

新生儿耳聋基因联合听力筛查分析

魏 婧 鲁建央 鲁才娟 吴雅枫 詹 欣 翟洪波

摘要 目的 通过调查浙江省杭州市新生儿耳聋基因联合听力筛查的结果,探讨新生儿耳聋基因筛查联合听力筛查的临床应用价值与意义。**方法** 回顾性分析2018~2019年在杭州市分娩的1000例足月新生儿听力筛查与耳聋基因筛查结果。采集新生儿脐带血或足跟血,提取滤纸血斑基因组DNA,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对GJB2、SLC26A4、GJB3、线粒体12S rRNA 4个基因共20个位点进行检测。同时利用耳声发射法于生后48~72h进行听力初筛,初筛未通过者在出生后42天行听力复筛,未通过者在出生后3个月二次复筛,仍未通过者进行听力学诊断。**结果** 1000例新生儿中,耳聋基因检测检出41例(4.1%)携带耳聋基因突变,包括GJB2 c.235delC突变18例、c.299-300delAT突变4例、SLC26A4 c. IVS7-2A>G突变12例、GJB3 c.547G>A突变3例、c.538C>A突变1例、线粒体12S rRNA m.1555A>G突变2例以及GJB2基因联合SLC26A4基因突变1例。24例听力复筛未通过,最终7例听力损失,其中4例有耳聋基因位点突变。**结论** 常规听力筛查无法检测部分迟发性耳聋患儿,耳聋基因筛查可以弥补常规听力筛查的不足,故新生儿常规听力筛查联合耳聋基因筛查有助于对新生儿耳聋进行精准诊断和及时防治。

关键词 耳聋 耳聋基因突变 新生儿听力筛查

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.024

Analysis of the Results of Combined Hearing Screening of Deafness Gene in Newborns in Hangzhou. Wei Jing, Lu Jianyang, Lu Caijuan, et al. Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang 310000, China

Abstract Objective Through the investigation of the results of deafness gene combined with hearing screening in Hangzhou area, to explore the clinical application value and significance of deafness gene combined with hearing screening. **Methods** The results of hearing screening and deafness gene screening of 1000 full-term newborns in Hangzhou from 2018 to 2019 were analyzed retrospectively. We collected cord blood or heel blood of newborn, and extracted the genomic DNA of blood spots of filter paper, and detected GJB2, SLC26A4, GJB3 and mitochondrial 12S rRNA by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. At the same time, otoacoustic emission method was used for primary screening 48-72 hours after birth. Those who failed in the primary screening were re screened 42 days after birth. Those who failed in the primary screening were re screened 3 months after birth, and those who failed were diagnosed by audiology. **Results** Among 1000 newborns, 41 (4.1%) were found to carry deafness gene mutations, including 18 GJB2 c.235delc mutations, 4 c.299-300delat mutations, 12 SLC26A4 c. ivs7-2a>G mutations, 3 GJB3 c.547g>A mutations, 1 c.538c>a mutation, 2 mitochondrial 12S rRNA m.1555a>G mutations, and 1 GJB2 gene combined with SLC26A4 gene mutation. 24 cases failed to pass the re screening, and 7 cases suffered from hearing loss. 4 of them had the mutation of deafness gene locus. **Conclusion** Conventional hearing screening can not detect some high-risk children with delayed deafness, and deafness gene screening can make up for the deficiency of conventional hearing screening. Therefore, routine hearing screening combined with deafness gene screening is helpful for accurate diagnosis and timely prevention and treatment of newborn deaf children.

Key words Deafness; Deafness gene mutation; Newborn hearing screening

常规新生儿听力筛查的普遍开展已经在临床上取得一些成绩。导致耳聋原因很多,其中遗传因素最常见,占50%~60%^[1]。近年来北京、上海、郑州等城市纷纷开展新生儿常规听力筛查联合耳聋基因筛

查,发现耳聋基因筛查可以弥补常规听力筛查不能检出部分迟发性耳聋的不足。本研究通过调查杭州市新生儿耳聋基因的热点突变情况,同时联合传统新生儿听力筛查的结果进行分析,为新生儿听力及耳聋基因联合筛查在杭州推广提供参考,现将结果报道如下。

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY483)

作者单位:310000 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院
产科

通讯作者:翟洪波,电子邮箱:zhaih@126.com

资料与方法

1. 临床资料:以2018年8月~2019年7月在浙

江大学医学院附属杭州市第一人民医院分娩的 1000 例足月新生儿为研究对象。纳入标准:①足月分娩;②出生体重 $\geq 2500\text{g}$;③出生时新生儿 Apgar 评分 ≥ 8 分。排除标准:①有耳聋家族史(对于耳聋的孕妇及其伴侣进行产前诊断,不包括在此次筛查中);②出生时有缺氧窒息、胆红素脑病等情况;③研究对象的母亲属近亲婚配、孕期有发热、有特殊药物使用史,有遗传性疾病史。在筛查前均详细告知家长耳聋基因联合听力筛查的相关知识,取得同意后签署知情同意书。

2. 耳聋基因筛查:所有新生儿在出生时采集脐静脉血 2ml 或出生后采集足跟血于滤纸卡,晾干后保存并及时送往基因实验室,提取 DNA,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)进行检测。首先 PCR 扩增目的片段区域,然后加入多对特异性引物,进行单碱基延伸,再将单碱基延伸产物纯化后打质谱,根据不同引物扩增产物的质荷比不同,来判断有无碱基突变。包括 4 个基因 20 个位点,分别为 GJB2 基因(35delG、167delT、176-192del116、235delC、299-300delAT)、GJB3 基因(538C>T、547G>A)、SLC26A4 基因(281C>T、589G>A、IVS7-2A>G、1174A>T、1226G>A、1229C>T、IVS15+5G>A、1975G>C、2027T>A、2162C>T、2168A>G)及线粒体 12S rRNA 基因(1494C>T、1555A>G)。

3. 常规听力筛查:在安静环境新生儿熟睡状态

下,由专业的医护人员,用自动听性脑干反应及耳声发射判定通过或者不通过^[2]。若不通过则于出生后 42 天进行复筛,复筛未通过者在出生后 3 个月进行第 2 次复筛,仍不通过者用 ABR 进行诊断性听力检查,采用 ABR 法检测, $> 35\text{dBnHL}$ 判定为听力损失。同时进行跟踪随访。

4. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析,计数资料以构成比表示,男、女耳聋基因筛查阳性率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:1000 例新生儿中男性 512 例,其中耳聋基因筛查阳性者 24 例;女性 488 例,其中耳聋基因筛查阳性者 17 例,男女性别之间耳聋基因筛查阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.921, P = 0.337$)。

2. 常规听力筛查结果:1000 例新生儿中 85 例(8.5%)听力初筛未通过,85 例均进行复筛,二次复筛未通过 24 例(2.4%)。

3. 耳聋基因筛查结果:4 个常见耳聋基因突变阳性者共 41 例,突变率达 4.1%。GJB2 基因阳性者共 22 例,SLC26A4 基因阳性者共 12 例,GJB3 基因阳性者共 4 例,线粒体 12S rRNA 基因阳性者共 2 例,GJB2 基因联合 SLC26A4 基因突变 1 例。本研究中 GJB2 c.235delC 位点突变率最高(表 1)。

表 1 41 例新生儿耳聋基因突变位点分布联合听力筛查情况(n)

基因	突变位点类型	基因突变	听力复筛
GJB2	235delC 纯合突变	1	未通过
	235delC 杂合突变	17	4 例未通过,13 例通过
	299-300delAT 杂合突变	4	2 例未通过,2 例通过
GJB3	547G>A 杂合突变	3	1 例未通过,2 例通过
	538C>A 杂合突变	1	全通过
SLC26A4	IVS7-2A>G 杂合突变	11	2 例未通过,9 例通过
	IVS7-2A>G 纯合突变	1	未通过
线粒体 12S rRNA	1555 A>G 均质突变	2	全通过
复合型	GJB2 c.235delC 与 SLC26A4 c. IVS7-2A>G 杂合突变	1	未通过
合计		41	12 例未通过,29 例通过

4. 耳聋基因与听力联合筛查结果:1000 例新生儿中,耳聋基因与听力筛查均通过的有 947 例,耳聋基因与听力筛查均未通过 12 例,耳聋基因筛查通过但听力筛查未通过 12 例,耳聋基因筛查未通过但听力筛查通过 29 例(表 2)。

表 2 耳聋基因筛查联合听力筛查结果(n)

听力筛查	基因筛查		合计
	正常	异常	
通过	947	29	976
未通过	12	12	24
合计	959	41	1000

5. 听力学诊断结果:24例复筛未通过的患儿进行了听力学诊断,最终确诊7例听力损失,新生儿先天性听力损失检出率为0.7%,其中4例有耳聋基因位点突变。2例重度听力损失,其中1例ABR阈值左耳95dB、右耳85dB,耳聋基因筛查结果为GJB2 c. 235delC纯合突变,1例耳聋基因筛查正常。2例中度听力损失,ABR阈值双耳分别为50dB和55dB,耳聋基因筛查分别显示GJB2 c. 235delC杂合突变和GJB3 c. 547G > A杂合突变。2例左耳中度听力损失,ABR阈值55dB,右耳听力正常,其中1例耳聋基因筛查显示为GJB2 c. 299 - 300 delAT杂合突变,1例耳聋基因筛查正常;1例右耳中度听力损失,ABR阈值50dB,左耳听力正常,耳聋基因筛查正常。

讨 论

新生儿听力损失的发生率为0.1%~0.3%,在我国每年约有30000例新增耳聋儿,其中50%~60%的听力损失与遗传因素有关^[3]。有研究者对2007年~2016年10年间关于中国新生儿耳聋基因突变情况做Meta分析,得出我国新生儿耳聋基因突变率最高的依次是GJB2基因、SLC26A4基因、线粒体12S rRNA^[4]。本研究发现耳聋基因突变率的结果与此文献相符。传统的听力筛查主要是检测新生儿耳部功能及耳周结构,需在出生3个月经听力学诊断方能确诊,往往无法及时诊断出病因,进而导致语言培训延误,造成患者因聋致哑,加重家庭负担^[5]。因此,在实施听力筛查的同时,可联合采用耳聋基因检测,有助于尽早发现听力障碍患儿,做到早诊疗、早干预。

1. GJB2基因:在欧美国家GJB2基因突变导致了约30%~50%的非综合性遗传性耳聋,其为常染色体隐性遗传,可引起中、重、极重度听力损失。迄今为止,已发现GJB2基因的突变类型超过100种,其位点突变有地域性,在欧美地区发生率较高的是35delG,约占70%,而在我国发生率较高的是235delC^[4,6]。本研究检出GJB2基因突变22例,其中17例235delC杂合突变,4例299 - 300delAT杂合突变,1例235delC纯合突变。尚未发现其他位点的突变,可能与本研究的标本量较少有关,有待于扩大样本量后做进一步统计。杂合突变提示受检者为携带者,一般不发病,但具有高度的遗传易感性,2个GJB2基因杂合突变婚配生育听力障碍儿童的概率25%,明确患儿的致聋基因型可正确指导成年期婚育。有研究者对耳聋基因纯合突变婴儿的听力进行随访,发现GJB2

C. 235del C 和 SLC26A4 IVS7 - 2A > G 基因纯合突变,婴儿听力障碍主要是双耳严重的听力障碍,并且在1~3年的随访中没有变化^[7]。本研究亦有1例患儿GJB2 delC基因纯合突变,经听力测试为重度听力损失,结果二者相互得到了印证,该患儿通过移植电子耳蜗恢复了听力。

2. SLC26A4基因:SLC26A4基因突变是引起遗传性耳聋的第2大原因,与大前庭水管综合征(LVAS)有关^[8]。LVAS是一种能够根据影像学分类的感音神经性耳聋,CT或MRI提示前庭水管或内淋巴囊扩大。SLC26A4基因突变影响声音传递而导致听力损失。出生时可能听力正常,因轻度碰撞或感冒可造成明显的听力下降。SLC26A4基因突变引起的耳聋是常染色体隐性遗传,其IVS7 - 2A > G位点突变在LVAS中最常见^[9]。本研究检出主要是SLC26A4 c. IVS7 - 2A > G位点突变13例,其中1例为纯合突变,听力学诊断均通过,仍需提醒家长早期预警,密切观察听力变化,发现听力下降及时救治,挽救听力水平。

3. 线粒体12S rRNA:耳毒性药物是引起听力损失的一个重要的环境因素。目前已知的具有耳毒性的药物超过150种,许多药物的耳毒性在治疗停止后即消失,但氨基糖苷类药物的使用与永久性听力损失有关^[10]。线粒体基因的突变作为氨基糖苷类药物耳毒性母体遗传的可能基础,于1989年由Higashi^[11]首次提出。编码线粒体核糖体12S亚基的MT - RNR1基因是氨基糖苷类诱导的非综合性听力丧失突变的热点,且mtDNA 12S rRNA 1555A > G是母系遗传^[12-14]。女性携带者可以将这一突变传递给下一代的所有子女。本研究中2例线粒体12S rRNA基因1555A > G均质突变均通过听力筛查,仍需向其监护人发放药物警示卡片,降低药物性耳聋的危险。

4. GJB3基因:GJB3 c. 547G > A突变可能会引起迟发性听力损失。由于缺乏充足的流行病学统计数据,且很多带有该突变基因的受检者的听力表型正常,所以该致病机制并不明确^[15]。本研究检出GJB3基因杂合突变4例,其中3例为547G > A突变,1例未通过听力复筛且双耳听力中度损失。

关于重度、极重度感应神经性耳聋主要的解决方案是人工耳蜗植入(cochlear implantation, CI)。CI术后效果也受诸多因素的影响,其中就包括了致聋基因的类型。目前在全国范围内也开展了“耳聋基因与CI相关性”研究。从遗传性角度看,GJB2、SLC26A4

基因突变患者 CI 效果较明确,其他耳聋基因突变患者 CI 效果尚需进一步研究^[16,17]。新生儿出生后听力筛查与常见耳聋基因筛查相结合,也可以为重度、极重度遗传性耳聋患儿是否需进行人工耳蜗植提供评估依据。

目前发现的耳聋基因近 300 种,虽然扩大筛查的基因及变异位点,能提高检出率,但纳入更多位点也可能会出现一些变异临床意义解释不清的情况。此外扩大筛查范围势必增加检测成本,对一些极其罕见的耳聋基因变异进行筛查不符合卫生经济学,故目前在国内仍以开展常见的耳聋基因筛查为主,对听力缺失患儿,若常见耳聋基因检测阴性,再扩大后续的检测,减少漏诊^[18]。

综上所述,本研究通过分析 1000 例杭州地区新生儿群体中耳聋基因的携带特点及联合新生儿听力筛查结果,初步建成杭州地区新生儿耳聋基因突变率信息储备库。在成熟的新生儿听力筛查的基础上,融入耳聋基因热点突变位点的筛查,可以从分子水平上早期发现和诊断先天性遗传性耳聋,对迟发性耳聋进入早期日常听力保健和安全用药指导,减少听力障碍儿童的出生,为儿童听力保健提供一种新的模式。

参考文献

- 郭雅琪,何学虎,张玉英,等. NICU 新生儿听力筛查联合遗传性耳聋基因检测的结果分析[J]. 中国妇幼保健,2017,32(21):5382-5385
- 张小娥,陈娟. NICU 新生儿听力筛查联合遗传性耳聋基因检测的结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2018,26(11):83-85
- Bing H, Qian LI, Liang Z, *et al.* An clinical research on newborn hearing concurrent genetic screening in 106,513 neonates[J]. Chinese Journal of Otolaryngology, 2013, 11(3):380-383
- Fu Y, Zha S, Lü N, *et al.* Carrier frequencies of hearing loss variants in newborns of China: a Meta-analysis[J]. J Evid Based Med, 2019, 12(1):40-50
- 余红,杨晶群,刘丹,等. 8187 名新生儿听力与常见耳聋基因联合

筛查研究[J]. 中华全科医师杂志,2018,17(2):139-142

- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, *et al.* Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB3 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands[J]. Genet Med, 2003, 5(4):295-303
- Liu QM, Tian Y, Yu JJ, *et al.* Hearing assessment and follow-up study of neonatal deafness gene screening homozygous mutation infants[J]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi,2019, 33(11):1089-1092
- Dai P, Li Q, Huang D, *et al.* SLC26A4 c.919-2A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss[J]. Genet Med, 2008, 10(8):586-592
- Zhao XL, Huang LH, Wang XY, *et al.* Analysis of genotypes and audiological characteristics of children with SLC26A4 gene pathogenic mutations[J]. J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2018, 32(11):836-840
- Lanvers-Kaminsky C, Ciarimboli G. Pharmacogenetics of drug-induced ototoxicity caused by aminoglycosides and cisplatin[J]. Pharmacogenomics, 2017, 18(18):1683-1695
- Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness[J]. Clin Genet, 1989, 35(6):433-436
- Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity[J]. Pharmacogenomics, 2005, 6(1):27-36
- Ding Y, Leng J, Fan F, *et al.* The role of mitochondrial DNA mutations in hearing loss[J]. Biochem Genet, 2013, 51(7-8):588-602
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness[J]. Nat Genet, 1993, 4(3):289-294
- 刘玉和,袁慧军. 遗传性耳聋的基因诊断与遗传咨询[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013,48(12):1051-1056
- 兰莉,叶清,杨可婕,等. 贵州省人工耳蜗植入患儿的常见耳聋基因突变位点分析[J]. 中华耳科学杂志, 2019,17(4):552-557
- 苏钰,戴朴. 耳聋基因诊断在人工耳蜗植入中的应用[J]. 中华耳科学杂志, 2018,16(6):57-62
- 袁永一,戴朴. 遗传性耳聋规范化筛查与诊断的探讨[J]. 中华耳科学杂志,2019,17(5):611-615

(收稿日期:2020-02-28)

(修回日期:2020-03-13)

(上接第 100 页)

- Ijzerman MJ, Berghuis AMS, de Bono JS, *et al.* Health economic impact of liquid biopsies in cancer management[J]. Expert Review of Pharmacoeconomics Outcomes Res, 2018, 18(6):593-599
- Lv WQ, Wang HC, Peng J, *et al.* Gene editing of the extra domain A positive fibronectin in various tumors, amplified the effects of CRISPR/Cas system on the inhibition of tumor progression[J]. Oncotarget, 2017,8(62):105020-105036

- Guyot M, Hilmi C, Ambrosetti D, *et al.* Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies[J]. Oncotarget, 2016, 8(12):9174-9188

- Albini A. Extracellular matrix invasion in metastases and angiogenesis: commentary on the matrigel "chemoinvasion assay"[J]. Cancer Res,2016,76(8):4595-4597

(收稿日期:2020-02-19)

(修回日期:2020-03-10)