

203例非综合征型耳聋患儿耳聋基因突变分析

黄东群

郴州市第一人民医院产前诊断中心

DOI:10.12238/bmtr.v6i3.7518

[摘要] 目的: 分析湖南省郴州市非综合征型耳聋(NSHL)患儿常见耳聋基因筛查及耳聋基因panel测序结果,为本地区耳聋防控及遗传咨询提供参考。方法: 选取2019年至2022年12月期间于郴州市第一人民医院确诊为双耳重度极重度非综合征型耳聋患儿203例为研究对象,采用联合探针锚定聚合测序法,针对常见22个耳聋基因的159个突变位点进行初筛,然后对筛查结果阴性或单杂和突变携带者进行218个耳聋基因panel检测。结果: 203例NSHL患者经初步筛查共检出GJB2基因突变50例,SLC26A4基因突变23例,线粒体DNA12SrRNA基因突变5例,双基因携带2例,确诊48例受检者为遗传性耳聋; 24例受检者进行了耳聋基因panel二次检测,检测新增GJB2基因致病突变9例,POU3F4基因致病突变1例,检测其他致病基因MYO7A、COL4A6、POU3F4、DLAPH3、TECTA、DMXL2,确诊10例受检者为遗传性聋。初筛及复筛累计检出9个致聋基因,其中GJB2及SLC26A4基因最常见,检出率分别达28.57%(58/203)、11.82%(24/203),其他依次为MT-RNR1(2.46%)、MYO7A(1.97%)、COL4A6(0.99%)、POU3F4(0.49%)、DLAPH3(0.49%)、TECTA(0.49%)、DMXL2(0.49%)。结论: GJB2及SLC26A4基因是郴州市NSHL患者最常见的耳聋突变基因,c.109G>A位点检出率较高,应将其纳入郴州地区热点突变初筛范畴,以进一步提高初筛的阳性检出率。对初筛检测阴性或单杂合突变患者,应进行耳聋基因panel检测,以明确病因。

[关键词] 非综合征型耳聋; 遗传性耳聋; 高通量测序

中图分类号: R764.43 文献标识码: A

Analysis of Deafness Gene Mutations in 203 Non Syndromic Deafness Patients

Dongqun Huang

Prenatal Diagnosis Center of the First People's Hospital of Chenzhou City

[Abstract] Objective To analyze the mutation sites of common deafness genes and panel sequencing in non-syndromic deafness patients, providing reference for prevention and control of deafness and genetic counseling in Chenzhou. Methods Common pathogenic genes and loci were detected by the combined probe anchored polymerization sequencing, followed by detection of 216 deafness-related genes by target area capture sequence. Results Preliminary screening in the 203 patients revealed pathogenic mutations of the GJB2 gene (n=50), SLC26A4 gene (n=23), MT-RNR1 (n=5), and Dual gene carrier (n=2), 48 confirmed cases of hereditary hearing loss; 24 patients underwent secondary panel testing for the deafness gene, including 9 new GJB2 gene pathogenic mutations and 1 POU3F4 gene pathogenic mutation. Other pathogenic genes MYO7A, COL4A6, POU3F4, DLAPH3, TECTA, and DMXL2 were detected, and 10 patients were diagnosed with hereditary deafness. Nine deafness causing genes were detected through initial and secondary screening, with GJB2 and SLC26A4 genes being the most common with detection rates of 28.57% (58/203) and 11.82% (24/203), respectively. The other genes were MT-RNR1 (2.46%), MYO7A (1.97%), COL4A6 (0.99%), POU3F4 (0.49%), DLAPH3 (0.49%), TECTA (0.49%), and DMXL2 (0.49%), respectively. Conclusion GJB2 genes and SLC26A4 genes are the most common deafness mutation genes in NSHL patients in Chenzhou City. The detection rate of c.109G>A is high, and they should be included in the preliminary screening of hot spot mutations in Chenzhou to further improve the positive detection rate of the preliminary screening. For patients with negative or single heterozygous mutations in the initial screening test, a panel test for the deafness gene should be performed to determine the cause.

[Key words] Non-syndromic Deafness; Hereditary Hearing Loss; High throughput sequencing

引言

耳聋是人类最常见感觉障碍性疾病,是严重影响人类生活质量的疾病。2012年残疾人联合信息中心调查显示,国内残疾人中有2054万听力残疾者,占残疾人总数24.15%。耳聋的治疗、康复给患儿家庭带来了沉重的经济负担,如何防聋成为一项重大的医学问题及社会问题。

耳聋病因包括遗传因素、环境因素,或两者共同作用而导致。有研究表明,60%耳聋的发生与遗传相关,目前已发现的致聋基因有200多个,且具有遗传异质性及地区分布差异性。准确评估耳聋患者是否为遗传因素所致,是解决防聋问题的根本。本研究以非综合征型双耳重度极重度耳聋患儿为研究对象,旨在明确其致病基因,提高诊断率的同时尽可能的降低患儿家庭经济负担,探索适合本地地区的耳聋基因筛查策略。

1 资料与方法

1.1 研究对象。选取2019年至2022年12月期间于郴州市第一人民医院确诊为双耳重度极重度非综合征型耳聋患儿203例为研究对象,年龄分布于1岁-16岁之间,男女比例109:94。本研究通过郴州市第一人民医院伦理审查委员会审查。研究前受检者父母或监护人均签署耳聋基因检测知情同意书,并填写患者基本信息、家族史、用药史等。首先采用目标区域捕获高通量测序技术对22个常见耳聋基因159个突变位点进行检测,随后在患者知情同意下,对检测阴性病例进行全外显子测序。

1.2 22个常见耳聋基因159个突变位点检测。采集所有研究对象外周静脉血2-3ml, EDTA抗凝,参照磁珠提取纯化试剂盒使用说明提取受检者DNA备检。利用多重PCR技术扩增目的片段,采用联合探针锚定聚合测序法对中国人群常见的22个耳聋基因159个位点进行检测。22个基因分别为GJB2、CDH23、MYO15A、TMC1、WHRN、OTOF、PJKV、SLC26A4、KCNJ10、WFS1、SOX10、MYO7A、PCDH15、USH1G、GJB3、COL11A1、GSDME (DFNA5)、DSPP、TCOF1以及线粒体基因MT-RNR1、MT-TL1及MT-TS1,其159个位点均为致病突变位点和疑似致病突变位点。

1.3 耳聋基因panel检测。经常见耳聋基因筛查为单杂合突变或阴性患者,知情选择进行遗传性耳聋多基因 panel行进一步的耳聋基因检测,该panel的检测范围包括218个耳聋基因的外显子区(不包括启动子区等非编码区)、外显子相邻20bp的内含子区中的点突变、小的缺失插入突变(20bp以内)以及外显子水平的缺失重复变异。首先进行将DNA打断并制备文库,然后通过芯片对目标基因编码区及临近剪切区的DNA进行捕获和富集,最后使用高通量测序平台进行突变检测。检测范围为基因的根据测序结果对突变位点进行注释和临床解读。根据2015年美国遗传学与基因组学学会(America College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)遗传变异分类标准与指南,对变异性质进行分类。对于所有发现的致病突变,在其所在片段上下游设计引物。进行PCR扩增,对产物做Sanger测序,所得结果与目标基因标准靶序列进行比对,从而验证基因芯片捕获和高通量测序的结果。

1.4 父母基因验证。对所有进行耳聋基因筛查及耳聋panel基因检测阳性的患者父母运用Sanger测序进行变异来源检测,进行共分离分析。

2 结果

2.1 常见耳聋基因检测结果。本研究对203例受检者进行遗传性耳聋基因22个基因159个位点检测,检出基因突变76例(37.44%, 76/203),明确诊断为遗传性耳聋者48例(23.65%, 48/203),其中纯合突变24例,占总受检例数11.82%(24/203),复合杂合突变20例,占总受检例数9.85%(20/203)。

本研究76例基因突变患儿中,GJB2基因突变50例,占总受检人数的24.63%(50/203),SLC26A4基因突变23例,占总受检人数的11.33%(23/203),c.235delC为最常见突变位点,突变携带率17.73%(36/203)。检出2例双基因携带的耳聋患者,线粒体DNA 12SrRNA基因突变5例(2.46%, 5/203),未检出GJB3基因及其他基因突变(表1)。

2.2 耳聋基因panel检测结果。对所有受检者遗传咨询,24例未明确遗传学病因患儿知情选择耳聋基因panel测序,检测结果纯阴性6例,18例检测结果阳性(见表2),耳聋基因panel检出GJB2c.109G>A纯合变异6例,GJB2c.299-300delAT/c.109G>A复合杂合1例,GJB2c.235delC/c.109G>A1例,GJB2c.109G>A/c.139G>T1例,POU3F4基因疑似致病变异1例。10例受检者进一步明确为遗传性耳聋,2例患儿家庭未进行基因验证。

2.3 基因检测总体情况。经两次检测后,本研究确诊58例受检者为遗传性耳聋,总体检出率28.57%。

3 讨论

在我国GJB2、SLC26A4和线粒体12SrRNA基因是导致遗传性耳聋最主要的致病基因^[1],临床上常见的遗传性耳聋基因检测包主要也是针对此4个基因的20个热点突变位点进行筛查与诊断,随着检测技术的飞速发展,耳聋基因panel以及全外显子测序技术一次性可以检测出更多的基因,逐步在临床广泛运用。本研究对耳聋患儿先进行22个遗传性耳聋基因159个热点突变位点进行检测,对单杂合突变患者及检测阴性患者进行耳聋基因panel测序,从而了解本地区耳聋基因的突变频率和遗传特征,以便有针对性、有依据性地制定本地区遗传性耳聋防治工作规划。

本研究对203例重度极重度耳聋患儿分两阶段先后对常见22个耳聋基因159个热点突变进行初筛,然后进行耳聋基因panel测序复筛检测模式,共检出遗传性耳聋58例,涉及9个耳聋基因,其中GJB2及SLC26A4基因最常见,检出率分别达28.57%(58/203)、11.82%(24/203),其他依次为MT-RNR1(2.46%)、MYO7A(1.97%)、COL4A6(0.99%)、POU3F4(0.49%)、DLAPH3(0.49%)、TECTA(0.49%)、DMXL2(0.49%)。这与燕志强^[2]、袁永一^[3]等检出的常见的常染色体隐性耳聋基因类型有所区别,这可能与本研究中只有部分患儿进行了耳聋基因panel检测有一定相关性,也有可能是因为耳聋基因分布存在一定的地域差异性。

表1 76例遗传性耳聋基因突变类型

基因型	突变位点	突变类型	遗传方式	例数	检出率
GJB2	c. 235delC	纯合	常隐	16	7.88%
	c. 235delC/ c. 299_300delAT	复合杂合	常隐	6	2.96%
	c. 235delC/ c. 176_191del	复合杂合	常隐	3	1.48%
	c. 299_300delAT/ c. 176_191del	复合杂合	常隐	4	1.97%
	c. 299_300delAT ^a	杂合	常隐	6	2.96%
	c. 139G>T	杂合	常隐	2	0.99%
	c. 176-191del	杂合	常隐	1	0.49%
	c. 235delC	杂合	常隐	11	5.42%
	c. 551G>A	杂合	常显	1	0.49%
SLC26A4	c. 1229C>T	纯合	常隐	3	1.48%
	c. 919-2A>G ^b	纯合	常隐	4	1.97%
	c. 1707+5G>A	纯合	常隐	1	0.49%
	c. 2162C>T/ c. 2168A>G	复合杂合	常隐	2	0.99%
	c. 919-2A>G/ c. 1229C>T ^a	复合杂合	常隐	1	0.49%
	c. 919-2A>G/ c. 1692dupA	复合杂合	常隐	2	0.99%
	c. 2168A>G/ c. 1343C>A	复合杂合	常隐	1	0.49%
	c. 2168A>G/c. 919-2A>G	复合杂合	常隐	1	0.49%
	c. 1692dupA	杂合	常隐	4	1.97%
	c. 919-2A>G	杂合	常隐	4	1.97%
MT-RNR1	m. 1555A>G	同质突变	母系遗传	3	1.48%
	m. 1494C>T	同质突变	母系遗传	1	0.49%
	m. 961T>C ^b	异质突变	母系遗传	1	0.49%

注: a、b为双基因杂合变异携带者

GJB2耳聋基因被认为是对人群危害最大的耳聋基因,其变异谱在不同种族之间存在差异,在中东地区、欧洲南部、美国中西部等地区最常见的变异位点为c. 35delG,在以色列最常见的变异位点是c. 167delT^[4-6];我国最常见的是c. 235delC变异位点,本研究检出率17.73%,高于本地区既往报道^[7](13.63%)。本研究结果显示,GJB2基因在本地区的主要突变位点为:c. 235delC(17.73%)、其次为c. 299—300delAT(7.88%)、c. 109G>A(4.43%)、c. 176_191del(3.94%),本研究中c. 109G>A突变位点携带率高于c. 176_191del,这与既往的研究报道不一致^[2],与张艳红^[8]等研究一致。GJB2基因c. 109G>A位点为马来西亚、泰

国和印度尼西亚检出率最高的GJB2基因变异位点^[9],在我国及日本的检出率仅低于c. 235delC。研究显示c. 109G>A主要与迟发性耳聋相关^[10],c. 109G>A纯合变异听力表型可为正常,与c. 235delC及c. 299—300delAT形成复合杂合变异可导致轻中度听力感音性神经性耳聋^[11],本地区在听力正常人群中检出c. 109G>A纯合变异^[12],而本研究在重度极重度耳聋患者中c. 109G>A的检出率4.43%,仅次于c. 235delC及c. 299—300delAT两个位点,其中1例c. 109G>A纯合变异、1例c. 109G>A/c. 235delC及1例c. 109G>A/c. 299—300delAT复合杂合变异均已行人工耳蜗植入术,这与既往研究结果存在差异,也可能是

表2 18例耳聋患儿耳聋基因 panel1 检测情况

病例号	基因	变异位点	杂合性	致病性	遗传方式	变异来源
1	<i>GJB2</i>	c.235delC	杂合	致病	常隐	父亲
	<i>MYO7A</i>	c.618C>T	杂合	致病	常隐/常显	母亲
2	<i>GJB2</i>	c.235delC	杂合	致病	常隐	母亲
	<i>MYO7A</i>	c.618C>T	杂合	致病	常隐/常显	父亲
3	<i>GJB2</i>	c.299-300delAT/c.109G>A	复合杂合	致病	常隐	父亲/母亲
4	<i>GJB2</i>	c.235delC/c.109G>A	复合杂合	致病	常隐	父亲/母亲
5	<i>GJB2</i>	c.109G>A/c.139G>T	复合杂合	致病	常隐	父亲/母亲
6	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
7	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
8	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
9	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
10	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
11	<i>GJB2</i>	c.109G>A	纯合	致病	常隐	父亲/母亲
12	<i>POU3F4</i>	c.530C>A	半合	疑似致病	X连锁隐性	母亲
13	<i>MYO7A</i>	c.4577G>A	杂合	意义未明	常显/常隐	父亲
14	<i>SLC26A4</i>	c.1692_1693insA	杂合	致病	常隐	父亲
	<i>DMXL2</i>	c.1907C>T	杂合	意义未明	常显	母亲
15	<i>COL4A6</i>	c.2849C>T	纯合	意义未明	X连锁隐性	父亲/母亲
16	<i>COL4A6</i>	c.2849C>T	纯合	意义未明	X连锁隐性	父亲/母亲
17	<i>DLAPH3</i>	c.2564G>A	杂合	意义未明	常显	未验证
	<i>MYO7A</i>	c.4804C>T	杂合	意义未明	常隐/常显	
18	<i>TECTA</i>	c.382G>A	杂合	意义未明	常显	未验证

c.109G>A相关耳聋的听力表型可受其他多因素影响而出现不同表型。因此, c.109G>A变异位点作为本地区的热点变异, 在下一步的耳聋防控中应该将其纳入筛查范畴, 并在以后的临床工作中引起重视。

本研究中检出5例线粒体12SrRNA基因突变, 突变率2.62%, 高于新疆地区^[13]。其中1例为m.961T>C位点突变与c.919-2A>G纯合突变双杂合突变, 该患者无耳毒性药物用药史, 颞骨CT检查

提示前庭水管扩大, 考虑c.919-2A>G纯合突变为致聋原因。

*MYO7A*基因与Usher综合征1B型、常染色体隐性遗传非综合征型耳聋2型及常染色体显性遗传非综合征型耳聋11型有关^[14]。本研究中检出4例*MYO7A*基因, 其中1例意义未明变异的父母未进行基因验证, 余3例经父母基因验证后来源于听力正常的父亲/母亲。既往有研究报道耳聋患者中检出*GJB2*/*GJB3*双基因双杂合变异致聋^[15], 考虑为*GJB2*基因与*GJB3*基因存在双基因遗

传模式。本研究中病例1和病例2中均检出GJB2基因与MYO7A基因双杂合致病变异,不排除存在双基因遗传模式的可能性,这与临床上鲜有MYO7A基因c.618C>T变异的报道有一定关系,也需后续进一步临床研究。

X染色体连锁遗传引起的非综合征耳聋,是一种罕见的遗传模式,约占遗传性耳聋的1-2%。目前已确定5个基因^[16]与X连锁遗传性耳聋相关,分别是PRPS1、POU3F4、SMPX、AIFM1及COL4A6,POU3F4是最常见的与X连锁听力损失相关的基因,约占50%^[17],本研究中检出2个X染色体连锁基因,病例12检出POU3F4基因c.530C>A变异,经父母验证来源于表型正常的母亲,已有该变异致病性的相关报道^[18],目前该变异根据美国医学遗传学和基因组学学院相关指南被判为疑似致病变异(PVS1+PP1+PP4),证据如下: PVS1: 当一个疾病的致病机制为功能丧失(LOF)时,检出变异为无义突变; PP1: 变异和疾病在家系中共分离; PP4: 变异携带者的表型或家族史高度符合某种单基因遗传疾病。病例15及病例16为一对同卵双胞胎女孩,耳聋基因panel检出COL4A6基因纯合,分别来源于父亲及母亲,其母亲有中度听力损失,佩戴助听器,父亲听力正常,这与X-连锁遗传性耳聋症状不相符,还需进一步行全外显子测序及扩大家系样本研究,以进一步明确致病基因。

GJB3是我国本土克隆的第一个与后天高频听力下降相关的基因,本研究中未发现该致病基因,可能与样本量较少有关。

本研究通过先进行常见热点突变位点筛查,筛查阴性患者再通过耳聋基因panel复测的模式,降低患儿家庭的经济负担的同时,提高病因诊断率,对了解本地区的耳聋基因的突变类型及频率,进一步优化本地区的耳聋防控策略以及耳聋防治工作具有指导意义。

[基金项目]

郴州市技术创新引导项目(1cy12021067)。

[参考文献]

- [1] DAI P, HUANG L H, WANG G J, et al. Concurrent hearing and genetic screening of 180,469 neonates with follow-up in Beijing, China[J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105(4): 803-812.
- [2] 燕志强, 孙岩, 郑桐. 徐州地区354例耳聋患者耳聋基因筛查及基因谱分析[J]. *中华耳科学杂志*, 2022, 20(02): 247-251.
- [3] YUAN Y, LI Q, SU Y, et al. Comprehensive genetic testing of Chinese SNHL patients and variants interpretation using ACMG guidelines and ethnically matched normal controls [J]. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28(2): 231-243.
- [4] KOOHIYAN M. Genetics of Hereditary Hearing Loss in the Middle East: A Systematic Review of the Carrier Frequency of the GJB2 Mutation (35deIG)[J]. *Audiology & neuro-otology*, 2019, 24(4).
- [5] PARZEFALL T, LUCAS T, KOENIGHOFER M, et al. The role of alternative GJB2 transcription in screening for neonatal

sensorineural deafness in Austria[J]. *Acta Oto-laryngologica*, 2017, 137(4): 356-360.

[6] Küçük K H, ALTUNTAS EE, Yıldırım ME, et al. The Analysis of GJB2, GJB3, and GJB6 Gene Mutations in Patients with Hereditary Non-Syndromic Hearing Loss Living in Sivas. *J Int Adv Otol*. 2019 Dec; 15(3): 373-378.

[7] 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(1): 12-16.

[8] 张艳红, 李娟娟, 曾宪海. 耳聋基因panel在耳聋基因诊断中的临床应用[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2022, 36(04): 27-34.

[9] FUKUNAGA I, SHIGA T, CHENG C, et al. Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p.V37I) mutation[J]. *Stem Cell Research*, 2020, 43.

[10] JIANG Y, HUANG S, ZHANG Y, et al. Evolutionary origin of pathogenic GJB2 alleles in China[J]. *Clin Genet*. 2022 Oct; 102(4): 305-313.

[11] DU Y, HUANG L, CHENG X, et al. Analysis of p.V37I compound heterozygous mutations in the GJB2 gene in Chinese infants and young children[J]. *Bioscience Trends*, 2016, 10(3): 220-226.

[12] 徐梦洁, 张昊晴, 李彩云, 等. 郴州市11055名育龄女性常见遗传性耳聋基因筛查结果分析[J]. *中华耳科学杂志*, 2020, 18(02): 328-333.

[13] 侯小娟, 丁伟, 张伦, 等. 新疆地区795例非综合征性耳聋患者A1555G和C1494T突变分析[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(3): 333-335.

[14] BOCHER S, TAI FWJ, DELMAGHANI S, et al. Ultrarare heterozygous pathogenic variants of genes causing dominant forms of early-onset deafness underlie severe presbycusis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(49): 31278-31289.

[15] HUANG S, HUANG B, WANG G, et al. The relationship between the GJB3 c.538C>T variant and hearing phenotype in the Chinese population[J]. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2017, 102: 67-70.

[16] DU W, HAN MK, WANG DY, et al. A POU3F4 mutation causes nonsyndromic hearing loss in a Chinese X-linked recessive family[J]. *Chinese medical journal*, 2017, 130(1): 88-92.

[17] CORVINO V, APISA P, MALESCI R, et al. X-Linked Sensorineural Hearing Loss: A Literature Review[J]. *Curr Genomics*. 2018 Aug; 19(5): 327-338.

[18] HUANG B, ZENG J, YUAN Y, et al. A novel mutation in POU3F4 in a Chinese family with X-linked non-syndromic hearing loss[J]. *Journal of otology*, 2015, 10(2): 78-82.