

研究论文

新生儿筛查发现的非综合征型耳聋病例及其家系进行*GJB2*基因全编码区变异分析

曹颖¹ 陈婕² 黄蓉¹ 周玉润² 赵胜科¹ 黄瑞丽² 傅碧妃³ 李红智^{1*}

(¹温州医科大学生命科学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325000; ²温州市人民医院, 温州市妇幼保健所, 温州 325000; ³温州医科大学第二临床学院, 温州 325000)

摘要 通过对温州地区新生儿听力筛查发现的遗传性非综合征型耳聋病例及其家系进行*GJB2*(gap junction beta 2)基因全编码区变异分析, 寻找致聋*GJB2*基因突变, 探讨*GJB2*基因复合变异的致聋性。该研究通过提取21个家系先证者及其57个家系成员的外周血基因组DNA, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增*GJB2*基因的全编码序列, 扩增产物经限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)初步筛查235delC, 然后对扩增产物进行DNA测序, 并进一步对序列变异进行生物信息学分析。结果显示, 21个非综合征型耳聋家系中, 7个家系确诊是*GJB2*基因突变所致, *GJB2*致聋基因突变类型包括235delC纯合、299-300delAT+109G>A复合杂合。还发现2个家系的*GJB2*基因变异可能致聋, 分别为79G>A+109G>A+341A>G复合杂合、79G>A纯合+558G>A杂合。但结果显示, 79G>A+341A>G复合杂合或复合纯合、235delC+79G>A复合杂合一般不足以致聋。以上结果表明, *GJB2*基因复合变异在非综合征型耳聋病例中常见。某些*GJB2*基因变异是否致聋具有明显遗传异质性。多态性变异的多重复合有时可能致聋。遗传背景和(或)环境因素可能参与*GJB2*基因变异的致聋性。

关键词 新生儿; 非综合征型耳聋; *GJB2*基因; 序列分析; 基因诊断

Analysis of the Sequence Variants in *GJB2* Gene Whole Coding Region for Patients and Their Pedigrees with Nonsyndromic Hearing Loss Detected by Screening of Newborns

Cao Ying¹, Chen Jie², Huang Rong¹, Zhou Yurun², Zhao Shengke¹, Huang Ruili², Fu Bifei³, Li Hongzhi^{1*}

(¹School of Life Science/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ²People's Hospital of Wenzhou City, Wenzhou Women and Child Health Care Institute, Wenzhou 325000, China; ³Wenzhou Medical College, School of 2nd Clinical Medicine, Wenzhou 325000, China)

Abstract To find deafness-causing mutations in *GJB2* gene and explore the clinical manifestation of deafness of compound variants in *GJB2* gene, the sequence variants in *GJB2* gene whole coding region were analyzed for patients and their pedigrees with inherited nonsyndromic hearing loss detected by hearing screening of

收稿日期: 2015-10-21 接受日期: 2016-01-08

浙江省人口计划生育科研项目(重点项目)(批准号: 2014ZDA036)和温州医科大学横向科研项目(批准号: 2014-337)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699656, E-mail: lhz@wmu.edu.cn

Received: October 21, 2015 Accepted: January 8, 2016

This work was supported by the Funds of Population and Family Planning Commission of Zhejiang Province (Grant No.2014ZDA036) and Wenzhou Medical University for Collaboration (Grant No.2014-337)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699656, E-mail: lhz@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-02-17 16:56:24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160217.1656.002.html>

newborns in Wenzhou. Genomic DNA extracted from peripheral blood of 21 probands and their 57 family members was used in this study. The whole coding sequence of *GJB2* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). For the amplified products, 235delC mutation was screened by restriction fragment length polymorphism (RFLP), then *GJB2* sequence variations were determined by DNA sequencing, and the resultant *GJB2* variants were further evaluated by bioinformatics analysis. The results demonstrated that the deafness-causing mutations in *GJB2* gene were identified in 7 of the 21 pedigrees with nonsyndromic hearing loss, including the types of 235delC homozygote and 299-300delAT+109G>A compound heterozygote. In other 2 pedigrees, compound variants in *GJB2* gene were found, which were probably pathologic, including 79G>A+109G>A+341A>G compound heterozygote and 79G>A homozygote+558G>A heterozygote, respectively. However, the results showed that compound heterozygote or compound homozygote 79G>A+341A>G, compound heterozygote 235delC+79G>A generally had not enough deafness-causing effect. The results proved that compound variants in *GJB2* gene were frequently seen in patients with nonsyndromic hearing loss. Whether some variants in *GJB2* gene could cause deafness significantly depended on genetic heterogeneity. Sometimes, polymorphisms might cause deafness when they were multiply combined. Environmental factors and genetic background may contribute to the clinical manifestation of deafness.

Keywords newborns; nonsyndromic hearing loss; *GJB2* gene; sequence analysis; gene diagnosis

耳聋在儿童中发生率为1%~3%^[1]。由温州市妇幼保健所进行的温州地区2013年度新生儿听力筛查结果表明,耳聋发生率高达3.22%。耳聋至少50%由遗传因素导致,其中约70%为非综合征型^[1]。对于遗传性耳聋的预防,明确耳聋病因是关键。目前虽已开发包含4个基因9个突变热点的基因芯片可用于检测遗传性耳聋^[2],但基因测序技术能发现除热点突变外的非热点变异,有助于明确耳聋病因^[3],特别是可进一步探讨一些复合变异的致病性。本研究对温州地区近年新生儿筛查发现的耳聋病例中的疑似遗传性非综合征型耳聋患儿,进行耳聋最常见致病基因*GJB2*的全编码区测序,检测基因变异的病例,并进一步对*GJB2*基因变异患儿的父母及其他家系成员进行测序检测,确定患儿基因变异的遗传来源,除确诊已知的隐性致病突变外,还探讨了一些复合杂合变异的致病性。

1 材料与方法

1.1 听力筛查、病例及家系

新生儿听力筛查流程:出生48 h后至出院前进行初筛,正常新生儿用耳声发射检查(otoacoustic emissions, OAE),高危因素新生儿则多用听性脑干反应(anaerobic baffled reactor, ABR)即脑干诱发电位检测;初筛不通过者,出生30 d内进行复筛;复筛不通过者,3个月内到指定诊治机构确诊,确诊后计入耳聋例数;6个月给予再次确诊。

本研究采用由温州市妇幼保健所提供的温州地区鹿城区2013年新生儿听力筛查发现的耳聋病例121例,其中大部分病例联系到了家属并签订了“耳聋基因检测知情同意书”。依据调查问卷及临床资料划分疑似遗传性耳聋和非遗传性耳聋病例,排除药物性致聋及其他明显环境因素致聋病例。进一步依据临床资料及遗传方式在遗传性耳聋病例中选择非综合征型耳聋。最终用于本研究*GJB2*基因检测的新生儿遗传性非综合征型耳聋先证者为21例,家系成员57人,合计78人。21个家系先证者听性脑干反应(ABR)检测结果除家系2为轻度(26~40 dBHL)外,其余家系均为重度(71~90 dBHL)、极重度或全聋(>91 dBHL)。21个家系中有耳聋家族史的4个,包括家系6、9、19和21。

1.2 DNA提取

抽取先证者及其家系成员外周静脉血2 mL于EDTA抗凝管中,用Universal DNA分离试剂盒(大连宝生物工程有限公司)提取全基因组DNA。

1.3 PCR扩增

*GJB2*基因上游引物为:5'-TAT GAC ACT CCC CAG CAC AG-3',下游引物为:5'-GGG CAA TGC TTA AAC TGG C-3'。引物由Invitrogen公司合成。参照野生型*GJB2*基因标准序列(NG_008358.1),PCR扩增范围为3 363~4 139,片段长度为777 bp。PCR反应体系:PCR mix(Vazyme公司) 12.5 μ L,引物各0.5 μ L(10 μ mol/ μ L),DNA 100 ng,加双蒸水至25 μ L。

在Labcycler PCR仪上进行PCR扩增, 扩增程序为: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 62 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 循环35次; 最后72 °C延伸10 min。

1.4 限制性片段长度多态性分析

在全编码区测序之前, 先应用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)判断*GJB2*基因最常见导致耳聋突变235delC存在与否。酶切反应: 10 μL *GJB2*基因PCR扩增产物加入10 U *Apa* I(TaKaRa公司), 37 °C水浴2 h。采用1%琼脂糖凝胶, 5 V/cm电泳30 min, 凝胶成像系统拍照。正常标本有*Apa* I酶切位点, 有两条带分别为511 bp和266 bp。c.235delC突变导致*Apa* I酶切位点消失, 纯合性突变只有1条带为777 bp, 杂合性突变有3条带, 分别为777 bp、511 bp和266 bp。

1.5 *GJB2*全编码区测序、变异分析

对*GJB2*基因PCR扩增产物进行纯化, 送华大基因公司进行Sanger测序, 每个标本均经双向测序确证结果。测序结果与NCBI网站的野生型*GJB2*基因标准序列(NG_008358.1)进行比对, 对其中整个编码区(位于外显子2中的CDS 3395-4075, 681 bp)进行变异分析。

1.6 生物信息学分析

错义突变所涉及氨基酸在Cx26蛋白二级结构中的位置根据Connexin-deafness主页。错义突变位点在23个物种系统发生中的氨基酸保守系数(conservation index, CI)采用Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行评估。错义突变的损伤性采用PolyPhen-2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>)和SIFT(<http://sift.jcvi.org/>)进行评估。

2 结果

2.1 先证者的*GJB2*基因变异及氨基酸改变的分布、变异型等位基因的频率

19个家系新生儿耳聋先证者的*GJB2*基因变异及相应氨基酸改变的分布见表1, 另外2个家系先证者因未发现任何变异故未在表1中列出。依据Connexin-deafness主页结合本研究的生物信息学及家系分析进行分类, 明确为多态性的基因型7种, 明确为致病的基因型2种, 未知是否致病的基因型2种。在21例先证者中, 8种变异型等位基因频率分别为: 235delC(12/42)为28.57%, 79G>A(12/42)为28.57%,

表1 先证者的*GJB2*基因变异及氨基酸改变的分布

Table 1 Distribution of *GJB2* gene variations and amino acid changes of probands

基因变异*	氨基酸改变	例数(基因型类型)
Gene variations*	Amino acid changes	Number of proband (types of genotype)
Polymorphisms		
c.79G>A heterozygote	p.V27I	1 (heterozygote)
c.79G>A heterozygote+c.341A>G heterozygote	p.V27I+p.E114G	3 (compound heterozygote)
c.79G>A homozygote+c.341A>G homozygote	p.V27I+p.E114G	1 (compound homozygote)
c.608T>C heterozygote	p.I203T	2 (heterozygote)
c.79G>A heterozygote+c.341A>G heterozygote+c.608T>C heterozygote	p.V27I+p.E114G+p.I203T	1 (compound heterozygote)
c.79G>A homozygote+c.341A>G heterozygote+c.368C>A heterozygote	p.V27I+p.E114G+p.T123N	1 (compound variant)
c.109G>A heterozygote	p.V37I	1 (heterozygote)
Pathogenic mutations		
c.235delC homozygote	Frameshift mutation	6 (homozygote)
c.109G>A heterozygote+c.299delAT heterozygote	p.V37I+frameshift mutation	1 (compound heterozygote)
Changes with unknown relation to disease		
c.79G>A heterozygote+c.109G>A heterozygote+c.341A>G heterozygote	p.V27I+p.V37I+p.E114G	1 (compound heterozygote)
c.79G>A homozygote+c.558G>A heterozygote	p.V27I+p.T186T	1 (compound variant)

*分类依据: Connexin-deafness主页结合本研究的生物信息学及家系分析。

*Classified according to Connexin-deafness mainpage, combined with bioinformatics and pedigree analysis of this study.

341A>G(8/42)为19.05%, 608T>C(3/42)为7.14%, 109G>A(3/42)为7.14%, 299delAT(1/42)为2.38%, 368C>A(1/42)为2.38%, 558G>A(1/42)为2.38%。

2.2 错义突变功能效应的生物信息学分析

在21例先证者中发现的5种错义突变氨基酸在Cx26蛋白二级结构中的位置: V27I、I203T和V37I分别位于穿膜域TM1、TM4和TM1, 而E114G和T123N均位于胞内环IC2。5个发生错义突变的位点在23个物种系统发生中的氨基酸保守性系数(CI)分别为: 79G>A(V27I)为100%, 341A>G(E114G)为91.30%, 608T>C(I203T)为95.65%, 109G>A(V37I)为100%, 368C>A(T123N)为39.13%。其中, 4个CI大于90%的为高度保守, 1个CI小于60%的保守性一般。PolyPhen-2分析显示, V27I、V37I和I203T错义突变为损伤性突变, 其余2种为良性突变或可耐受性突变。SIFT分析显示, I203T错义突变为损伤性突变, 其余4种为良性突变或可耐受性突变。

2.3 *GJB2*基因发生致病突变和可能致病变异的家系中基因型与表现型关系

21个家系中, *GJB2*基因发生致病突变和可能致病变异的有9个家系(表2), 其中, 6个家系先证者确诊为235delC纯合致聋(占28.57%), 1个家系先证者确诊为109G>A+299-300delAT复合杂合致聋(占

4.76%), 其余2个家系先证者变异可能致病, 能够确诊*GJB2*突变致聋的占33.33%(7/21)。家系6、7、10、13、19、21先证者确诊为235delC纯合致聋(家系6、19、21的系谱图及部分成员基因型见图1), 其中家系19、21的父、母均为235delC纯合耳聋, 已经检测的祖父母、外祖父母均为携带者, 另外家系6、7、10、13的父、母均为235delC携带者。以上6个家系的235delC遗传均符合常染色体隐性(autosomal recessive, AR)遗传, 但家系6的235delC携带者母亲为耳聋, 有待讨论235delC杂合致聋的可能性。家系15先证者为109G>A+299delAT, 确诊为2个致病位点的复合杂合致聋, 遗传自父亲的109G>A杂合和母亲的299delAT杂合, 符合AR遗传。家系10父亲235delC杂合+109G>A杂合, 家系15母亲235delC杂合+299delAT杂合, 均为2个致病位点的复合杂合, 但却均未表现耳聋。家系3先证者与家系8母亲同样为79G>A纯合+341A>G纯合, 但后者并不耳聋, 基于本课题组已研究发现, 家系3先证者*SLC26A4*基因存在肯定的致聋突变, 故推测79G>A纯合+341A>G纯合为多态性变异。家系4先证者79G>A纯合+558G>A杂合, 但其母亲79G>A杂合+558G>A杂合并并不耳聋, 有待讨论558G>A的致聋性。家系8先证者79G>A+109G>A+341A>G三重复合杂合是否为致

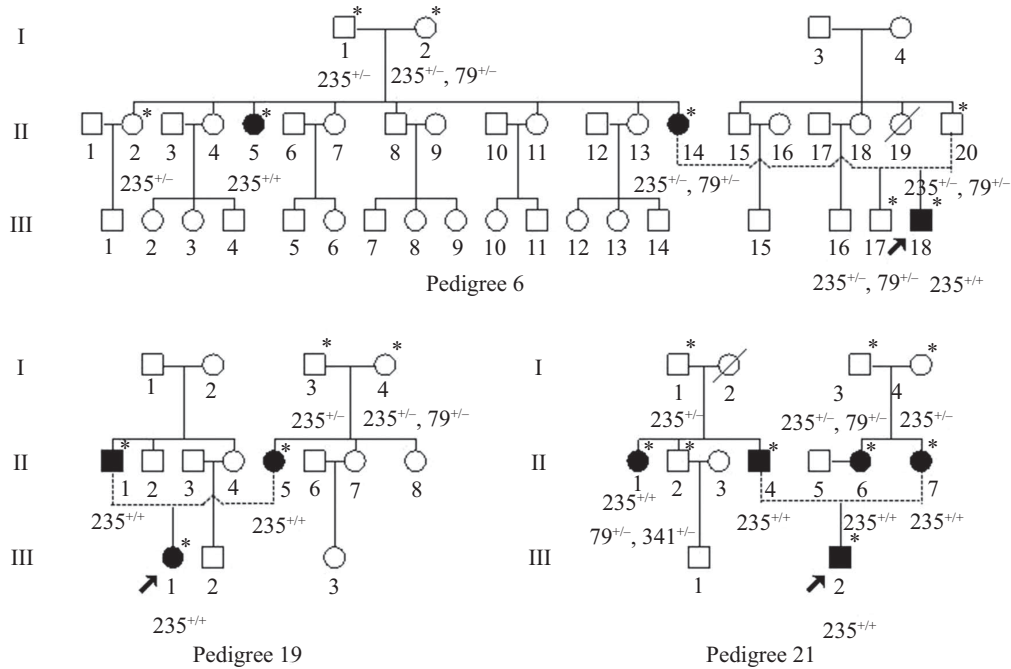
表2 *GJB2*基因发生致病突变和可能致病变异的家系的遗传情况

Table 2 The heredity in pedigrees with *GJB2* gene pathologic mutations or possible pathologic variants

家系 Pedigrees	先证者基因型 Genotypes of proband	父亲基因型(表型*) Genotypes of father (phenotypes*)	母亲基因型(表型*) Genotypes of mother (phenotypes*)
4	79G>A homozygote, 558G>A heterozygote	79G>A heterozygote, 341A>G heterozygote	79G>A heterozygote, 235delC heterozygote, 558G>A heterozygote
6	235delC homozygote	235delC heterozygote, 79G>A heterozygote	235delC heterozygote, 79G>A heterozygote (hearing loss)
7	235delC homozygote	235delC heterozygote	235delC heterozygote, 79G>A heterozygote
8	79G>A heterozygote, 109G>A heterozygote, 341A>G heterozygote	109G>A heterozygote	79G>A homozygote, 341A>G homozygote
10	235delC homozygote	235delC heterozygote, 109G>A heterozygote	235delC heterozygote
13	235delC homozygote	235delC heterozygote	235delC heterozygote, 79G>A heterozygote
15	109G>A heterozygote, 299delAT heterozygote	79G>A heterozygote, 109G>A heterozygote, 341A>G heterozygote	79G>A heterozygote, 235delC heterozygote, 299delAT heterozygote
19	235delC homozygote	235delC homozygote (hearing loss)	235delC homozygote (hearing loss)
21	235delC homozygote	235delC homozygote (hearing loss)	235delC homozygote (hearing loss)

*表型未注明的均为正常。

*The phenotype without an illustration was normal.

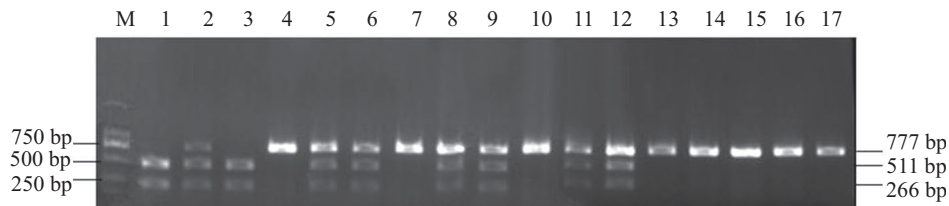


*表示标有基因型的成员; 235^{+/-}: 235delC杂合; 235^{+/+}: 235delC纯合; 79^{+/-}: 79G>A杂合; 341^{+/-}: 341A>G杂合。

*The member illustrated with genotype; 235^{+/-}: 235delC heterozygote; 235^{+/+}: 235delC homozygote; 79^{+/-}: 79G>A heterozygote; 341^{+/-}: 341A>G heterozygote.

图1 代表性家系及耳聋有关成员基因型

Fig.1 The representative pedigrees and genotypes of deafness related family members



M: marker为DL2000; 1~3: 家系4父亲、母亲、先证者; 4: 家系6先证者; 5~7: 家系7父亲、母亲、先证者; 8~10: 家系10父亲、母亲、先证者; 11~13: 家系13父亲、母亲、先证者; 14~15: 家系19母亲、先证者; 16~17: 家系21父亲、先证者。

M: marker of DL2000; 1~3: the father, mother and proband of pedigree 4; 4: the proband of pedigree 6; 5~7: the father, mother and proband of pedigree 7; 8~10: the father, mother and proband of pedigree 10; 11~13: the father, mother and proband of pedigree 13; 14~15: the mother and proband of pedigree 19; 16~17: the father and proband of pedigree 21.

图2 代表性标本*GJB2*基因PCR产物经*Apa I*酶切后琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 *GJB2* gene PCR products of representative subjects digested by *Apa I* and analyzed by agarose gel electrophoresis

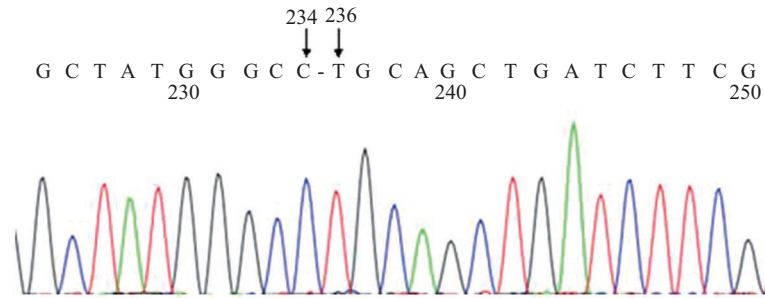
聋原因未知。

*GJB2*基因PCR产物经限制酶切初步筛查235delC纯合患者和235delC杂合携带者, 代表性标本琼脂糖凝胶电泳图见图2。确诊致病突变家系先证者的*GJB2*基因PCR产物测序图见图3和图4。考虑到论文篇幅, 其他家系先证者的*GJB2*基因PCR产物测序图未附。

3 讨论

目前, 在耳聋基因检测中主要采用的方法

包括基因测序、限制性酶切、基因芯片、变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)和高分辨率熔解(high resolution melting, HRM)曲线等。基因测序技术是迄今为止分子诊断学中基因突变检测的金标准, 具有技术平台标准化、结果直观、准确率极高等优点, 可对任意基因进行全序列分析, 因此, 除应用于已知耳聋基因检测外也适用于新耳聋基因及突变的检测和发现^[3]。限制性酶切主要适用于对特定已知突变的大样本进行检测, 成本较低。目前虽已开发基

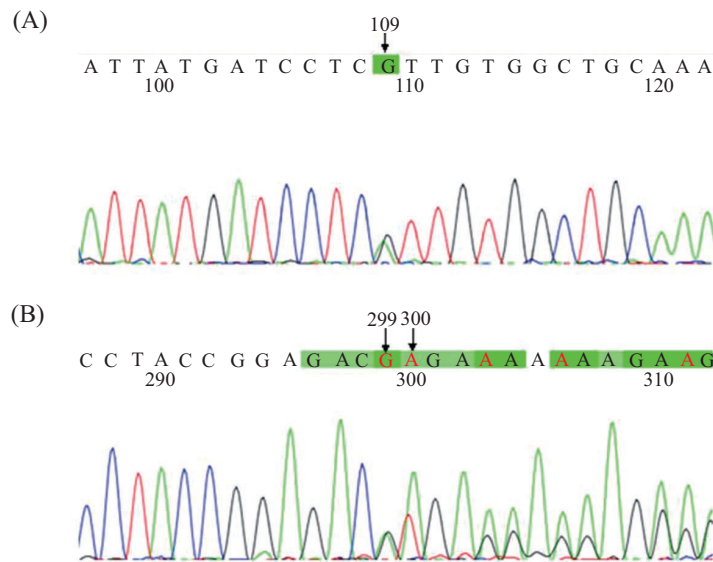


均为c.235delC纯合突变, 以其中1个先证者的测序图为代表。

All of the results were c.235delC homozygotes, represented by the result of one of the probands.

图3 家系6、7、10、13、19、21先证者的*GJB2*基因PCR产物测序图

Fig.3 Sequencing for *GJB2* gene PCR products of the probands of pedigree 6, 7, 10, 13, 19 and 21



A: c.299-300delAT杂合突变; B: c.109G>A杂合突变。

A: c.299-300delAT heterozygote; B: c.109G>A heterozygote.

图4 家系15先证者的*GJB2*基因PCR产物测序图

Fig.4 Sequencing for *GJB2* gene PCR product of the proband of pedigree 15

因芯片检测遗传性耳聋, 设计中包含有4个基因的9个突变热点: *GJB2*(35delG、176del16、235delC、299delAT)、*GJB3*(538C>T)、*SLC26A4*(IVS7-2A>G、2168A>G)、12S rRNA(1555A>G、1494C>T)^[2], 但成本相对较高、准确性难保证, 且不能检测到其他非热点突变。DHPLC和HRM是近年发展起来的新型基因突变检测技术, 但仪器、技术相对要求高, 且更适合应用于特定耳聋基因或已知突变位点的检测。本研究先采用限制性酶切(PCR-RFLP)方法对*GJB2*基因最常见突变235delC进行检测, 然后再采用测序方法对*GJB2*基因全编码区进行检测, 除能发现热点突变外还能发现所有非热点突变, 特别是因此可以进一步探讨一些复合变异的致病性, 少见报道。

*GJB2*基因编码的Cx26蛋白在耳蜗内呈高水平表达, 与相邻细胞的缝隙连接蛋白组成一个完整的缝隙连接通道。这些通道在信息传递和物质交换中起重要作用, 是电解质、第二信使和代谢产物在细胞间转换的重要通道^[4]。*GJB2*基因突变后, 使钾离子回流进入内淋巴的循环受到影响, 导致感音神经性耳聋。中国非综合征型耳聋中*GJB2*基因最常见的突变为235delC。本研究结果, 21个家系中*GJB2*基因发生致病突变和可能致病变异的有9个家系, 其中6个家系先证者确诊为235delC纯合致聋, 1个家系先证者确诊为109G>A+299-300delAT复合杂合致聋, 其余2个家系先证者变异可能致病。21例先证者中, 能够确诊为*GJB2*突变致聋的占33.33%, 较一般报道的遗传性非综合征型耳聋20%左右由*GJB2*突变引

起^[2]为高, 其中确诊为235delC纯合致聋的占28.57%, 较一般报道的遗传性非综合征型耳聋15%左右由235delC纯合突变引起为高^[5], 表明本研究对遗传性非综合征型耳聋进行筛选的有效性, 提示温州地区的由*GJB2*基因以及235delC纯合致聋的概率有可能较高。本研究针对温州地区近年新生儿筛查发现的耳聋病例中的疑似遗传性非综合征型耳聋患儿, 进行耳聋最常见致病基因*GJB2*的检测, 发现基因突变的病例。根据*GJB2*主要为常染色体隐性遗传, 进一步对*GJB2*基因突变患儿的父母进行基因检测, 确定基因型。基于本研究的亲代*GJB2*基因诊断结果, 可以干预再发风险, 意义很大。如一些患儿父母被证实都是*GJB2*突变携带者, 其再发风险为25%, 则劝导其不再生育, 如非要再次生育, 则必须进行产前诊断, 切实有效地防止再生耳聋患儿。另外, 对基因突变家系中其他有遗传风险的成员, 也进行*GJB2*基因的检测, 进行婚育指导, 干预再发风险。

目前, 有关*GJB2*复合突变基因型与表现型关系的研究报道很少见, *GJB2*单杂合、复合杂合、复合纯合非综合征型耳聋患者的基因型、表现型及其相互关系有待进一步探讨。有报道, 中国*GJB2*单杂合突变非综合征型耳聋患者常见的突变类型为235delC杂合、299delAT杂合和176del16杂合, 以移码突变最常见, 其基因型相关的听力表现型多种多样, 临床表现大多数为双侧对称性极重度语前聋, A型及As型鼓室压图常见, ABR、OAEs、40Hz AERP、ASSR等是重要的检查方法, 颞骨CT可见内耳畸形^[6]。遗传异质性在*GJB2*基因表现尤为突出, 即使在同一家系中也存在从轻度到极重度听力损害的不同表现型, 表现型的多样性除与突变的形式、突变的位置等因素有关外, 可能还有许多未知的决定因素存在^[6]。表2显示, 家系6母亲基因型235delC杂合+79G>A杂合, 表现型耳聋, 但本研究结果中另有多名基因型同样为235delC杂合+79G>A杂合并未表现耳聋, 故推测235delC单杂合致聋的遗传背景并非与79G>A复合杂合, 235delC单杂合致聋显然存在遗传异质性, 有未知的决定因素存在。表2显示, 家系15先证者基因型为109G>A杂合+299delAT杂合, 其母亲基因型为79G>A杂合+235delC杂合+299delAT杂合并不表现耳聋, 表明109G>A与299delAT复合杂合是致聋原因, 此与Connexin-deafness主页所划分的109G>A+299delAT复合杂合为病理性突变的结论

一致, 且与Guan等^[7]、Minami等^[8]、Yu等^[9]研究结论一致。*GJB2*基因编码的Cx26的分子结构分析发现, 79G>A(V27I)、341A>G(E114G)位点分别位于Cx蛋白高度保守区的跨膜区TM1和胞内环IC2, 而这些区域可以通过影响电荷复合体的形成, 进一步影响Cx蛋白的相容性以及间隙连接通道pH值门控等方面的功能, 因此推测79G>A+341A>G复合杂合特别是复合纯合对Cx26蛋白功能有影响。有研究报道, 部分家系结果提示79G>A+341A>G复合杂合可能为致聋原因^[10-12]。也有研究报道, 79G>A单杂合、341A>G单杂合分别为病理性的突变^[13]。但多数报道认为, 79G>A单杂合、341A>G单杂合、79G>A+341A>G复合杂合均为多态性^[14-15]。国外报道, 79G>A+341A>G可能引起极重度非综合征型耳聋^[12], 而在中国人人群中, 79G>A+341A>G可能仅为多态, 且为中国人最最常见多态复合变异的方式^[15]。表1中, 将79G>A+341A>G非复合纯合(即复合杂合等)多例均归类为多态性。另将1例(家系3先证者)79G>A+341A>G复合纯合也归类为多态性, 因为本课题组经研究发现, 该先证者SLC26A4基因存在肯定的致聋突变, 况且家系8母亲同样为79G>A+341A>G复合纯合, 并不耳聋。表1中, 将c.79G>A杂合+c.109G>A杂合+c.341A>G杂合归类为是否致病未知, 因为c.109G>A为Connexin-deafness主页所划分的隐性致病突变, 而且有报道表明c.79G>A杂合+c.109G>A杂合+c.341A>G杂合与耳聋有关^[15], 所以推测该三重杂合突变有可能致病。本文表2中, 家系4先证者79G>A纯合+558G>A杂合, 但其母亲79G>A杂合+558G>A杂合并不耳聋。突变位点558G>A在Connexin-deafness主页中未见报道, 但在国内外最新文献有所报道^[16], 仍为功能未明确位点。

目前, 国内已有一些有关耳聋基因诊断的研究报道^[2,15]。本研究针对温州地区新生儿筛查发现的耳聋病例及家系, 未见类似报道。本研究根据新生儿筛查发现的耳聋病例的基因诊断结果, 进一步追溯其家系成员耳聋基因突变, 从而全地区地毯式预防耳聋再发风险。目前, 对于*GJB2*基因型与表现型关系的研究主要是横向的, 对于早期的听力学状况以及发病过程跟踪的纵向研究较少, 在新生儿听力筛查和基因诊断没有广泛开展之前, 难以对此类患者做出早期诊断, 以致不能对*GJB2*突变患者听力损

伤的自然发病过程有更深入的认识^[6]。相信本研究的新生儿听力筛查和基因诊断的推广应用将有助于GJB2基因型与表现型关系的深入研究,对于揭示耳聋发病机理以及临床基因诊断与咨询都具有重要作用。

参考文献 (References)

- 1 Yoshikawa S, Kawano A, Hayashi C, Nishiyama N, Kawaguchi S, Furuse H, *et al.* The clinical features of patients with the homozygous 235delC and the compound-heterozygous Y136X/G45E of the GJB2 mutations (Connexin 26) in cochlear implant recipients. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38(4): 444-9.
- 2 李 朔, 赵 炜, 欧阳奇琦, 俞冬熠. 青岛地区270例非综合征性耳聋患者耳聋相关基因突变分析. *中国优生与遗传杂志*(Li Shuo, Zhao Wei, OuYang Qiqi, Yu Dongyi. Mutation analysis for deafness genes with the patients of NSHL 270 cases in Qingdao area. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*) 2014; 22(10): 106-7.
- 3 Fang Y, Gu M, Wang C, Suo F, Wang G, Xia Y. GJB2 as well as SLC26A4 gene mutations are prominent causes for congenital deafness. *Cell Biochem Biophys* 2015; 73(1): 41-4.
- 4 Todt I, Hennies HC, Basta D, Ernst A. Vestibular dysfunction of patients with mutations of Connexin 26. *Neuroreport* 2005; 16(11): 1179-81.
- 5 Jiang H, Chen J, Shan XJ, Li Y, He JG, Yang BB. Prevalence and range of GJB2 and SLC26A4 mutations in patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Mol Med Rep* 2014; 10(1): 379-86.
- 6 王辉兵. GJB2单杂合突变非综合征型耳聋致病机制的研究. 北京: 解放军总医院耳鼻咽喉科研究所(博士论文)(Wang H. Study on underlying molecular mechanisms of monoallelic mutations of GJB2 gene in Chinese nonsyndromic hearing-impaired patients. Beijing: the people's liberation army general hospital otolaryngology research institutes) 2013; 29-60.
- 7 Zheng J, Ying Z, Cai Z, Sun D, He Z, Gao Y, *et al.* GJB2 mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in 1067 Han Chinese subjects with non-syndromic hearing loss. *PLoS One* 2015; 10(6): 1-12.
- 8 Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Taiji H, Morimoto N, *et al.* GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. *Gene* 2013; 532(1): 41-5.
- 9 Yu X, Chen BB, Xiang HJ, Nan BY, Zheng J, Zhang CQ, *et al.* Analysis of genotype-phenotype correlation for GJB2 in 221 non-syndromic deafness probands and their pedigrees. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2013; 48(12): 991-5.
- 10 周黎红, 郝子琪, 刘薇拉, 马云霞, 任立宏, 申 静, 等. GJB2基因V27I和E114G位点与耳聋相关性的研究. *中国优生与遗传杂志*(Zhou Lihong, Hao Ziqi, Liu Weila, Ma Yunxia, Ren Lihong, Shen Jing, *et al.* Association analysis between the sites V27I and E114G of GJB2 gene and hereditary deafness. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*) 2012; 20(12): 49-50.
- 11 Wang W, Cheng HB, Yang N, Shi YC, Liu JZ, Li Q, *et al.* Analysis of GJB2 gene and mitochondrial DNA A1555G mutations in 16 families with non-syndromic hearing loss. *Chin J Med Genet* 2012; 29(4): 388-92.
- 12 Bonyadi MJ, Fotouhi N, Esmaili M. Spectrum and frequency of GJB2 mutations causing deafness in the northwest of Iran. *Int J Pediatr Otorhi* 2014; 78(4): 637-40.
- 13 Li H, Wang B, Liu D, Wang T, Li Q, Wang W, *et al.* SNPscan as a high-performance screening tool for mutation hotspots of hearing loss-associated genes. *Genomics* 2015; 106(2): 83-7.
- 14 Choi SY, Lee KY, Kim HJ, Kim HK, Chang Q, Park HJ, *et al.* Functional evaluation of GJB2 variants in nonsyndromic hearing loss. *Mol Med* 2011; 17(5/6): 550-6.
- 15 Yu X, Chen BB, Xiang HJ, Nan BY, Zheng JZ, Chu Q, *et al.* Analysis of genotype-phenotype correlation for GJB2 in 221 non-syndromic deafness probands and their pedigrees. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2013; 48(12): 991-5.
- 16 Zhao FF, Ji YB, Wang DY, Lan L, Han KM, Li Q, *et al.* Phenotype-genotype correlation in 295 Chinese deaf subjects with biallelic causative mutations in the GJB2 gene. *Genet Test Mol Bioma* 2011; 15(9): 619-25.
- 17 Wattanasirichaigoon D, Limwongse C, Jariengprasert C, Yenchitsomanus PT, Tocharoenthanaphol C, Thongnoppakhun W, *et al.* High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. *Clin Genet* 2004; 66(5): 452-60.