

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.023.html>

安徽省汉族人氨基糖苷类抗生素致耳聋患者基因突变的研究

徐彬 余元勋 王迎新 李建平 刘萍 张立

摘要 目的 研究安徽省汉族人氨基糖苷类抗生素致耳聋(AAID)患者基因突变与其非综合征性耳聋(NSHL)的关系,建立口腔黏膜细胞基因组DNA新一代基因测序法(NGS)。方法 由122例NSHL患儿及120例健康儿童,取得口腔黏膜基因组DNA,应用NGS对GJB2、12S rRNA基因测序。结果 口腔黏膜细胞的基因组DNA质量较好,能满足NGS研究需要;在122例NSHL患者中,28例GJB2基因突变,占耳聋患者的22.95%;10例12S rRNA基因突变,占耳聋患者的8.20%。120例健康儿童中,未发现基因突变($P < 0.01$)。结论 口腔黏膜细胞基因组DNA的NGS检测法能用于检出安徽省汉族人AAID基因突变;在安徽NSHL患者中GJB2、12S rRNA基因突变有其一定的特点,能对安徽省汉族人AAID基因突变研究提供帮助。

关键词 口腔黏膜细胞;耳聋;突变;GJB2;12S rRNA

中图分类号 R 969.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1653-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.023

我国每年约有3万例先天性耳聋发病患者^[1]。50%耳聋与遗传因素相关,为遗传性耳聋,由遗传因素、环境因素的共同作用而引发,包括非综合征型耳聋[non-syndromic hearing loss, NSHL],约占70%]、综合征型耳聋[syndromic hearing loss, SHL]约占30%];已发现与NSHL相关的致病基因及其突变有一定异质性,与人群的种族、地区不同相关^[2]。氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides antibiotic, AmAn)使用中出现的听觉和前庭的损害常是不可逆的,可诱发氨基糖苷类抗生素致聋(aminoglycosides antibiotic induced deafness, AAID)^[3-4],与AAID相关的12S rRNA基因突变,以C1494T、

2016-06-22 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A128)

作者单位:安徽医学高等专科学校省遗传医学中心,合肥 230061

作者简介:徐彬,男,副研究员,责任作者,E-mail:xb.1030@163.com

spectral imaging of the brain: initial results of selecting optimal monochromatic image for beam-hardening artifacts and image noise reduction[J]. J Comput Assist Tomogr, 2011, 35(2):294-7.

[5] 莫泳康,黄锦桩,马树华,等.肝脏动脉期CT能谱成像的影像

优选[J].国际放射医学杂志 2014, 37(1):1-5.

[6] 王贵生,高建华,赵帅,等.肝脏增强扫描门静脉期能谱CT与传统多层螺旋CT辐射剂量和图像质量的比较[J].中华放射学杂志,2013, 47(4):340-3.

Comparative study of abdominal imaging quality between mixed energy mode and mono-energy mode reconstruction on dual-energy spectral CT

Wei Wei, Deng Kexue, Zhao Yingming, et al

(Dept of Radiology, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To evaluate the difference of mixed energy mode and mono-energy mode reconstruction images on abdomen spectral CT imaging. **Methods** Abdomen pre-contrast and contrast enhanced CT scans were applied with spectral CT on sixty patients. Images were reconstructed by two-modes: QC mode and Mono mode. The following variables were compared: signal-to-noise(SNR) of liver, spleen and pancreas, contrast-to-noise(CNR) of liver, spleen and pancreas. Two experienced radiologists evaluated the artifact level of images of the two reconstruction modes. **Results** Compared with mixed-energy mode images, 70 keV mono-energy images yielded significantly greater SNR and CNR($P < 0.05$). Subjective score of 70 keV mono-energy images was higher than that of mixed-energy image($P < 0.001$). **Conclusion** In abdominal spectral CT imaging, mono-energy reconstruction can provide higher quality of images than mixed-energy reconstruction and can replace mixed-energy images in clinical diagnosis.

Key words abdomen; computed tomography; X-ray computed; spectral CT; reconstruction mode

A1555G、nt 961 insC、nt 961 del T、T nt1095 C 等突变较常见^[5]；研究^[6]表明，GJB2 基因上至少有 110 余种突变，可能与 NSHL 相关，GJB2 基因突变的携带率为 3%。目前遗传性耳聋较常用的基因诊断方法包括基因芯片法、NGS 法。该研究主要应用口腔黏膜细胞的 DNA，经 NGS 法检测耳聋致病基因突变，以便为进一步开展 AAID 相关研究提供技术支持，为临床合理治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 对象 安徽残联康复研究中心、安徽省优生优育遗传医学中心门诊 NSHL 患者共 122 例，其中男童 75 例，女童 47 例；120 例健康儿童作为对照，其中男童 71 例，女童 49 例。

1.1.2 病史采集 采用问卷调查的方式，由患者家属等填写。

1.1.3 纯音听阈测定 应用的全部仪器按国家标准校准。① 耳科检查：应用耳镜检查外耳道、鼓膜；② 纯音听阈测定：按照常规于静室内，采用丹麦 Madsen502 便携式听力计 根据 WHO 预防聋和听力损失项目方法(1997 年)，应用上升法进行气导听阈测定，计算 0.5、1、2、4 kHz 4 个频率听阈平均值为纯音听阈；听力障碍者听力损失的具体分级如下：轻度听力损失：26 ~ 40 dBHL；中度听力损失：41 ~ 60 dBHL；重度听力损失：61 ~ 80 dBHL；极重度听力损失：>81 dBHL。

1.1.4 调查结果 122 例患者均无亲缘关系，经体检排除遗传性 SHL，否认有中耳炎、接触强噪音、外伤的病史，耳科检查鼓膜正常，无穿孔、充血、内陷；NSHL 患者中，9 例在 3 岁内用过庆大霉素(7 例)、链霉素(2 例)，29 例孕期或生后用药情况不详，84 例无耳毒性药物用药史；77 例为先天性聋(生后 3 个月内确诊)，41 例为生后 6 个月内确诊，4 例为 1 岁以后听力下降；耳聋程度分布情况见表 1。

表 1 不同发病时期耳聋程度分布情况(n)

发病年龄	总计	耳聋程度				
		单耳	轻度	中度	重度	极重度
婴幼儿期	60	1	1	3	16	39
学龄前期	37	2	2	14	12	7
学龄期	25	2	4	13	3	3
总计	122	5	7	30	31	49

1.2 基因组 DNA 抽提

1.2.1 口腔黏膜细胞 取 122 例遗传性 NSHL 耳聋患者和 120 例健康人口腔黏膜细胞，制备细胞悬液 4 ℃ 保存；DNA 抽提方法，按照本研究组已发表的文献^[7]制备基因组 DNA 溶液。

1.2.2 PCR 引物设计 设计时参考人类 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 遗传性耳聋的序列，并利用 Premier 5.0 软件设计，由上海生工公司合成，引物信息见表 2。

表 2 引物序列

基因	序列	长度(bp)
GJB2	F: 5'-TTGGTGTTTGCTCAGGAAGA-3'	946
	R: 5'-GGCCTACAGGGGTTTCAAAT-3'	
12S _r RNA		
C1494T	F: 5'-CGATCAACCTCACCACCTCT-3'	762
	R: 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3'	
A1555G	MiL1 F: 5'-CACAGAAACCCCAAACCAAC-3'	970
	R: 5'-AGTGTCTGGCGAGCGTTT-3'	
	MiL2 F: 5'-GAAATGCGGCCGAAGATAA-3'	596
	R: 5'-TTGGCTCTCCTTGCAAAGTT-3'	
961delT/insC	F: 5'-GCACGCAGCAATGCAGCTC-3'	428
	R: 5'-TATGAAGCACCCGACAGTCC-3'	
T1095C	1F: 5'-CTCCTCAAAGCAATACACTG-3'	800
	1R: 5'-TGCTAAATCCACCTTCGACC-3'	
	2F: 5'-CGATCAACCTCACCACCTCT-3'	762
	2R: 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3'	
A3243G	F: 5'-CCTCGATGTTGGATCAGGAC-3'	657
	R: 5'-GCTAGGCTAGAGGTGGACTAGA-3'	
A7445G	F: 5'-CGACGTTACTCGGACTACC-3'	648
	R: 5'-GATCGTTGACCTCGTCTGT-3'	
A827G	1F: 5'-CTCCTCAAAGCAATACACTG-3'	840
	1R: 5'-TGCTAAATCCACCTTCGACC-3'	
	2F: 5'-CGATCAACCTCACCACCTCT-3'	802
	2R: 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3'	
G7444A	F: 5'-AACGCCAAAATCCATTTTCACT-3'	987
	R: 5'-CGGGAATTGCATCTGTTTTT-3'	

1.3 PCR 反应体系和条件 反应体系: Total 10 μl; polymerase 1 U; Primer forward (2 μmol/L) 1 μl; Primer reverse (2 μmol/L) 1 μl; DNA 溶液 1 μl; 10 × buffer 1 μl; MgCl₂ (50 mmol/L) 0.3 μl; dNTPs (10 mmol/L) 0.2 μl; 水补齐至 10 μl。反应条件: Pre-heat 95 ℃ 5 min; PCR 40 cycles (95 ℃ 15 s; 60 ℃ 20 s; 72 ℃ 30 s); 72 ℃ 15 min 4 ℃ 保存。

1.4 PCR 产物测序 测序 PCR 的反应产物由华大生物科技公司检验中心进行荧光全自动基因 DNA 正/反向测序，分析相关基因 DNA 突变。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，耳聋组与健康对照组的基因 DNA 突变结果

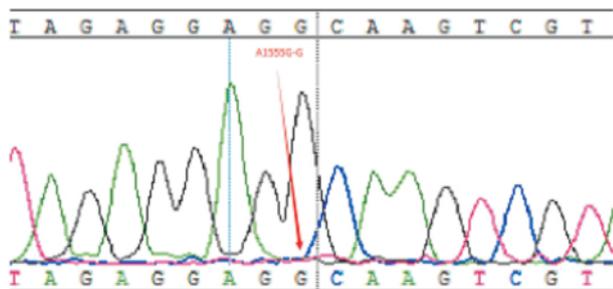


图4 患者第63例基因突变测序部分截图

女4岁 听力阈值90 dB, 12S rRNA 基因1555位点的A突变为G, 箭头指示突变位置

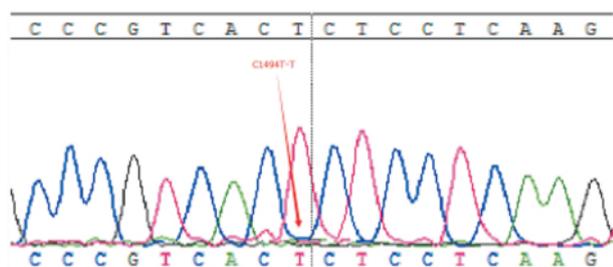


图5 患者第86例基因突变测序部分截图

女6岁 听力阈值95 dB, 12S rRNA 基因1494位点的C突变为T, 箭头指示突变位置

早期发现、诊断耳聋发生的原因, 根据不同病因采取不同的干预措施, 对耳聋儿童的生存质量意义重大。

研究^[8]显示, 由口腔黏膜细胞提取基因组DNA, 可应用于基因诊断。本研究结果表明, 收集口腔黏膜细胞, 抽取基因组DNA, 可用于耳聋基因诊断, 方法简易、方便。

GJB2 基因常是非综合征型耳聋的致病基因, 其中约50%为常染色体隐性遗传性(DFNB), 约20%为常染色体显性遗传性(DFNA); 该基因位于DFNA3A基因座, 编码缝隙连接蛋白Cx26, 表达于内耳上皮毛细胞等。GJB2 基因突变后, 突变Cx26可引发内淋巴液钾离子循环紊乱, 能导致感音神经性耳聋, 常表现为先天性、双侧对称的、非进行性重度耳聋; 一般可见于新生儿听力筛查未通过的患儿, 可被新生儿听力检查+基因诊断联合筛查发现。对中国2 063例耳聋患者进行研究^[9]表明 GJB2 基因突变在 NSHL 患者的阳性率为14.9%, 本研究结果阳性率为22.95%, 包括 nt 235del C、235 del C + nt 299 ~ 300 del AT、nt 235 del C + nt 176 del 16、nt 299 ~ 300 delAT、nt 176 del 16、nt 538 C→T、nt 547 G→A, 分别占122例患者的11.48%、1.64%、0.82%、3.28%、2.46%、1.64%、1.64%; 其阳性

率、分型情况与国内报道一致; nt 235del C、nt 299 ~ 300 delAT、nt 176 del 16 可能是安徽省 NSHL 患者中的 GJB2 基因突变热点。

线粒体 mtDNA 12S rRNA 基因突变有母系遗传的特点, 与耳毒性药物相关。研究^[10]显示 mtDNA 无组蛋白而裸露, 在12S rRNA 发生 Ant1555G、Cnt1494T 突变后, 能使12S rRNA 在空间结构上与细菌16S rRNA 相似, 易结合 AmAn, 能引发氧化磷酸化紊乱, 减少产生 ATP, 可毒性损伤内耳毛细胞, 导致 AAID; 后者对 AmAn 敏感, 有时可一针致聋。研究^[11]证实 mtDNA Ant1555G 点突变是 AAID 遗传易感性的分子基础, 其在中国汉族人 NSHL 患者中的携带率存在地域、种族的差异, 其在南京、福州、武汉^[12-14]的 NSHL 患者的检出率分别为1.50%、0.67%、2.27%。本研究的检出率为1.64%, 其差异可能与各地区使用 AmAn 的频率、基因突变检测方法等相关。研究^[12]提示 mtDNA Cnt1494T 点突变的致病机制与 Ant1555G 类似。本研究对安徽省122例耳聋患者筛查, 检出1例 Cnt1494T 突变, 检出率为0.82%。

线粒体 nt 961 del T/insC 是12S rRNA 的 nt 961 位 T 的缺失和(或) C 插入; 可能是 AmAn 致聋的又一重要原因^[3]; 该突变位于12S rRNA 基因的第21、22 环之间, 可改变12S rRNA 空间结构, 易与 AmAn 结合而引发中毒性耳聋。本研究在安徽省的122例耳聋患者中检出3例 nt 961 insC、3例 nt 961 del T、1例复合突变 nt 961 del T + Tnt 1095 C, 总检出率为5.74%。3种突变分别占122例耳聋患者的2.46%、2.46%、0.82%。T nt1095 C 位于12S rRNA 的第25螺旋, 能导致线粒体 mtDNA 空间结构改变, 促进与 AmAn 的结合, 引发氧化磷酸化紊乱, 减少产生 ATP, 可毒性损伤内耳毛细胞, 导致产生 AAID^[15]。本研究显示1例复合突变 nt 961 del T + Tnt1095C, 可能与耳聋发病相关; 复合突变导致的耳聋症状可能较重, 但需进一步研究。本研究122例耳聋患者中, 12S rRNA 基因的 Ant3243G、Ant7445G、Ant827G、Gnt7444A 等突变未检出。

本研究提示 AmAn 诱发的药物性耳聋在各年龄段均可出现, 不能忽视线粒体基因突变的检测, 特别是有 AmAn 用药史、母系家族遗传史的患者; 12S rRNA 基因突变携带者发现后, 要再检查未耳聋的母系成员, 可早期发现相同突变携带者, 能对其进行用药指导, 避免药物性耳聋的发生。本研究建立的常见聋病基因分型快速检测方法, 能了解 GJB2、12S

rRNA 等基因突变的情况,能提高基因突变检出率,可为本地区耳聋遗传咨询和聋病基因筛查提供依据。

参考文献

- [1] Xin F, Yuan Y, Deng X. Genetic mutations in nonsyndromic deafness patients of Chinese minority and han ethnicities in Yunnan, China[J]. J Transl Med 2013, 11: 312-21.
- [2] 朱一鸣, 郭玉芬, 刘晓雯, 等. 陕西省部分聋哑学生聋病易感基因分子流行病学研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2010, 18(3): 225-8.
- [3] 管敏鑫, 赵立东. 与氨基糖苷类抗生素耳毒性相关的线粒体 12S rRNA 突变的流行病学特征[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(2): 98-105.
- [4] 曹云, 冯大飞, 张磊. 线粒体 MT-RNR1 基因突变与药物性聋[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2013, 21(4): 428-30.
- [5] Mahmoud R F, Lubna M D, Samir A, et al. Screening for the mitochondrial A1555G mutation among Egyptian patients with non-syndromic, sensorineural hearing loss[J]. Int J Mol Epidemiol Genet 2014, 5(4): 200-4.
- [6] Wei Q, Liu Y, Wang S, et al. A novel compound heterozygous mutation in the GJB2 gene causing non-syndromic hearing loss in a family[J]. Int J Mol Med 2014, 33(2): 310-6.
- [7] 徐彬, 余元勋, 鲍远程, 等. 肝豆状核变性中 ATP7B 基因复合突变的研究[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(11): 1209-14.
- [8] 程家蓉, 关赛芳, 王学励, 等. 从人口腔细胞获取基因组 DNA 作基因多态性分析的可行性[J]. 癌症, 2005, 24(7): 893-7.
- [9] Dai P, Yu F, Han B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment[J]. J Transl Med 2009, 7: 26.
- [10] Guan M X. Prevalence of mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity[J]. Mitochondrion, 2011, 11(2): 237-45.
- [11] 赵芳, 张芬娜. 一母系遗传氨基糖苷类抗生素致聋家系线粒体 DNA A1555G 突变检测[J]. 中华耳科学杂志, 2010, 8(1): 40-5.
- [12] 戴大春, 鲁雅洁, 陈智斌, 等. 非综合征耳聋患者线粒体 DNA 12S rRNA 及 tRNA^{ser}(UCN) 基因序列分析[J]. 南京医科大学学报, 2012, 32(1): 67-71.
- [13] 邓蔚, 于飞, 戴朴, 等. 福州市特教学校非综合征性聋分子病因学分析-GJB2 235delC 突变和线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(1): 12-4.
- [14] 何勇, 孙勃, 戴朴, 等. 武汉地区非综合征性聋分子病因学分析-GJB2 235delC 突变和线粒体 DNA 12S rRNA A1555G 突变筛查报告[J]. 中华耳科学杂志, 2006, 4(1): 24-6.
- [15] Zhao L, Young W Y, Li R, et al. Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA 1095 T > C mutation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(4): 1503-8.

Research of genetic mutation in Anhui Han people AAID patients

Xu Bin, Yu Yuanxun, Wang Yingxin, et al

(Anhui Medical Genetics Center in Anhui Medical College, Hefei 230061)

Abstract Objective To study the relationship of the gene mutations of Anhui Han people aminoglycosides antibiotics induced deafness (AAID) patients and non-syndromic hearing loss (NSHL), and set up next-generation sequencing (NGS) of oral mucosal cells genome DNA. **Methods** From 122 cases of NSHL patients and 120 cases of healthy children, we got the oral mucosal cells genome DNAs and using NGS sequenced GJB2, 12S rRNA genes. **Results** The genome DNAs of oral mucosal cells were good quality for NGS study. In 122 cases of NSHL patients, we found GJB2 gene mutations of 28 cases (22.95%) and found 12S rRNA gene mutations of 10 cases (8.20%). In 120 cases of healthy children, we did not find any mutation ($P < 0.01$). **Conclusion** NGS sequencing method of oral mucosal cells genome DNA can be used for detecting the mutations of Anhui Han people AAID. The mutations of GJB2, 12S rRNA genes in Anhui NSHL patients have some different characters and can help to study the gene mutations of Anhui Han people AAID.

Key words oral mucosal cell; deafness; mutation; GJB2; 12S rRNA