C, Cucci RA, Green GE, et al. Pendred Syndrome, DFNB4 and PDS-identification for eight novel mutations and

- phenotype-genotype correlations[J]. Human mutation, 2001, 17:403-411.
- [17] Scott DA, Wang R, Kreman, 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]. Human Molecular Genetics, 2000, 9:1709-1715.
- [18] 戴朴, 韩东一, 冯勃, 等. 大前庭水管的基因诊断和 SLC26A4 基因突变分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 13: 303-307.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 戴朴, 韩冰, 袁永一, 等. 基于基因诊断的耳聋遗传咨询、指导作用的初步观察[J]. 中华医学杂志, 2007, 87: 1088-1092.
- [22] 韩冰, 戴朴, 王国建, 等. 相同表型不同基因型耳聋夫妇家庭的遗传咨询与指导[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42: 499-503.
- [23] Morton CC, Nance WE. Newborn Hearing Screening-A Silent Revolution[J]. N Engl J Med, 2006, 354: 2151-2164.

编辑: 孟梦

(收稿日期: 2011-03-11)

· 会议报道 ·

第二届 FMF“早孕期筛查及胎儿宫内治疗” 国际学术论坛隆重召开

2011年5月28至29日,由暨南大学附属第一医院胎儿医学科及英国胎儿医学基金会(FMF)主办的“第二届 FMF‘早孕期筛查及胎儿宫内治疗’国际学术论坛”在暨南大学理工学院会议厅隆重召开。

暨南大学附属第一医院副院长陈剑教授为论坛作了热情洋溢的致辞。广东省医学会超声分会主任委员中山大学附属第二医院超声科主任罗葆明教授代表医学会致辞。开幕式上,陈剑副院长代表暨南大学为新加坡杜克-国立大学医学研究生院杨秀雄教授颁发“暨南大学客座教授”敦聘证书。

该论坛是国内众多相关学术会议中唯一在英国胎儿医学基金会公众网站上被公布和推荐的国际性学术会议,是暨南大学附属第一医院建院30周年庆典活动的重头戏。论坛邀请了英国、新加坡、西班牙、澳门等国家及地区以及国内的多名胎儿医学专家演讲,专家们就早孕期筛查规范、早孕期畸形检查、双胎妊娠并发症宫内诊断、产科盆底超声、子痫前期的预测、胎儿宫内手术、产科多普勒监护、澳门产前筛查的现状等内容进行了交流,把目前国际上最新、最先进的理念带入国内。会议还现场演示了早孕期筛查、胎儿心脏检查以及胎儿镜下激光治疗双胎输血综合症等内容,共有来自全国各地及亚太地区的近300名学员参加了论坛。

本次论坛受到国内外同行及参会人员的极大关注和认可,为国内外“早孕期筛查及胎儿宫内治疗”的学术交流提供了很好的平台;也为推动国内“早孕期筛查及胎儿宫内治疗”的发展起到了重要作用。