

傣族、汉族非综合征型耳聋患者 GJB2 基因分析

刘德胜¹⁾, 王金丽²⁾, 撒亚莲²⁾, 严新民²⁾, 汪晓洁²⁾, 沈涛²⁾, 彭正国²⁾

(1) 昆明医科大学研究生院, 云南昆明 650031; 2) 云南省第一人民医院临床基础医学研究所, 云南省出生缺陷与遗传病研究重点实验室, 云南昆明 650032)

[摘要] 目的 分析云南省普洱地区傣族、汉族非综合征型耳聋患者 GJB2 基因编码区核苷酸序列。方法 采集同一地区的傣族 (20 例)、汉族 (74 例) 非综合征型耳聋患者 (共 94 例) 及 152 例健康人群 (40 例傣族和 112 例汉族) 的外周静脉血, 提取基因组 DNA, 进行 GJB2 基因编码区的 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行测序, 检测 GJB2 基因的突变位点。结果 GJB2 基因检测发现了 6 种常见核苷酸序列的改变方式, 包括 79G→A、341A→G、109G→A、235delC、608T→C 和 257-258GC to CG。对照组中未检测到 235delC 致病突变。在 94 例非综合征型耳聋患者中发现 3 例 (傣族 1 例, 汉族 2 例) 携带 235delC 纯合突变 (3.19%)。其余 5 种碱基改变为常见的多态性变化。结论 相对于中国内地的汉族而言, 普洱地区的傣族、汉族非综合征型耳聋患者 GJB2 基因 235delC 的突变率较低。

[关键词] 非综合征型耳聋; GJB2 基因; DNA 突变分析

[中图分类号] R764.43; Q754 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 10-0049-05

Analysis of GJB2 Gene in Non-syndromic Hearing Loss from Dai and Han Ethnic Group

LIU De-sheng¹⁾, WANG Jin-li²⁾, SA Ya-lian²⁾, YAN Xin-min²⁾, WANG Xiao-jie²⁾, SHEN Tao²⁾,
PENG Zheng-guo²⁾

(1) The Graduate School of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Institute of Clinical and Basic Medical Sciences, The First People's Hospital Yunnan Province, Yunnan Provincial Key Laboratory for Birth Defects and Genetic Diseases, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the features of GJB2 gene coding region in non-syndromic deaf patients from Dai and Han ethnic group of Simao Region. **Methods** DNA was extracted from peripheral blood samples of 94 non-syndromic deaf patients (20 Dai and 74 Han ethnic group) and 152 healthy controls (40 Dai and 112 Han ethnic group) in the Pu'er Area. GJB2 gene coding region mutation was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing method. **Results** Six types of GJB2 gene variants were detected, which included 79G→A、341A→G、109G→A、235delC、608T→C and 257-258GC to CG. 235delC genotype was not found in the control group. Three patients (1 Dai and 2 Han ethnic group) in 94 deafness patients were found carrying 235delC homozygous mutation (3.19%). The other five variants were confirmed common polymorphism. **Conclusion** The frequency of 235delC genotype of GJB2 gene coding region is lower in Dai and Han ethnic group of Simao Region compared with Han ethnic group in other province.

[Key words] Non-syndromic deafness; GJB2 gene; DNA mutation analysis

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31060155)

[作者简介] 刘德胜 (1983~), 男, 四川简阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事疾病相关基因的研究工作。

[通讯作者] 撒亚莲. E-mail:sayalian@126.com

耳聋是严重影响人类生活质量的最常见的致残疾病之一^[1]。每 1 000 例新生儿中约有 1 例耳聋患者, 其中 60% 为遗传性聋。在遗传性聋中, 约 80% 为非综合征型耳聋 (nonsyndromic hearing impairment, NSHI), 而 70% NSHI 为感音神经性聋。在许多人群中的研究表明, 编码缝隙连接蛋白 26 (connexin 26, Cx-26) 的 GJB2 基因异常是遗传性非综合征型耳聋最常见的分子病因^[2,3]。在不同种族、不同地域, GJB2 基因的突变热点有很大差异。据全国性聋病分子流行病学研究的数据显示, 中国大陆和台湾的非综合征型聋人群携带较高的 GJB2 基因 235delC 突变频率 16.30% 和 14.80%^[4,5]。而高加索人以 35delG 为突变热点; 北欧的犹太人以 167delT 最常见; 71G→A 是印度人群的主要致病突变; 非洲的部分村落的主要突变方式是 R143W (427 C→T)^[6]。中国地域广阔, 民族资源丰富。云南地处西南边陲, 有 15 个少数民族是云南独有, 且云南少数民族聋病的分子遗传学的病因研究较少。笔者采用 PCR 产物直接测序法对思茅地区傣族、汉族非综合征性耳聋患者检测 GJB2 基因编码区核苷酸序列的变化, 探索聋病的分子病因, 为丰富、完善中国人群致聋基因的突变类型和突变频率提供科学数据, 为聋病的遗传咨询和预防干预提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组为思茅地区普洱特教学校的非综合征性耳聋患者, 对照组为同一地区听力正常的人群。实验组 94 人, 进行耳鼻咽喉科专科检查, 确诊为中、重度以上的感音神经性聋, 包括 20 名傣族, 女 12 例, 男 8 例, 平均年龄 12.33 岁; 74 名汉族 (男 39 例, 女 35 例, 平均年龄 12.17 岁; 对照组为 40 名傣族, 男 19 例, 女 21 例。平均年龄 41.95 岁; 112 名汉族, 男 63 例, 女 49 例, 平均年龄 15.95 岁。在知情同意后, 采集 2~3 mL 外周静脉血 (EDTA 抗凝)。

1.2 试剂

全血 DNA 提取试剂盒和电泳所需试剂购自北京百泰克生物技术有限公司; PCR 扩增试剂 (2X⁰Taq PCR MasterMix) 购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 主要仪器设备

离心机 (Hitachi, CR22G); PCR 仪 (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler); 电泳槽和电泳仪

(BG-power 600 i); 凝胶电泳成像分析系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS); 低温冰箱 (RECVO 公司, 572L 型); 电热恒温三用水箱 (北京市永光明医疗仪器厂, HHW21 600 型)。

1.4 方法

1.4.1 模板 DNA 的提取 依照试剂盒说明书逐步抽提 DNA, 取 1 μ L 用琼脂糖凝胶电泳检测, 其余保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.4.2 引物设计与合成 GJB2 基因的编码区位于第二外显子。从 Genbank 下载 GJB2 基因序列 (NG_008358.1; AY280971), 采用 GeneTool 软件设计引物, 上游引物为 5'-TCTTTTCCAGAGCAAA-CCGC-3'; 下游引物为 5'-TGAGCACGGGTTGCC-TCATC-3', 扩增片段为: 776 bp。

1.4.3 GJB2 基因编码区的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) PCR 扩增体系为 20 μ L, 含 2X⁰Taq PCR MasterMix 10 μ L, 25 μ mol/L 上游、下游引物各 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 取 1 μ L PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 (含溴化乙锭 0.5 μ g/mL) 检测 PCR 扩增产物。

1.4.5 PCR 产物直接测序 测序引物与 PCR 扩增引物相同。对 PCR 产物用酒精沉淀法纯化、经 Bigdye 测序反应, 用 ABI 3730XL 测序仪进行测序。测序结果采用 GeneTool 软件分析。

2 结果

2.1 GJB2 基因的 PCR 产物

94 例非综合征型耳聋患者和 152 例健康人的外周血 DNA 样本进行 PCR 扩增, 均扩增到特异性条带, 其片段大小与预期结果相符合 (见图 1)。



图 1 GJB2 基因编码区的 PCR 扩增产物
Fig. 1 The PCR amplification products of GJB2 gene coding region

2.2 GJB2 基因测序分析

将全部样本的 PCR 扩增产物直接测序. 在 94 例耳聋组中检测到 6 种 GJB2 基因的核苷酸序列改变方式, 包括 79G → A、341A → G、109G → A、235delC、608T → C 和 257-258GC to CG. 235delC 为致病突变(见图 2), 发现有 3 例患者携带 235delC

纯合突变 (3.19%), 傣族 1 例 (5.00%), 汉族 2 例 (2.70%), 未发现杂合突变. 其余 5 种碱基改变为常见的多态性变化. 对照组中未检测到 235delC 致病突变. GJB2 基因核苷酸改变在耳聋组和对照组及不同民族中的比较见表 1、表 2.

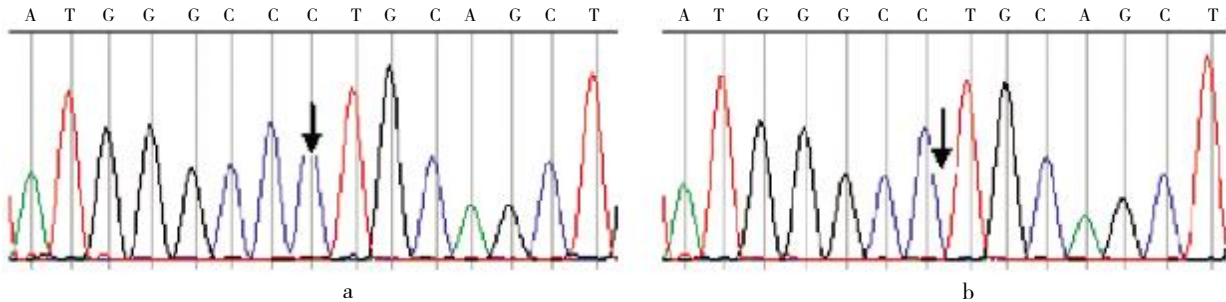


图 2 GJB2 基因编码区 235delC 突变的测序

Fig. 2 The sequencing figure of 235delC mutation in GJB2 gene coding region

a:野生型; b:235delC 纯合突变.

表 1 耳聋组和对照组人群中 GJB2 基因常见核苷酸的变化

Tab. 1 Common nucleotide variation in GJB2 gene coding region in deaf group and control group

核苷酸改变	氨基酸改变	碱基变化的类型	纯合突变 (n)		杂合突变 (n)	
			患者	对照	患者	对照
79G → A	Val 27 Ile	多态性	3	9	20	35
109G → A	Val 37 Ile	多态性	5	2	7	21
235delC	Frame shift	突变	3	0	0	0
257-258GC → CG	Ser86Thr	多态性	94	152	0	0
341A → G	Glu 114 Gly	多态性	2	6	18	25
608T → C	Lle203Thr	多态性	1	0	9	0

表 2 傣族、汉族人群中 GJB2 基因常见核苷酸的变化

Tab. 2 Common nucleotide variation in GJB2 gene coding region in Dai and Han ethnic group

核苷酸改变	傣族 (n)				汉族 (n)			
	纯合突变		杂合突变		纯合突变		杂合突变	
	患者	对照	患者	对照	患者	对照	患者	对照
79G → A	0	3	3	3	3	6	17	32
109G → A	2	1	2	3	2	1	6	18
235delC	1	0	0	0	2	0	0	0
257-258GC → CG	20	40	0	0	74	112	0	0
341A → G	0	2	3	6	2	4	15	19
608T → C	0	0	4	0	1	0	5	0

3 讨论

GJB2 基因异常是常染色体隐性遗传性耳聋

(DFNB1) 和常染色体显性遗传性耳聋 (DFNA) 的分子病因. GJB2 基因定位于染色体 13q11- q12, 全长 4 804 bp, 有 2 个外显子, 仅第二外显子 (有 678 个碱基) 编码含 226 个氨基酸的 Cx-26. Cx-26

对毛细胞兴奋后 K^+ 循环回流进入耳蜗内淋巴液起调控作用, GJB2 基因突变后, K^+ 进入内淋巴液的循环受影响, 导致感音神经性聋^[7,8]. GJB2 基因虽然短小, 但具有很高的突变率, 已报道有 100 多种突变方式.

据聋病基因的分子流行病学数据提示, GJB2 基因常见的致病突变位点是 235delC, 299-300delAT, 176-191del16, 35delG. 戴朴等人报道, 235delC 是我国大陆内地和台湾遗传性非综合征型聋最常见的致病突变, 其携带率为 16.30% 和 14.80%^[4,5]. 本研究用 PCR 产物直接测序法检测普洱特教学学校 94 例非综合征型聋患者 (傣族 20 例、汉族 74 例) GJB2 基因的结果提示, 有 3 名患者为 235delC 纯合突变, 携带率为 3.19% (傣族患者的携带率为 5.00%, 汉族患者的携带率为 2.70%), 而其他 3 种常见致病突变没检测到携带者. GJB2 基因 235delC 引起移码突变, 使终止密码子提前出现, 仅翻译出含 81 个氨基酸的多肽, 且只有前 79 个氨基酸与野生型相同, 导致缝隙连接通道的结构蛋白出现异常. 杨中纯等人通过构建 GJB2 基因 235del C 等突变型表达载体进行机制研究发现, 突变蛋白在转染细胞质表达, 而不能分布到细胞膜参与构建缝隙连接, 与突变点所在的结构域可能没有相关性^[9,10].

本研究在耳聋组和对照组中均检测到 5 种碱基改变 (79G→A、341A→G、109G→A、608T→C 和 257-258GC to CG). 已有研究表明, 它们均为多态性改变. 多态性改变在正常人群中有一定的分布频率, 且不会引起耳聋^[2,3,7]. 79G→A、341A→G、608T→C 和 257-258GC to CG 核苷酸的置换不引起 Cx-26 肽链长度的改变, 不影响蛋白质的功能. 257-258GC 置换为 CG 使编码的丝氨酸变为苏氨酸, 在本研究的全部样本中均检测该变化, 且在英国、意大利和西班牙人群中也报道为多态性改变. 对于 109G→A 是多态性还是致病突变尚有争议, Bruzzone, Wilcox 等认为该突变使缬氨酸变为异亮氨酸, 可影响缝隙连接蛋白的活化. 本研究在耳聋组和对照组中检出 109G→A 的纯合突变、杂合突变, 是否具有致聋作用需要进行功能研究才能推断.

本研究结果提示, 普洱地区 GJB2 基因致病突变率及 235delC 携带率较内地汉族和台湾地区的患者低, 可能与不同人群、不同地域、饮食习惯、环境等因素有关. 已有研究表明, 中国少数民族 GJB2 基因 235delC 携带率低可能与少数民族地区相对封闭造成与蒙古人种为主的内地汉族的遗传

基因差异有关. 余咏梅等报道 104 例云南非综合征型耳聋患者 (白族 54 例, 彝族 35 例, 汉族 15 例) 中, 仅 2 名白族患者为 GJB2 基因 235delC 纯合突变 (耳聋组的携带率为 1.92%, 白族患者的携带率为 3.70%)^[11]. 李彦华对新疆 43 例维吾尔族非综合征型耳聋患者检测发现 GJB2 基因 235delC 纯合突变和杂合突变各 1 例, 等位基因频率为 3.49%^[12]. 袁永一等报道拉萨特教学学校 114 名藏族非综合征型耳聋患者中各有 1 名患者携带 GJB2 基因 235delC、299-300delAT 杂合突变, 其致病突变率为 1.75% (2/114), 两个位点的等位基因频率均为 0.44% (0.5/114)^[13]. 其次, 与研究的样本量偏小有关. 根据统计学抽样调查总体率样本量的公式计算, 研究 GJB2 基因的最小样本量预测为 249 人^[14]. 因此, 在确定 GJB2 基因突变位点是否具有民族性和地域性特点, 尚需扩大样本量进行研究后推断. 另外, 可能存在没有认识到的其他致聋因素, 例如调控区的突变、其他致聋基因等尚需进一步探讨.

(致谢: 感谢普洱特教学学校所有教职员工和学生在本课题研究中给予的支持和帮助.)

[参考文献]

- [1] 王秋菊. 遗传性耳聋从基础到临床的机遇与挑战 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(40): 2 809 - 2 813.
- [2] HILGERT N, SMITH R J, VAN CAMP G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics [J]. Mutat Res, 2009, 681(2-3): 189 - 196.
- [3] DAI P, YU F, HAN B, et al. GJB2 mutation spectrum in 2063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment [J]. J Transl Med, 2009, 7: 26.
- [4] 戴朴, 于飞, 韩冰, 等. 中国不同地区和种族重度感音神经性聋群体热点突变的分布和频率研究 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42(11): 804 - 808.
- [5] WANG Y C, KUNG C Y, SU M C, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwan [J]. Eur J Hum Genet, 2002, 10(8): 495 - 498.
- [6] DROR A A, AVRAHAM K B. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology [J]. Annu Rev Genet, 2009, 43: 411 - 437.
- [7] 于飞, 韩东一, 戴朴, 等. 190 例非综合征性耳聋患者 GJB2 基因突变序列分析 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(40): 2 814 - 2 819.
- [8] LIU X Z, XIA X J, KE X M, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population [J].

(下转第 60 页)