

# 广西壮族自治区南宁市新生儿 GJB2 致聋基因的携带研究

黄卫彤,朱茂灵,覃卫娟,王宗杰,廖 旺,曾贵祥

(南宁市妇幼保健院,南宁 530011)

**摘要:**目的 探讨南宁市新生儿 GJB2 致聋基因携带状况和突变位点与耳聋相关性。方法 收集2016~2018年期间在南宁市新生儿疾病筛查中心进行听力筛查未通过的1 007例新生儿血液,制成干血斑纸片,提取DNA,采用测序法进行GJB2全基因测序。统计新生儿GJB2基因突变的携带率,并结合新生儿听力损失确诊情况分析致聋基因突变特点。结果 1 007例新生儿中GJB2致聋基因突变携带率为55.21% (556/1 007),检测出GJB2基因突变位点16个,其中GJB2 c.109 G>A突变携带率较高,占20.36%,其次是c.79 G>A占10.03%,c.608 T>C占7.65%,c.217 C>A占7.15%,c.341 A>G占6.85%,其它位点(包括c.11 G>A,c.-23+1 G>A,c.235del C,c.299 del AT,c.-121 G>A,c.464 A>G,c.147 C>G,c.676 G>T,c.316 T>G,c.-23-35 G>T和c.368 C>A)突变携带率<0.1%。556例GJB2致聋基因突变者中有31例确诊为不同程度耳聋,4个致聋突变位点包括GJB2 c.109 G>A(26例),c.11 G>A(2例),c.235del C(2例)和c.299 del AT(1例),分别占耳聋患者比率是83.87%,6.45%,6.45%和3.23%。81例检出6个新突变位点c.-23-35 G>T,c.-121 G>A,c.464 A>G,c.217 C>A,c.147 C>G和c.676 G>T及4例检出1个未明确致病性位点c.-23+1 G>A,另外有250例检出5个常见多态性突变位点。GJB2 c.109 G>A携带率与北京、台湾和上海比较差异有统计学意义( $\chi^2=133.364,11.724,32.449$ ,均 $P<0.05$ )。结论 南宁市新生儿GJB2致聋基因携带率较高,筛查出4个致聋突变位点,6个新突变位点及1个未明确致病位点,明确了致聋突变位点以c.109 G>A纯合子突变为主,基因突变特点有明显的地域性差异。

**关键词:**新生儿;GJB2携带率;致聋突变位点

**中图分类号:**R764.43;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2020)01-013-04

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.004

## Study on the Carrying of GJB2 Deafness Gene in Newborns of Nanning City

HUANG Wei-tong, ZHU Mao-ling, QIN Wei-juan, WANG Zong-jie, LIAO Wang, ZENG Gui-xiang

(Nanning Maternal and Child Health Hospital, Nanning 530011, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between the carrying status and mutation site of GJB2 deafness gene in newborn infants in Nanning city. **Methods** The blood of 1 007 newborns who failed hearing screening in Nanning neonatal disease screening center from 2016 to 2018 was collected and made into dried blood stains, then the DNA was extracted, and the GJB2 gene was sequenced by whole genome sequencing method. The carrying rate of newborn GJB2 gene mutation was calculated, and the characteristics of deafness gene mutation were analyzed based on the confirmed hearing loss of newborn. **Results** The carrying rate of GJB2 deafness gene mutation in 1 007 newborns was 55.21% (556/1 007). Sixteen mutations of GJB2 gene were detected, among the mutation rate of GJB2 c.109 G>A was higher, accounting for 20.36%, followed by 10.03% of GJB2 c.79 G>A, 7.65% of c.608 T>C, 7.15% of c.217 C>A, and 6.85% of c.341 A>G. Mutation carrying rate of other sites <0.1% (including c.11 G>A, c.-23+1 G>A, c.235del C, c.299 del AT, c.-121 G>A, c.464 A>G, c.147 C>G, c.676 G>T, c.316 T>G, c.-23-35 G>T and c.368 C>A). Among the 556 patients with GJB2-induced deafness gene mutation, 31 patients were diagnosed with different degrees of deafness, and 4 mutations including GJB2 c.109 G>A (26 cases), c.11 G>A (2 cases), c.235 del C (2 cases) and c.299 del AT (1 case) accounted for 83.87%, 6.45%, 6.45% and 3.23% respectively. Six new mutations including GJB2 c.-23-35 G>T, c.-121 G>A, c.464 A>G, c.217 C>A, c.147 C>G and c.676 G>T were detected in 81 cases and one undefined pathogenicity locus c.-23+1 G>A was detected in 4 cases, and five common polymorphism mutations were detected in 250 cases. The carrying rate of GJB2 c.109 G>A was statistically significant compared with other cities in China. **Conclusion** The carrying rate of GJB2 deafness gene in neonates in Nanning city is higher. There are 4 deafness mutation sites, 6 new mutation sites and 1 un-

**基金项目:**南宁市科学研究与技术开发重点研发计划基金资助(20173017-6)。

**作者简介:**黄卫彤(1966-),女,大学本科,主任医师,研究方向:临床医学检验,新生儿疾病筛查,E-mail:15177160978@163.com。

**通讯作者:**朱茂灵,主任医师。

defined pathogenic site have been screened out. It is clear that the deafness mutation sites are dominated by c.109 G > A homozygous mutation, and the gene mutation characteristics have obvious regional differences.

**Keywords:** newborn; GJB2 deafness gene; mutation characteristics; carrying rate

目前国内外报道耳聋基因 GJB2 突变引发儿童非综合性耳聋概率较高<sup>[1]</sup>, 主要以极重度和重度听力损失为主。我国人群中 GJB2 基因最常见的致病突变位点为 c.235del C, c.299-300 del AT, c.176-191 del 16 和 c.35 del G<sup>[2]</sup>, 随着耳聋基因检测技术的发展, 近年又相继发现 GJB2 35 del G, 176 del 16, 235 del C 和 299 del AT 等新的致病突变位点, 而且文献报道<sup>[3,4]</sup> 基因突变位点有地域差别。目前尚未见南宁市针对新生儿进行 GJB2 全基因测序的研究报道, 本研究旨在探讨南宁市新生儿 GJB2 致聋基因的突变特点, 了解基因携带率, 筛查出与耳聋相关的基因突变位点, 为制定适于南宁市新生儿耳聋基因筛查方案提供可靠依据。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2016 年 1 月~2018 年 12 月南宁市新生儿疾病筛查中心 1 007 例听力初筛未通过的新生儿为研究对象, 经知情同意和通过广西全民健康信息平台查看新生儿基本信息、听力初筛、听力损失确诊等资料并跟踪随访 GJB 基因突变者耳聋情况。听力损失确诊方法: 听性脑干反应 (ABR) 和畸变产物耳声发射 (DPOAE) 及声导抗检查。

### 1.2 试剂和仪器

**1.2.1 试剂盒:** DNA 提取试剂为北京天根生化科技有限公司, 测序试剂为 TAKARA Multiplex PCR Assay Kit ver. 2 (宝日生物技术工程有限公司)。

**1.2.2 主要仪器:** 基因扩增仪 (ABI 2720), 荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500), 测序仪 (Miniseq)。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本采集:** 由护士采集新生儿静脉血或足跟血, 分别制成直径 8mm 的 3 个血斑滤纸干血片并晾干, 保存于 -20℃ 冰箱, 留待检测。

**1.3.2 DNA 提取方法:** 用血片打孔器将血斑打孔得到 6mm 直径的干血斑, 经萃取后, 用全血基因组 DNA 提取试剂提取 DNA, 用核酸浓度检测仪检测 DNA 浓度, 其最低工作浓度应  $\geq 5\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

**1.3.3 GJB2 基因测序方法:** ①文库构建: PCR 扩增。②文库纯化。③文库质检: 参照 KAPA Library Quantification Kit Illumina platforms TDS 对文库进行定量。④测序: 将文库 pooling, 变性最终以 1.8 pmol/L 的文库上机测序。⑤数据分析方法: 采用 fastQC 对测序数据进行质量评估, 移除接头污染以及平均质量值低于 20 测序数据, 对于总数据量低于 1.2 mol/L 的样品或者平均测序深度低 100 × 的样品予以重新测序。运用 bwa 软件的 mem 模型将测序数据与人数参考基因组 (hg19) 进行比对后, 通过 Picard 和 GATK

等软件对样品的 SNV 和 indel 进行检测, 检出的基因突变采用 snpEff 软件进行基因注释和功能, 通过 SnpSift 软件和 dbNSFP3 数据库对突变进行功能预测。⑥生物信息学分析: 利用 GATK 工具判读 SNP 和 Indel 位点; 利用 Snpeff 工具注释 SNP, 最后利用 dbSNP、千人基因组数据库、HGMD 等数据库、clinvar 数据库进行注释和比较分析。

**1.4 统计学分析** 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, GJB2 基因携带率以百分率 (%) 表示, 基因突变位点差异性比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。待测序的 GJB2 突变位点类型分为已明确的致聋位点、未明确致聋位点 (包括新基因位点) 及多态性位点三种类型。

## 2 结果

GJB2 各突变位点、携带率及 GJB2c.109 G > A 携带率与其它城市比较结果分别详见表 1, 表 2。1 007 例新生儿中 GJB2 致聋基因携带率为 55.21% (556/1 007), 共检测出 GJB2 突变位点 16 个, 其中 GJB2 c.109 G > A 突变携带率较高, 占 20.36%, 其次是 c.79 G > A 占 10.03%, c.608 T > C 占 7.65%, c.217 C > A 占 7.15%, c.341 A > G 占 6.85%, 其它位点 (包括 c.11 G > A, -23 + 1 G > A, c.235del C, c.299 del AT, c.-121 G > A, c.464 A > G, c.147 C > G, c.676 G > T, c.316 T > G, c.-23 -35 G > T 和 c.368 C > A) 突变携带率 < 0.1%。通过广西全民健康信息平台查看 556 例 GJB2 携带者基本信息、听力初筛、听力损失确诊资料和跟踪随访结果, 有 31 例确诊听力损失 (不同程度耳聋), 基因突变致聋率为 5.58%。其中检出 GJB2 致聋突变位点包括 c.109 G > A (纯合子突变), c.235del C (纯合子突变), c.299 del AT (纯合子突变) 和 c.11 G > A (杂合子突变), 分别占耳聋率的 83.87%, 6.45%, 3.23% 和 6.45%。81 例听力确诊正常者检出 6 个新突变位点, 包括 c.-23-35 G > T, c.-121 G > A, c.464 A > G, c.217 C > A, c.147 C > G 和 c.676 G > T。4 例检出 1 个未明确致病性位点是 c.-23 + 1 G > A。250 例确诊听力正常者携带其它 5 个突变位点为中国人最常见多态突变位点。GJB2 c.109 G > A 携带率与北京<sup>[5]</sup>、台湾<sup>[6]</sup> 和上海<sup>[7]</sup> 比较, 差异均有统计学意义 ( $\chi^2 = 133.364$ , 11.724, 32.449, 均  $P < 0.05$ ), 与广东<sup>[8]</sup> 比较差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.085$ ,  $P > 0.5$ )。

## 3 讨论

**3.1 研究结果显示** 南宁市新生儿 GJB2 携带率高达 55.21%, 基因突变致聋率为 5.58%, 致聋率与国内报道基本一致<sup>[2]</sup>。筛查出 4 个致聋突变位点中, c.

109 G > A 携带率最高,与北京、上海等城市比较有地域性差别。GJB2 c. 109 G > A 纯合子突变者均确诊为不同程度耳聋,占致聋突变位点的83.87%,与国内外戴翔等报道比较偏高<sup>[4,9]</sup>,其次是 c. 235 delC, c. 299 del AT 纯合子突变和 c. 11 G > A 杂合子突变均可致聋,但比戴翔等报道<sup>[4]</sup>携带率偏低。说明南宁市新生儿携带的致聋基因以 GJB2 c. 109 G > A 为主,其它致聋突变位点携带率比较低。国外有报道<sup>[9-11]</sup> GJB2 c. -23 +1 G > A 为致聋位点,国内未见报道,本研究4例携带者为 c. -23 +1 G > A 杂合子突变,听力正常,由于病例少,未检出纯合子突变,需要继续扩大样本量检测,才能深入研究证实该位点纯合子突变是否致聋。

表1 1 007 例新生儿耳聋基因 GJB2 检测各位点突变携带率 (n = 100)

类别	n(杂合/纯合)	听力缺损携带率[n(%)]
c. 109 G > A	205(179/26)	26(20.36)
c. 79 G > A	101(92/9)	0(10.03)
c. 217 C > A	72(72/0)	0(7.15)
c. 341 A > G	69(64/5)	0(6.85)
c. 608 T > C	77(76/1)	0(7.65)
c. 11 G > A	6(6/0)	2(0.60)
c. 235 del C	9(7/2)	2(0.89)
c. 368 C > A	2(2/0)	0(0.20)
c. -23 +1 G > A	4(4/0)	0(0.40)
c. -23-35 G > T	5(5/0)	0(0.50)
c. 676 G > T	1(1/0)	0(0.10)
c. 464 A > G	1(1/0)	0(0.10)
c. 316 T > G	1(1/0)	0(0.10)
c. -121 G > A	1(1/0)	0(0.10)
c. 147 C > G	1(1/0)	0(0.10)
c. 299 del AT	1(1/0)	1(0.10)
合计	556(513/43)	31(55.21)

表2 GJB2 c. 109 G > A 携带率与其它城市结果比较[n(%)]

类别	n	携带率 n(%)	$\chi^2$	P 值
南宁 <sup>[本研究]</sup>	1 007	205(20.36)	—	—
北京 <sup>[5]</sup>	915	36(3.93)	133.364	0.000
台湾 <sup>[6]</sup>	5 173	821(15.87)	11.724	0.001
上海 <sup>[7]</sup>	1 516	181(11.94)	32.449	0.000
广东 <sup>[8]</sup>	53 033	10 995(20.73)	0.085	0.771

3.2 250 例携带 GJB2 突变位点 国内报道<sup>[4,5,12]</sup> c. 368 C > A, c. 316 T > G, c. 341 A > G, c. 79 G > A 和 c. 608 T > C 为中国人最最常见多态突变,结合听力确诊和追踪随访结果,携带者听力正常,提示以上5个突变位点携带者致聋风险机率很低。

3.3 GJB2 突变的新位点与致病情况 研究有81

例检出6个新突变位点,包括 c. -23-35 G > T, c. -121 G > A, c. 464 A > G, c. 217 C > A, c. 147 C > G 和 c. 676 G > T,结合听力确诊和追踪随访结果,未发现听力损失,但均为杂合子突变,还不能证实其是否致聋,需要继续收集样本检测,才能确定纯合子突变与耳聋相关性。

综上所述,本研究依据1 007 例南宁市新生儿跟踪随访、听力筛查、确诊和高通量测序血液中 GJB2 基因突变结果,筛查出4个致聋突变位点和6个新突变位点,1个未明确致病位点,明确了南宁市新生儿 GJB2 致聋基因携带率较高,致聋突变位点以 c. 109 G > A 纯合子突变为主,为制定适合于南宁市新生儿耳聋基因筛查方法和遗传咨询提供可靠依据。

参考文献:

[1] BARASHKOV N A, DZHEMILEVA L U, FEDOROVA S A, et al. Connexin gene 26 (GJB2) mutations in patients with hereditary non-syndromic sensorineural loss of hearing in the Republic of Sakha (Yakutia) [J]. Vestnik Otorinolaringologii, 2008(5): 23-28.

[2] 纪育斌, 兰兰, 王大勇, 等. 中国非综合征型聋患者 GJB2 基因突变流行病学文献荟萃分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 19(4): 323-327.

JI Yubin, LAN Lan, WANG Dayong, et al. The meta analysis of epidemiological studies in Chinese NSHL population with GJB2 mutation [J]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2011, 19(4): 323-327.

[3] 李雅, 周永安, 杨慧芳, 等. 榆次地区非综合征性耳聋患者 GJB2 基因的检测分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(12): 98-99.

LI Ya, ZHOU Yong'an, YANG Huifang, et al. Detection and analysis of GJB2 gene in patients with non-syndromic deafness in Yuci area [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2014, 22(12): 98-99.

[4] 戴翔, 李隽, 胡雁娟, 等. 湖北省非综合征型耳聋患儿 GJB2, SLC26A4 和线粒体 12S rRNA 突变分析 [J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(10): 1031-1035, 1046.

DAI Xiang, LI Jun, HU Yannan, et al. Mutations of GJB2, SLC26A4, and mitochondrial DNA 12S rRNA in children with non-syndromic hearing loss in Hubei Province of China [J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2014, 22(10): 1031-1035, 1046.

[5] 崔庆佳, 黄丽辉, 阮宇, 等. 915 例新生儿 GJB2 基因筛查单杂合突变测序结果分析 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(13): 1164-1167.

CUI Qingjia, HUANG Lihui, RUAN Yu, et al. The sequencing analyze of 915 newborn with GJB2 heterozygous mutation in Beijing [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2015, 29(13): 1164-1167.

(下转 24 页)