

一个遗传性非综合征型耳聋大家系的 GSDME 基因突变分析

黄演林¹ 余丽华¹ 丁红珂¹ 曾玉坤¹ 刘玲¹ 陈洽鑫² 刘畅^{1*}

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511400; 2. 广东省妇幼保健院 耳鼻喉科, 广东 广州 511400)

【摘要】目的 利用二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)结合 Sanger 测序验证对一听力障碍的家系进行致病基因检测。**方法** 以 2018 年广东省妇幼保健院产前诊断科诊断为听力障碍的一家系为研究对象, 采集先证者病史、听力检查结果及家族史, 采用遗传性耳聋精选基因检测包对先证者进行基因检测, 后对发现的致病位点进行 Sanger 测序验证, 同时收集家系其他成员进行 Sanger 测序。**结果** 共收集该家系 36 个成员的资料, 其中 3 人已去世, 其余 33 人均进行了基因检测与诊断。检测到先证者在 GSDME 基因第 7 号内含子上发生了剪接位点变异, c. 991-2A>G(来源于父亲), 可引起常显遗传性耳聋 5 型, 共在 8 个家系成员中检出该致病位点杂合改变, 符合孟德尔显性遗传。除先证者表妹表型较轻, 其余 7 个成员均为重度或极重度听力障碍。**结论** 本研究成功利用二代测序技术鉴定了一种导致晚发型非综合征型耳聋的剪接位点变异, 此家系为迄今报道的大家系, 丰富了遗传性耳聋的病因信息。二代测序技术为耳聋分子诊断提供一套可行的新方法。

【关键词】 遗传性非综合征型耳聋; GSDME 基因; 二代测序技术

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Analysis of GSDME gene mutation in a large family with hereditary non-syndromic hearing loss

Huang Yanlin, Yu Lihua, Ding Hongke, Zeng Yukun, Liu Ling, Chen Qiaxin, Liu Chang*

Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, Guangdong, China

* Corresponding author; Liu Chang, E-mail: 565712896@qq.com

【Abstract】Objective Using next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing to detect the pathogenic variant in a family with hearing impairment. **Methods** A large family with multiple members diagnosed with hearing loss was enrolled as subject of this study from our outpatients in 2018. Following the medical history, hearing test results and family history of the proband, custom-designed panel of deafness and Sanger sequencing were used for the proband and then performing Sanger sequencing to verify the gene mutation causing this disease for other family members. **Results** A total of 36 members of the family were included, of which 3 was dead, and the remaining 33 underwent genetic testing and diagnosis. A splicing variant was identified in the proband; c. 991-2A>G in GSDME gene (from the father), which can cause deafness, autosomal dominant 5 (DFNA5), and this pathogenic variant was also detected in other 8 members. Except for one family member who was of mild hearing impairment, the remaining 7 members were of severe or profound deafness. **Conclusion** We successfully identified a splice site mutation that causes late-onset non-syndromic deafness by using NGS. This family is the largest family

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.01.007

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2020302); 广东省医学科学技术研究基金项目(B2021258)

* 通信作者: 刘畅, E-mail: 565712896@qq.com

reported so far, which enriches the etiological information of hereditary deafness. NGS provides a set of feasible methods for molecular diagnosis of deafness.

【Key words】 Hereditary non-syndromic hearing loss; Gene GSDME; Next-generation sequencing

耳聋是由听觉系统中的听神经及各级中枢病变而引起的听觉障碍,是最常见的人类感觉系统缺陷^[1]。先天性因素(遗传)和后天性因素均可导致耳聋。据调查,世界范围内约 4.66 亿人患中度以上听力残疾,我国听力言语残疾者达 2780 万,约占中国残疾人总数的 33%,居我国各类残疾之首^[2]。非综合征型耳聋是指除听力障碍外不涉及外耳畸形或其他器官系统的异常表现,约 80% 为常染色体隐性遗传,20% 为常染色体显性遗传^[3]。目前,已发现超过 25 个基因与常染色体显性非综合征型听力障碍相关,大部分为晚发型听力障碍^[4]。常染色体隐性非综合征型障碍具有较大的遗传异质性,在大多数人群中,重度至极重度常隐非综合征型听力障碍的最常见原因是 *GJB2* 突变,轻度至中度常隐听力障碍的最常见原因是 *STRC* 突变^[5]。

由于非综合征型耳聋存在临床表现的差异及致病基因的不明确性,Sanger 测序不适用于非综合征型耳聋的基因诊断。在二代测序技术(next-generation sequencing,NGS)的推动下,耳聋基因 NGS 检测包发展迅速,可通过耳聋相关基因的目标序列捕获,进行高通量测序,达到很高的灵敏度和准确度,为耳聋分子诊断提供了新的方法^[6]。本研究利用遗传性耳聋精选基因检测包对一耳聋先证者进

行基因检测,并对检测到的突变位点进行 Sanger 测序验证,同时收集家系其他成员进行 Sanger 测序。不仅成功鉴定了一种导致 Joubert 综合征的新突变,丰富了 Joubert 综合征的病因信息,同时为罕见疾病的产前诊断及临床确诊提供了一套可行的新方法。不仅成功鉴定了一种导致晚发型非综合征型耳聋的致病变异,丰富了遗传性耳聋的病因信息,同时为耳聋分子诊断提供一套可行的新方法。

1 材料与方法

1.1 病历资料 谭 CY,XX 岁,因“家族中有多人耳聋”于广东省妇幼保健院产前诊断中心就诊。家族史:本人及父母、哥哥、大姑、二姑均体健,未见听力障碍,其爷爷、三姑和小姑患有耳聋多年;曾爷爷也患有耳聋(已故),其姑婆、大表姑、二表叔和小表叔均患有耳聋,二表叔女儿为耳聋成员中年龄最小者(21 岁),患有轻度听力损失,详见该家系图(图 1)。本研究共收集该家系 36 个成员(3 人已故)的资料,由于就诊者本人及父母均无听力障碍表现,首次实验室检查抽取其三姑谭 JZ(44 岁,耳聋 30 年)外周血,行遗传性耳聋精选基因包检测,测序结果经 Sanger 测序验证。耳聋基因包检测及 Sanger 验证结果均显示存在致病基因位点,后收集该家系 33 人

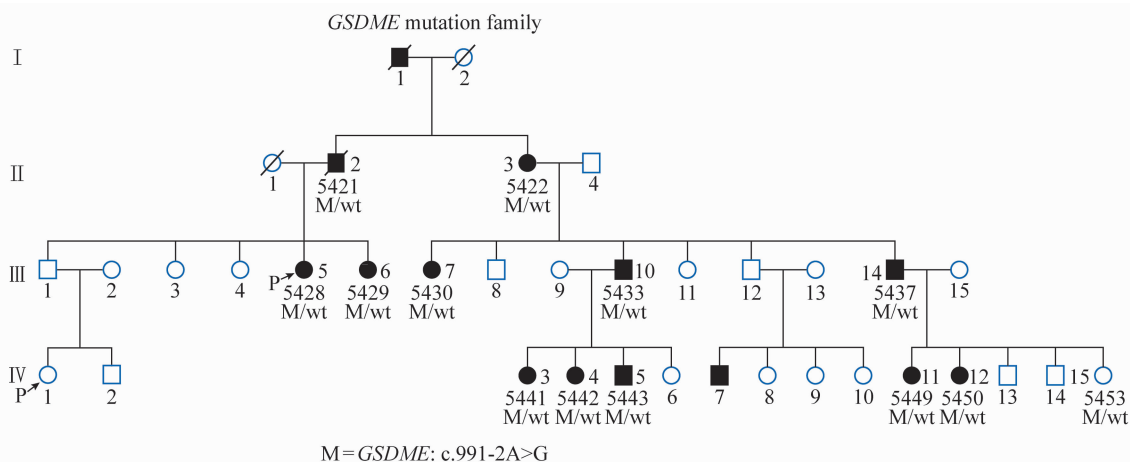


图 1 GSDME 基因突变致聋大家系图

外周血进行 Sanger 测序。本研究获得了广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会的批准。所有样品的采集均取得了参与者的书面知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血 DNA 提取

用 QIAGEN 公司基因组 DNA 提取试剂盒 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 按试剂盒说明书提取外周血 DNA, 使用 Nanodrop2000 超微量分光光度计进行提取 DNA 的定量, 要求 DNA 样本纯度 OD A260/280 介于 1.8~2.0 之间。

1.2.2 遗传性耳聋基因包检测与分析

质检合格的基因组 DNA 经超声破碎仪打断、末端修复、扩增、纯化等操作制备测序文库, 采用特异性的捕获探针 (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA) 杂交富集目标区域的 DNA 序列, 目标区域包括 204 个耳聋相关基因, 3148 个编码区总共含有 497507 个碱基。采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。应用商业软件 SoftGenetics NextGENe V2.4.1.2 进行数据分析和变异检测。参考基因组版本为 GRCh37/hg19。根据 gnomAD 数据库中次等位基因频率 (MAF) 进行变异初筛 (即过滤掉 $MAF > 0.01$ 的变异, *GJB2* NM004004.5:c109G>A 等高频致病位点除外)。采用 VarCards 在线预测网站 (包含 SIFT、Polyphen2、MutationTaster 和 REVEL 等 23 种预测算法) 以及 SpliceAI、varSEAK 等工具对变

异进行有害性预测, 结合 ClinVar、HGMD、Varsome 和变异类型、文献病例报道等信息, 并根据 ACMG/AMP 指南对变异进行综合评级和分类^[7]。本文 *GSDME* 基因使用的转录本为 NM_001127453.2。

1.2.3 Sanger 测序

根据高通量测序结果用 Sanger 测序对先证者 DNA 及其他 33 个家系成员外周血 DNA 进行突变位点的检测和验证。采用 Primer5 软件设计引物, 扩增 *GSDME* 基因第 8 号外显子及上下游 10 个 bp 的序列。引物序列为: *GSDME*-E8F: CACCAAGGATTAGCAATTTTCAG, *GSDME*-E8R: AGAAGGGAAGGACCTGTAT。PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 30s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 40 个循环; 延伸 72℃ 5min。

2 结果

2.1 二代测序结果

先证者耳聋基因包检测及 Sanger 验证结果显示: *GSDME* 基因第 7 号内含子上 (距离第 8 号外显子 2bp) 发生了碱基替换, 即 c.991-2A>G, 形成剪接位点变异, 为杂合突变, 通过外周血 Sanger 测序证实, 该变异来源于先证者父亲, 其父亲也为耳聋患者 (先证者母亲已故, 未行基因检测, 生前未见耳聋)。变异信息见表 1。*GSDME* 基因相关疾病为常显遗传性耳聋 5 型, 是常染色体显性遗传。临床表现主要为语后、高频率、进行性听力损伤, 一般在第一个 10 年发病^[8]。

表 1 *GSDME* 突变家系二代测序结果

基因名称	OMIM 编号	遗传方式	hg19 位置	转录本	核苷酸与氨基酸改变	合子状态	ACMG 变异分类	相关疾病/文献	来源
<i>GSDME</i>	608798	AD	chr7:24745997	NM_001127453.2	c.991-2A>G	杂合	可能致病	常显遗传性耳聋 5 型	父亲

注: 变异来源是通过 Sanger 测序证实; 平均覆盖深度 (297±196)X, 大于 10X 覆盖区间占 94.8%, 大于 20X 覆盖区间占 94.7%; 该位点测序深度为 306X。

2.2 Sanger 测序结果

本家系 33 个成员针对 *GSDME*:c.991-2A>G 致病位点进行了 Sanger 测序。结果显示: 所有耳聋家系成员均检出该杂合致病位点 (8/33, 24.2%), 所有听力正常者均未检出 (25/33, 75.8%), 即约 1/4 的家系成员患病, Sanger 测序结果详见图 2。其中, 首次就诊者的表妹虽检出该剪接位点变异, 但由于其年龄相对较小, 目前仅有轻度的听力损失, 符合该病进行性听力损伤的特点。

3 讨论

遗传性非综合型耳聋是指除听力障碍外不涉及外耳畸形或其他器官系统的异常表现, 约 80% 为常染色体隐性遗传, 20% 为常染色体显性遗传^[8], 目前, 已发现超过 25 个基因与常染色体显性非综合征型听力障碍相关, 大多数会导致语后听力障碍, 如 *ACTG1*、*CCDC50*、*EYA4*、*COL11A2*、*DIAPH1*、

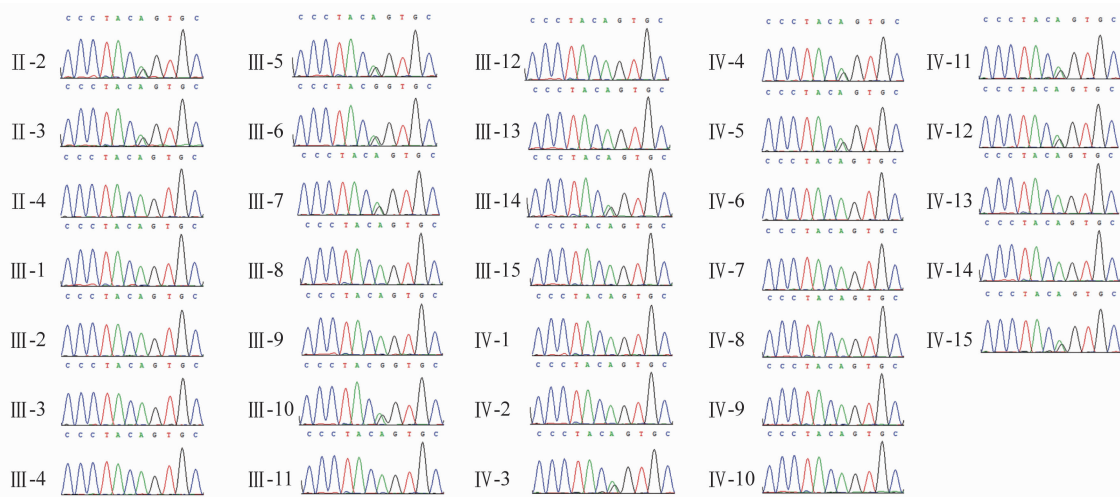


图2 GSDME 基因 Sanger 测序峰图(传代数和成员编号与家系图一致)

MYH9、*GSDME*、*MYO1A*、*MYO6* 等等,一般在生后第一个 10 年内发病,以高频率、进行性听力损失为特征^[4]。*GSDME* 基因相关耳聋为常显遗传性耳聋 5 型(deafness, autosomal dominant 5, DFNA5; OMIM# 600994)是一种常染色体显性遗传疾病,是由染色体 7p15.3 上的 *GSDME* 基因发生杂合突变引起的。*GSDME* 基因包含 10 个外显子,跨度约为 60kb^[9]。*GSDME* 编码 Gasdermin-E 蛋白,该蛋白是将非炎症性细胞凋亡转化为细胞焦亡的成孔蛋白的前体,在进行蛋白切割时,释放的 N 末端部分(Gasdermin-E, N 端)与膜结合并形成孔,引发细胞焦亡^[10]。DFNA5 患者多发病于儿童早期。此疾病是进行性的,临床症状表现为感知性耳聋,双耳在高频率声波波段听力受损,随着时间推移,听力损失扩大到较低频率声波波段并迅速加重^[8]。

本文我们描述了一个包含 36 个成员的超大家系,首先对“耳聋 30 年”的先证者行遗传性耳聋精选基因包检测,发现一个剪接位点致病变异 *GSDME*:c. 991-2A>G,后针对 33 个成员进行了 Sanger 测序验证,共发现 8 个家系成员携带该致病位点,且 8 位成员有 7 为重度或极重度耳聋,年龄最小的携带者则表现出轻度听力损失,符合 *GSDME* 基因异常引起的 DFNA5 特征。已故的 3 个成员中有一个亦是耳聋患者。另有 25 位家系成员未检出该剪接致病变异,且均未耳聋表现。所有阳性位点均为杂合突变,符合孟德尔显性遗传的特点。该家系为 *GSDME*:c. 991-2A>G 位点所报道的超大家系,同时也是 *GSDME* 基因突变所报道的超大家系,家系中包含的患者人数最多(9 个)。

本研究发现的位点 *GSDME*:c. 991-2A>G 是一个新型的剪接位点变异,位于 mRNA 剪接区域,核苷酸序列高度保守,并且多种计算辅助算法也预测这个变化可能会影响剪接功能。这个变异在中国一个晚发型进行性非综合征耳聋家系的多个患者中被检出,临床表现为高频听力受影响,并随着年龄增长而加重,突变携带者有表现差异性^[11]。到目前为止,这个变异在我们的参考人群基因数据库(gnomAD)中未见人群频率记录。综上所述,进一步结合送检者的临床表现和家系分析,依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)变异分类指南,这个变异暂定为“II 类-可能致病”。即具有较为充分的证据表明该变异是引起该家系成员耳聋的病因。

综上所述,本研究利用二代测序技术成功鉴定了一种导致晚发型非综合征型耳聋的剪接位点变异,并利用 Sanger 测序技术,从 33 个家系成员中确诊了 8 个 DFNA5 患者,并且根据变异致病性分析,确认此突变即为上文所述家系的遗传学病因。此家系为迄今报道的超大家系,丰富了遗传性耳聋的病因信息。二代测序技术为耳聋分子诊断提供一套可行的新方法。

参考文献

- [1] KOFFLER T, USHAKOV K, AVRAHAM KB. Genetics of deafness: Syndromic[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2015, 48(6): 1041-1061.
- [2] CHEN G, YI X, CHEN P, et al. A large-scale newborn

- hearing screening in rural areas in China[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012, 76(12): 1771-1774.
- [3] SMITH RJ, BALE JJ, WHITE KR. Sensorineural deafness in children[J]. *Lancet*, 2005, 365(9462): 879-890.
- [4] TAYLOR KR, DELUCA AP, SHEARER AE, et al. AudioGene: predicting deafness genotypes from phenotypes to guide genetic screening[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(4): 539-545.
- [5] SLOAN-HEGGEN CM, BIERER AO, SHEARER AE, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with deafness[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(4): 441-450.
- [6] GARCÍA-GARCÍA G, BERZAL-SERRANO A, GARCÍA-DÍAZ P, et al. Improving the management of patients with deafness by the implementation of an NGS panel in clinical practice[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(12):1467.
- [7] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405-424.
- [8] SHEARER AE, HILDEBRAND MS, SMITH RJH, et al. Hereditary deafness and Deafness Overview [M]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1999.
- [9] LAER LV, HUIZING EH, VERSTREKEN M, et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5[J]. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 194-197.
- [10] WANG Y, GAO W, SHI X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99-103.
- [11] CHAI Y, CHEN D, WANG X, et al. A novel splice site mutation in DFNA5 causes late-onset progressive non-syndromic deafness in a Chinese family[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78(8): 1265-1268.

(收稿日期:2022-01-08)

编辑:宋文颖

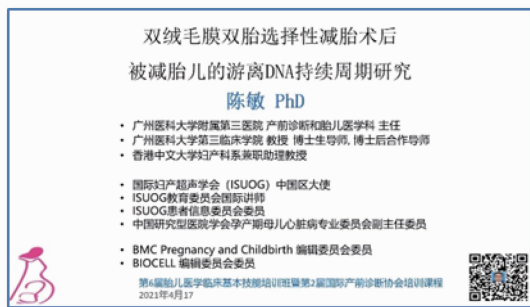
· 视频导读 ·

双绒毛膜双胎选择性减胎术后被减胎儿的游离 DNA 持续周期研究

陈敏

(广州医科大学附属第三医院 产前诊断和胎儿医学科, 广东 广州 510150)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2022.01.014



来自广州医科大学附属第三医院的陈敏教授在本时评中介绍了“双绒毛膜双胎选择性减胎术后被减胎儿的游离 DNA 持续周期研究”。

无创产前检测 (non-invasive prenatal testing, NIPT) 可作为双胎早期染色体非整倍体的一线筛查技术。而双胎之一死亡的发生率高达 6.2%, 死亡胎儿的游离 DNA 进入母血循环, 导致 NIPT 产生假阳性结果。陈敏教授团队通过对 5 例双胎之一胎儿非整倍体的孕妇血浆进行

NIPT, 监测双胎中死亡胎儿及存活胎儿游离 DNA 浓度的变化情况, 定性分析死亡胎儿游离 DNA 在孕妇血浆中的残留情况, 分析死亡胎儿游离 DNA 浓度变化如何影响双胎 NIPT 检测准确性。通过选择性减胎样本模拟自然消失双胎, 验证消亡胎儿对 NIPT 假阳性结果的影响。研究发现, 双胎减胎后 7~9 周, 血浆胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cffDNA) 胎儿浓度达到峰值, 之后逐渐下降, 在孕晚期降为 0, 该趋势变化的原因可能是减胎手术后胎儿与母体胎盘灌注发生改变而影响胎盘自溶率。孕 14~17 周选择性减胎的孕妇, 血浆残留 cffDNA 会导致 NIPT 产生假阳性结果, 一直持续到减胎后 16 周。因此, 不推荐妊娠早中期发生了胎儿死亡的双胎孕妇进行 NIPT 检测, 12 周后减胎者, 先完成 NIPT 和超声检查后再减胎。